

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**TESIS**

**“ESTUDIO QUÍMICO DEL LIQUEN**

*Umbilicaria calvescens Nyl.”*

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN QUÍMICA**

**ELABORADO POR**

**JUDITH RAMOS CHÁVEZ**

**ASESORA**

**M.Sc. ELENA ALICIA CÓNDOR CUYUBAMBA**

**LIMA – PERÚ**

**2018**

*A mi querida madre Silvia por su gran apoyo,  
amor y comprensión.*

*A mi hermano Luis y mi padre Juan por estar  
a mi lado y por su comprensión.*

## AGRADECIMIENTOS

Mi más grande y sincero agradecimiento es hacia mi asesora, M.Sc. Elena Alicia Córdor Cuyubamba, por estar presente en todo momento en la realización de este trabajo de investigación brindándome consejos, por la buena calidad de persona que me mostró en todo momento, al estar bajo su asesoramiento y durante mis años de estudio; asimismo, por orientarme y apoyarme en el camino de la investigación, y por la ayuda en la búsqueda de contactos quienes colaboraron en la investigación.

Mis sinceros agradecimientos a todos los miembros del Grupo de Investigación de Productos Naturales quienes me apoyaron y aconsejaron durante el trabajo experimental de la tesis; al Dr. Victor Reyna Pinedo por sus consejos y apoyo moral.

A la M.Sc. Otilia Acha De la Cruz y al grupo de investigación de Labicer quienes me facilitaron el uso de ciertos equipos.

Al Dr. Hugo Alarcón Cavero por brindarme apoyo en la obtención de los espectros IR y UV de los cristales obtenidos del trabajo experimental.

A la Dra. Ingrit Collantes Díaz por su ayuda en la búsqueda de referencias bibliográficas relacionadas a este tema de investigación.

De igual forma, al jefe del laboratorio N° 12 de la Facultad de Ciencias de la UNI, Lic. Hugo Gontaruk Collque y al personal de trabajo, quienes hicieron grata mi estancia y me facilitaron los materiales y equipos durante el aislamiento de los compuestos liquénicos de este trabajo de investigación.

Asimismo, mis agradecimientos especiales al M.Sc. Pedro Baldera Aguayo y al Departamento de Investigación de la Universidad de Columbia por la obtención de los espectros de masas (EM), los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN<sup>1</sup>H) y los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN<sup>13</sup>C) de los compuestos aislados.

Al Instituto de Investigación (IDI) de la Facultad de Ciencias, por el apoyo económico brindado en la última etapa de este trabajo de investigación.

A todas las personas que me apoyaron y ayudaron de una u otra manera a la culminación de este trabajo de investigación.

## RESUMEN

### “ESTUDIO QUÍMICO DEL LÍQUEN *Umbilicaria calvescens* Nyl.”

Tradicionalmente los líquenes eran empleados como fuente de alimento, en el campo de la medicina natural y en el uso de tintes. En la actualidad son de gran importancia en la industria farmacéutica, donde se han señalado propiedades antibacterianas, antioxidantes, anticancerígenas entre otros, de los extractos liquénicos. Por tal motivo el presente trabajo se enfocó en el estudio químico de la especie liquénica *Umbilicaria calvescens* Nyl., la cual fue recolectada en el camino a Huaytapallana (4000 - 4500 msnm), distrito de Huancayo, provincia de Huancayo, departamento de Junín.

Este estudio muestra un análisis preliminar (Marcha Fitoquímica) donde se identifica los principales metabolitos secundarios, infiriéndose que el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. contiene aminogrupos primarios y/o secundarios(++), grupos fenólicos libres(++), taninos(+) y triterpenoides y/o esteroides(+).

Del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. se logró aislar, en forma de cristales, los compuestos liquénicos mayoritarios, ácido úsnico y ácido lecanórico; los cuales fueron identificados por su punto de fusión y el análisis de sus espectros (EM, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, IR y UV). Estos compuestos se obtuvieron por extracción del líquen en n-hexano y acetona; y cada uno de estos extractos se purificó mediante técnicas cromatográficas (CCF y CC). Asimismo, se realizó el análisis cuantitativo del ácido úsnico, obteniéndose un porcentaje de 0.41% del compuesto liquénico.

**Palabras claves:** ácido úsnico, ácido lecanórico, *Umbilicaria calvescens* Nyl., líquenes.

# ESTUDIO QUÍMICO DEL LIQUEN *Umbilicaria calvescens* Nyl.

## INDICE DE CONTENIDO

|  |     |
|--|-----|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>   | iii |
| <b>RESUMEN</b>   | iv  |
| <b>CAPÍTULO I: ASPECTOS GENERALES</b>  | 1   |
| A. PRESENTACIÓN  | 2   |
| B. OBJETIVOS DE LA TESIS   | 5   |
| <b>CAPÍTULO II: ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO</b>  | 6   |
| A. CONCEPTOS PREVIOS   | 7   |
| 1. Líquenes  | 7   |
| 2. Sustratos y Biotipos Liguénicos   | 10  |
| 3. Usos e importancia de los líquenes  | 14  |
| 4. Compuestos Liguénicos   | 15  |
| a. Dépsidos  | 15  |
| b. Depsidonas  | 16  |
| c. Dibenzofuranos  | 16  |
| d. Ácidos Úsnicos  | 17  |
| 5. Usos e importancia de los compuestos liquénicos   | 19  |
| a. Ácido Úsnico  | 19  |
| b. Ácido Lecanórico  | 20  |
| B. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES RELATIVOS AL LIQUEN<br><i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl. | 21  |
| 1. Composición Química   | 21  |
| a. Análisis preliminar y principales grupos liquénicos                                     | 21  |
| b. Análisis cuantitativo del ácido úsnico  | 22  |

|  |    |
|--|----|
| 2. Aislamiento de Compuestos Liquénicos                                      | 22 |
| 3. Identificación clásica del ácido úsnico y ácido lecanórico                | 22 |
| 3.1. Ácido Úsnico  | 22 |
| 3.2. Ácido Lecanórico  | 23 |
| 4. Identificación espectroscópica del ácido úsnico y ácido lecanórico        | 24 |
| 4.1. Ácido Úsnico  | 24 |
| a. Espectro de Masas, EM   | 24 |
| b. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN <sup>1</sup> H | 27 |
| c. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN <sup>13</sup> C  | 30 |
| d. Espectro Infrarrojo, IR   | 32 |
| e. Espectro Ultravioleta, UV   | 35 |
| 4.2. Ácido Lecanórico  | 37 |
| a. Espectro de Masas, EM   | 37 |
| b. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN <sup>1</sup> H | 40 |
| c. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono, RMN <sup>13</sup> C  | 42 |
| d. Espectro Infrarrojo, IR   | 44 |
| e. Espectro Ultravioleta, UV   | 46 |
| C. ESTUDIOS QUÍMICOS GENERALES   | 47 |
| 1. Composición Química del material liquénico                                | 47 |
| a. Análisis Cualitativo (Marcha Fitoquímica)                                 | 47 |
| b. Test de coloración de compuestos liquénicos                               | 48 |
| c. Análisis cuantitativo del ácido úsnico                                    | 49 |
| c.1. Procedimiento de Castro (2004)  | 50 |
| c.2. Procedimiento de Nedeljko (2011)  | 51 |
| c.3. Comparación de procedimientos   | 51 |
| 2. Aislamiento de Compuestos Liquénicos                                      | 52 |
| a. Procedimiento de Cóndor (2012)  | 52 |

|  |    |
|--|----|
| b. Procedimiento de Martino (2015)                             | 53 |
| c. Procedimiento de la Tesis                                   | 55 |
| 3. Identificación Espectroscópica de Compuestos Orgánicas      | 55 |
| a. Espectrometría de Masas                                     | 56 |
| b. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno | 58 |
| c. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono   | 59 |
| d. Espectroscopia Infrarroja                                   | 63 |
| e. Espectroscopia Ultravioleta                                 | 64 |
| <br>   |    |
| <b>CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL</b>                        | 67 |
| <b>PRESENTACIÓN</b>  | 68 |
| <b>A. TRABAJO PRELIMINAR</b>                                   | 69 |
| 1. Recolección de la muestra                                   | 69 |
| 2. Determinación Botánica                                      | 70 |
| <b>B. TRABAJO EXPERIMENTAL</b>                                 | 72 |
| 3. Equipos y materiales  | 72 |
| 4. Secado y molienda   | 72 |
| 5. Análisis Cualitativo  | 74 |
| 5.1. Marcha Fitoquímica  | 74 |
| 5.2. Test de coloración para compuestos liquénicos             | 75 |
| 6. Análisis Cuantitativo del ácido úsnico                      | 76 |
| a. Muestra   | 76 |
| b. Procedimiento experimental                                  | 76 |
| c. Resultados  | 81 |
| 7. Aislamiento de Compuestos Liquénicos                        | 82 |
| 7.1. Muestra   | 82 |

|  |     |
|--|-----|
| 7.2.Procedimiento experimental   | 82  |
| a. Extracción Sólido-Líquido   | 82  |
| b. Separación y Purificación por Cromatografía                         | 84  |
| b.1. Análisis preliminar por Cromatografía en Capa Fina                | 84  |
| b.2. Separación por Columna Cromatográfica                             | 85  |
| c. Recristalización  | 92  |
| 8. Identificación Clásica y Espectroscópica de los compuestos aislados | 93  |
| 8.1. Identificación Clásica del Compuesto U                            | 93  |
| 8.2. Identificación Clásica del Compuesto L                            | 94  |
| 8.3. Identificación Espectroscópica del Compuesto U                    | 96  |
| a. Espectro de Masas   | 96  |
| b. Espectro de RMN <sup>1</sup> H                                      | 97  |
| c. Espectro de RMN <sup>13</sup> C                                     | 100 |
| d. Espectro Infrarrojo   | 105 |
| e. Espectro Ultravioleta   | 107 |
| 8.4. Identificación Espectroscópica del Compuesto L                    | 108 |
| a. Espectro de Masas   | 108 |
| b. Espectro de RMN <sup>1</sup> H                                      | 110 |
| c. Espectro de RMN <sup>13</sup> C                                     | 113 |
| d. Espectro Infrarrojo   | 118 |
| e. Espectro Ultravioleta   | 120 |
| <b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y CONCLUSIONES</b>                          | 122 |
| RESULTADOS   | 123 |
| CONCLUSIONES   | 124 |
| <b>CAPÍTULO V: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                          | 125 |



|   |     |
|---|-----|
| <b>CAPÍTULO VI: ANEXOS</b>  | 130 |
| ANEXO 1. Constancia de la Determinación Botánica  | 131 |
| ANEXO 2. Características del líquen <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl.  | 132 |
| ANEXO 3. Modo de Ionización: APCI   | 133 |
| ANEXO 4. Especificaciones del reactivo de ácido úsnico  | 135 |
| ANEXO 5. Marcha Fitoquímica   | 136 |
| ANEXO 6. Test de Coloración para compuestos liquénicos  | 143 |
| ANEXO 7. Diagramas del proceso experimental   | 146 |
| ANEXO 8. Resultado de la Marcha Fitoquímica Preliminar  | 154 |
| ANEXO 9. Resultado de la cuantificación del ácido úsnico  | 155 |
| ANEXO 10. Aislamiento de los Compuestos U y L (Fotos)   | 156 |
| ANEXO 11. Tratamiento estadístico para la curva de calibración y la muestra liquénica para la cuantificación del ácido úsnico | 157 |

## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> (a) Hongo ( <i>Amarita muscaria</i> ); (b) Alga ( <i>Caulerpa taxifolia</i> ); (c) Simbiosis; (d) Líquen ( <i>Xanthoria parietina</i> ).  | 8  |
| <b>Figura 2.</b> Talos liquénicos: izquierda, Talo homómero; derecha, Talo heterómero.   | 9  |
| <b>Figura 3.</b> Dépsidos: <u>i.</u> ácido lecanórico; <u>ii.</u> atranorina.  | 15 |
| <b>Figura 4.</b> Depsidonas: <u>i.</u> ácido variolárico; <u>ii.</u> ácido estúfico.   | 16 |
| <b>Figura 5.</b> Dibenzofuranos: <u>i.</u> ácido panárico; <u>ii.</u> ácido didímico.  | 17 |
| <b>Figura 6.</b> Ácidos úsnicos: <u>i.</u> (-) ácido úsnico; <u>ii.</u> (+) ácido úsnico; <u>iii.</u> ácido isoúsnico.   | 18 |
| <b>Figura 7.</b> Espectro de masas (EI) del ácido úsnico obtenido del liquen <i>Xanthoparmelia tasmanica</i> (Cóndor, 2012).   | 24 |
| <b>Figura 8.</b> Espectro de masas (ESI) del ácido úsnico obtenido del liquen <i>Usnea antarctica</i> (Viteri, 2015).  | 25 |
| <b>Figura 9.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del ácido úsnico obtenido del liquen <i>Xanthoparmelia tasmanica</i> (Cóndor, 2012).                                     | 27 |
| <b>Figura 10.</b> (a) Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del ácido úsnico aislado del <i>Usnea antarctica</i> ; ampliación a (b) campo bajo y (c) campo alto (Viteri, 2015). | 28 |
| <b>Figura 11.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del ácido úsnico obtenido del liquen <i>Usnea antarctica</i> (Viteri, 2015).   | 30 |
| <b>Figura 12.</b> Espectro IR del ácido úsnico obtenido del liquen <i>Flavopunctelia Flaventior</i> (Stirt.) Hale (Martino, 2015)  | 32 |
| <b>Figura 13.</b> Espectro IR del ácido úsnico obtenido del liquen <i>Usnea antarctica</i> (Viteri, 2015).   | 33 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 14.</b> Comparación de los espectros IR del ácido úsnico reportados por Viteri (2015) y Ramos (Tesis).   | 34 |
| <b>Figura 15.</b> Espectro UV del ácido úsnico obtenido del líquen <i>Psiloparmelia distincta</i> (Nyl.) Hale. (Castro, 2004).   | 35 |
| <b>Figura 16.</b> Espectro UV del ácido úsnico obtenido del líquen <i>Usnea antarctica</i> (Viteri, 2015).   | 36 |
| <b>Figura 17.</b> Espectro de masas (ESI) del ácido lecanórico obtenido del líquen <i>Flavopunctelia flaventior</i> (Stirt.) Hale (Martino, 2015).   | 37 |
| <b>Figura 18.</b> Notación numérica en la estructura del ácido lecanórico.   | 40 |
| <b>Figura 19.</b> Espectro IR del ácido lecanórico obtenido del líquen <i>Flavopunctelia flaventior</i> (Stirt.) Hale. (Martino, 2015).  | 44 |
| <b>Figura 20.</b> Comparación de los espectros IR del ácido lecanórico reportados por Martino (2015) y Ramos (Tesis).  | 45 |
| <b>Figura 21.</b> Espectro UV del ácido lecanórico obtenido del líquen <i>Umbilicaria antártica</i> (Heng Luo, 2009).  | 46 |
| <b>Figura 22.</b> (a) Espectro desacoplado de banda ancha, presenta los 8 carbonos; (b) espectro DEPT-90, presenta 2 carbonos del CH; (c) espectro DEPT-135, presenta señales positivas para los 2 CH y 3 CH <sub>3</sub> , y señales negativas para los 2 CH <sub>2</sub> . | 62 |
| <b>Figura 23.</b> Transiciones electrónicas  | 65 |
| <b>Figura 24.</b> Ejemplos de sistemas conjugados  | 65 |
| <b>Figura 25.</b> Curva de Calibración para el Ácido Úsnico.   | 80 |
| <b>Figura 26.</b> EM (APCI) del compuesto U aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .  | 97 |
| <b>Figura 27.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del Compuesto U aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .   | 99 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 28.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del Compuesto U aislado del líquen <i>U. calvescens</i> . | 103 |
| <b>Figura 29.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT-90 del Compuesto U aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .                       | 104 |
| <b>Figura 30.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT-135 del Compuesto U aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .                      | 104 |
| <b>Figura 31.</b> Espectro IR del Compuesto U aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .   | 106 |
| <b>Figura 32.</b> Espectro UV del Compuesto U aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .   | 108 |
| <b>Figura 33.</b> EM (APCI) del Compuesto L aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .   | 109 |
| <b>Figura 34.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO) del Compuesto L aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .                | 112 |
| <b>Figura 35.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, DMSO) del Compuesto L aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .               | 116 |
| <b>Figura 36.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT-90 del Compuesto L aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .                       | 117 |
| <b>Figura 37.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT-135 del Compuesto L aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .                      | 117 |
| <b>Figura 38.</b> Espectro IR del Compuesto L aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .   | 119 |
| <b>Figura 39.</b> Espectro UV del Compuesto L aislado del líquen <i>U. calvescens</i> .   | 121 |

**INDICE DE TABLAS**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.</b> Tipos de sustratos liquénicos  | 11 |
| <b>Tabla 2.</b> Biotipos liquénicos según su forma de crecimiento  | 13 |
| <b>Tabla 3.</b> Datos comparativos del espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> ) del ácido úsnico  | 29 |
| <b>Tabla 4.</b> Datos comparativos del espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> ) del ácido úsnico | 31 |
| <b>Tabla 5.</b> Bandas características del espectro IR para el ácido úsnico                                  | 34 |
| <b>Tabla 6.</b> Bandas de máxima absorción en el espectro UV para el ácido úsnico                            | 36 |
| <b>Tabla 7.</b> Datos comparativos del espectro de RMN <sup>1</sup> H del ácido lecanórico                   | 41 |
| <b>Tabla 8.</b> Datos comparativos del espectro de RMN <sup>13</sup> C del ácido lecanórico                  | 43 |
| <b>Tabla 9.</b> Bandas características del espectro IR para el ácido lecanórico                              | 45 |
| <b>Tabla 10.</b> Bandas de máxima absorción en el espectro UV para el ácido lecanórico                       | 47 |
| <b>Tabla 11.</b> Porcentaje del ácido úsnico en diversas especies liquénicas                                 | 49 |
| <b>Tabla 12.</b> Resumen de las Técnicas Espectroscópicas  | 66 |
| <b>Tabla 13.</b> Clasificación Taxonómica de la muestra Liquénica  | 71 |
| <b>Tabla 14.</b> Cantidades de muestra recolectada   | 73 |
| <b>Tabla 15.</b> Datos para la obtención de la curva de calibración  | 79 |
| <b>Tabla 16.</b> Separación por CC de la Fracción A (1° Columna)   | 86 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 17.</b> Separación por CC de la Fracción A (2° Columna)   | 87  |
| <b>Tabla 18.</b> Separación por CC de la Fracción A (3° Columna)   | 88  |
| <b>Tabla 19.</b> Separación por CC de la Fracción H (1° Columna)   | 90  |
| <b>Tabla 20.</b> Separación por CC de la Fracción H (2° Columna)   | 91  |
| <b>Tabla 21.</b> Datos del espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del Compuesto U  | 98  |
| <b>Tabla 22.</b> Datos del espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del Compuesto U | 102 |
| <b>Tabla 23.</b> Datos del espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO) del Compuesto L                | 111 |
| <b>Tabla 24.</b> Datos del espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, DMSO) del Compuesto L               | 115 |

## INDICE DE FOTOS

|  |    |
|--|----|
| <b>Foto 1.</b> Superior izquierda y derecha, Zona de recolección, Camino al nevado de Huaytapallana; Inferior derecha, muestra liquénica recolectada. Foto tomada por Judith Ramos (2013). | 69 |
| <b>Foto 2.</b> Zona de recolecta, Huaytapallana, Dep. Junín, Prov. Huancayo, Distrito de Huancayo. Foto tomada por Judith Ramos (2015).  | 70 |
| <b>Foto 3.</b> Superior, Muestra <i>U. calvescens</i> limpia y seca; Inferior, muestra pulverizada. Foto tomada por Judith Ramos (2016).   | 73 |
| <b>Foto 4.</b> Izquierda, obtención del EBO. Derecha, Fracción A. Foto tomada por Judith Ramos (2016).   | 83 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>A</b>                 | Absorbancia   |
| <b>AcOEt</b>             | Acetato de etilo  |
| <b>APCI</b>              | Ionización Química a Presión Atmosférica                |
| <b>°C</b>                | Grado centígrado  |
| <b>CC</b>                | Cromatografía en columna                                |
| <b>CCF</b>               | Cromatografía en capa fina                              |
| <b>d</b>                 | Doblete   |
| <b>DEPT</b>              | Transferencia por polarización aumentada sin distorsión |
| <b>δ</b>                 | Desplazamiento químico                                  |
| <b>EM</b>                | Espectro de Masas                                       |
| <b>EBO</b>               | Extracto bruto orgánico                                 |
| <b>FA</b>                | Fracción A  |
| <b>FD</b>                | Fracción D  |
| <b>FH</b>                | Fracción H  |
| <b>g</b>                 | Gramo   |
| <b>h</b>                 | Hora  |
| <b>Hex</b>               | Hexano  |
| <b>min</b>               | Minuto  |
| <b>MeOH</b>              | Metanol   |
| <b>μm</b>                | Micrómetro  |
| <b>IR</b>                | Infrarrojo  |
| <b>λ</b>                 | Longitud de onda  |
| <b>nm</b>                | Nanómetro   |
| <b>Rf</b>                | Ratio of front (distancia de frente)                    |
| <b>RMN<sup>1</sup>H</b>  | Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno               |
| <b>RMN<sup>13</sup>C</b> | Resonancia Magnética Nuclear de Carbono                 |
| <b>s</b>                 | Singulete   |
| <b>uma</b>               | Unidad de masa atómica                                  |
| <b>UV-Vis</b>            | Ultravioleta-Visible                                    |
| <b>φ</b>                 | Diámetro  |

---

# CAPÍTULO I

---

## ASPECTOS GENERALES

---

---



## A. PRESENTACIÓN

El estudio de la flora peruana sigue siendo tema para la realización de diversas investigaciones, tanto en el campo de la medicina, o como empleo de descontaminantes ecológicos, o en el campo industrial, entre otras formas de estudio y usos; siendo la Química de los Productos Naturales la que engloba un estudio químico de las sustancias orgánicas presentes en una muestra vegetal, mediante el aislamiento e identificación estructural de los compuestos obtenidos, así como de su biosíntesis o síntesis orgánicas. Por lo tanto, la aparición de nuevas especies y las aún no estudiadas continúa llamando la atención a los investigadores; entre estas especies, tenemos a los líquenes, pertenecientes al reino Fungí, formados por la asociación entre hongos (Micobionte) y algas (Fotobionte), los cuales al poseer características de ambas partes le otorgan a los líquenes cualidades únicas como resistencia a condiciones climáticas extremas, presentando así una amplia distribución geográfica. Con respecto a los estudios sobre los líquenes en el Perú; estos son del tipo botánico por lo que son pocos los estudios químicos, a pesar de que el Perú cuenta con el ambiente idóneo para su abundante proliferación. Es debido a ello el interés de este trabajo por abarcar el estudio químico de estos enigmáticos organismos.

El presente trabajo de investigación, corresponde a la línea de Química Orgánica de Productos Naturales; siendo este la culminación de los trabajos previos realizados en los cursos de proyecto de tesis. Estos trabajos fueron:

- i. Proyecto de Tesis I CQ - 561, Marcha Fitoquímica del liquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.
- ii. Proyecto de Tesis II CQ - 022, Determinación Cuantitativa de Ácido Úsnico del liquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.

De acuerdo a los conocimientos adquiridos en el curso de Química Orgánica de los Productos Naturales, un primer estudio de una muestra desconocida es la realización del análisis cualitativo (Marcha Fitoquímica) para la identificación de los principales metabolitos secundarios o principios activos que puedan estar presentes

en la muestra, lo cual fue abarcado en el curso de proyecto de tesis I. En la segunda fase, el enfoque del trabajo fue el análisis cuantitativo del metabolito más frecuente de los líquenes, el ácido úsnico, el cual fue tratado en el curso de proyecto de tesis II. Estos trabajos previos de investigación fueron la base para la etapa final, en el cual se realizó el aislamiento de los principales compuestos liquénicos.

Por lo expuesto, este trabajo de licenciatura fue de gran experiencia; debido a que me permitió ver distintos enfoques de la investigación, no sólo desde un estudio experimental sino también lo que conlleva a la publicación de un informe, permitiéndome adquirir más conocimientos, así como a poner en práctica las enseñanzas aprendidas durante mi formación estudiantil, de igual forma a complementar mi educación y a estar siempre activo a nuevas experiencias como científico. Asimismo, este trabajo contribuye con la fomentación de proyectos de investigación sobre el estudio químico de líquenes (liquenoquímica) en el Perú.

A continuación, se citarán las actividades realizadas en este trabajo de tesis de licenciatura.

a) El trabajo preliminar incluyó tres actividades:

- i. La recolección de la muestra liquénica, la cual se realizó en el distrito de Huancayo (Prov. Huancayo – Dpto. Junín), aproximadamente a la altura del Km 17-18 de la carretera hacia el nevado del Huaytapallana, a una altitud de 4000 a 4500 msnm.
- ii. La identificación botánica, que fue realizada en el Museo de Historia Natural de la UNMSM.
- iii. La búsqueda bibliográfica.

b) El trabajo experimental en el laboratorio químico, que se realizó en el ambiente de Investigación de Química de Productos Naturales (C3-175), ubicado en el Laboratorio N° 12 del Pabellón C de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería; incluyó cuatro actividades:

- i. Secado, pulverización y tamizado de la muestra.
  - ii. Análisis cualitativo (Marcha Fitoquímica), realizado durante los meses de enero a marzo del 2014.
  - iii. Análisis cuantitativo del ácido úsnico, realizado durante los meses de julio a setiembre del 2014.
  - iv. Aislamiento de dos compuestos liquénicos: ácido úsnico y ácido lecanórico, realizado durante los meses de mayo a noviembre del 2016.
- c) Identificación espectroscópica de los compuestos aislados, realizado durante los meses de enero del 2017 y agosto del 2017; y en donde se incluyen:
- i. Análisis e interpretación de los espectros de masas, RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C (obtenidos en los Laboratorios de Investigación de la Universidad de Columbia).
  - ii. Análisis e interpretación de los espectros IR y UV (obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Síntesis de Materiales Avanzados de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería).

## **B. OBJETIVOS DE LA TESIS**

### **1. OBJETIVO GENERAL**

Estudio químico del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.

### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i. Aislar e identificar los principales compuestos liquénicos obtenidos a partir del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.
- ii. Realizar un análisis cualitativo (marcha fitoquímica) de los metabolitos secundarios presentes en el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.
- iii. Determinar cuantitativamente (análisis cuantitativo) el porcentaje del ácido úsnico en el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.

El aislamiento y la identificación de los compuestos liquénicos son los objetivos centrales de este trabajo de investigación. Para lo cual se evaluaron distintos procedimientos para el aislamiento de compuestos liquénicos; así como, al estudio de las técnicas de identificación espectroscópicas.

La ejecución de cada etapa del procedimiento experimental conlleva al trabajo químico de investigación en productos naturales, el cual se rige también para la identificación de otros metabolitos secundarios presentes en un producto natural.

---

## CAPÍTULO II

---

# ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

---

---

## A. CONCEPTOS PREVIOS

### 1. Líquenes

Los organismos conocidos como hongos liquenizados o líquenes, comprenden aproximadamente unas 18 000 especies. Diversos autores coinciden con llamarlos Micoficófitos o Ficomicófitos, nombres que señalan que estos organismos poseen una naturaleza dual formada por una asociación entre un alga y un hongo, cuya relación es del tipo simbiótica (liquenización). Al hongo integrante de esta simbiosis se le denomina micobionte, y en el 98% de los casos pertenece al grupo de los ascomicetes. El micobionte es en la mayor parte de los casos, el encargado de formar la estructura del líquen también llamada talo. El nombre que recibe el líquen designa al micobionte. El alga que entra a formar parte de los líquenes se le denomina fotobionte y realiza la fotosíntesis, produciendo el alimento que además de nutrirla también sustenta al hongo. Las algas que liquenizan pertenecen a diversos grupos de cianobacterias.

Al proceso por el cual se produce la unión simbiótica (Figura 1) entre el micobionte (hongo) y el fotobionte (alga) se denomina liquenización y sucede a través de los siguientes pasos:

- i. Fase de pre-contacto: Estimulación por parte del alga hacia el hongo.
- ii. Fase de contacto: Reconocimiento y aglutinación.
- iii. Fase de la envoltura del alga por parte de las esporas del hongo.
- iv. Fase de incorporación de ambos simbioses (integración)

En la asociación liquénica no importa cuál es el grado de participación de los dos organismos, lo importante es que conduce a la formación de organismos capaces de prosperar en medios muy diversos de la naturaleza, desde los polos hasta los desiertos y desde las costas hasta los bosques tropicales húmedos e inclusive en ambientes donde no podrían vivir por separado cada uno de los constituyentes lo cual representa una gran ventaja en comparación de otros organismos<sup>1,2</sup>.



**Figura 1.** (a) Hongo o micobionte (*Amanita muscaria*); (b) Alga o fotobionte (*Caulerpa taxifolia*); (c) Simbiosis o liquenización; (d) Líquen (*Xanthoria parietina*).

Imagen superior tomada de <https://www.zamnesia.nl/blog-wat-is-amanita-muscaria-n11>

Imagen central tomada de <http://homeaquaria.com/saltwater-algae-control-the-ultimate-guide/>

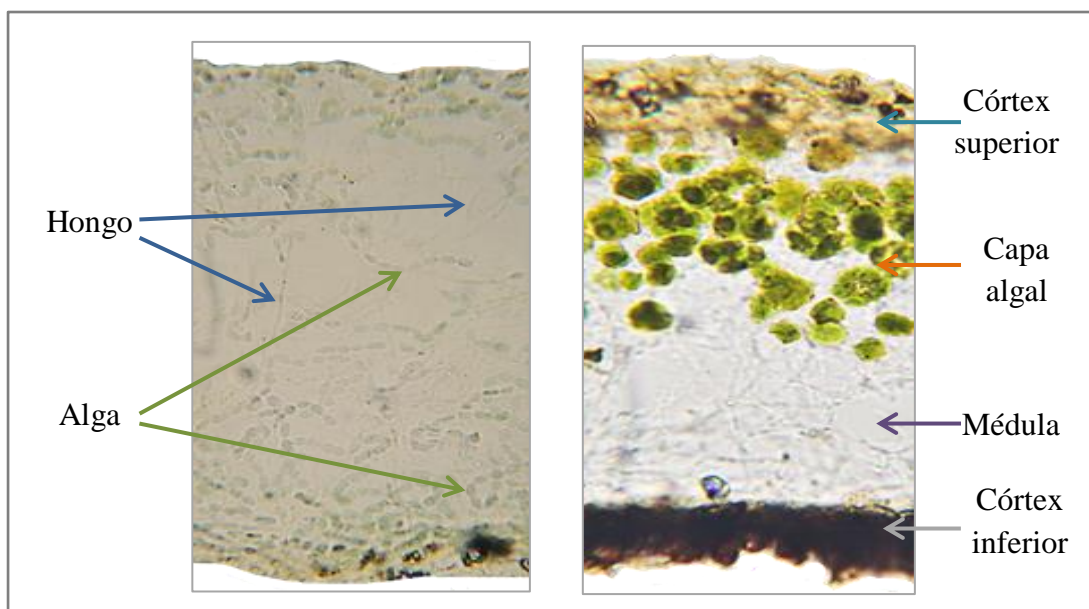
Imagen inferior izquierda tomada de <https://www.asturnatura.com/articulos/hongos/liquenes-micorrizas.php>

Imagen inferior derecha tomada de <http://www.ugr.es/~mcares/Utilidades/liquenes.htm>

En lo que se refiere a la estructura o a la taxonomía de los líquenes estas se basan tradicionalmente en sus características morfológicas y anatómicas. En base a su talo (cuerpo vegetativo del liquen), se presentan dos tipos principales de organización, los cuales son los talos homómeros y heterómeros (Figura 2).

En el talo homómero, la configuración anatómica del alga está distribuida de forma irregular, por lo que no se genera una capa o córtex uniforme de material algal sino que se pueden encontrar células del alga en cualquier zona del talo.

En el talo heterómero, se tienen una secuencia de capas ordenadas. La secuencia de capas dependerá del tipo de liquen, como primera capa se tiene al córtex superior, formado por hifas de paredes engrosadas del hongo. Las hifas son las células alargadas del hongo que forman parte del talo, estas son el resultado de la liquenización. La siguiente capa es la capa algal, formada por hifas que rodean las células del fotobionte (alga). En la zona central o médula, se encuentran sólo hifas del micobionte. De acuerdo al tipo del liquen se tendrá una última capa, llamada córtex inferior, la cual está formada por un conjunto de células engrosadas que limita el talo del liquen con el sustrato (roca, árboles, etc)<sup>1</sup>.



**Figura 2.** Talos liquénicos: izquierda, Talo homómero; derecha, Talo heterómero.



---

En ambos casos, tanto para el talo homómero como heterómero, se encuentran un conjunto de hifas unidas en el córtex inferior que en algunos casos se hunden en el sustrato y son conocidas como ricinas o rizoides.

## 2. Sustratos y Biotipos Liquénicos

Los sustratos líquénicos son el medio donde crecen los líquenes, e influyen sobre las características del líquen de acuerdo con la textura física y la estabilidad, pH, el contenido mineral, la composición química y la capacidad de retención de agua que ofrecen para su desarrollo. Debido a que los líquenes se desarrollan en distintos ecosistemas pueden crecer por consiguiente sobre sustratos muy diversos<sup>3</sup>.







A continuación se describen los tipos de sustratos líquénicos.

- i. Saxícolas (rupestres o rupícolas), donde el sustrato son las rocas o minerales, en este tipo de sustrato se tienen cuatro subgrupos (acorde a la posición en la que se ubican). Estas son: epilíticos (encima del sustrato), endolíticos (dentro del sustrato), calcícolas (en rocas caliza) y calcófilos (en calcopirita).
- ii. Corticícolas o Cortículas, donde el sustrato es la corteza de los árboles, y de acuerdo a su forma de crecimiento, se dividen en dos subgrupos. Estas son: epifleódico (encima de la corteza) y endofleódicos (dentro de la corteza).
- iii. Lignícolas, donde el sustrato es la madera.
- iv. Epifilos, siendo el sustrato las hojas de los árboles.
- v. Zoobiótico, donde el sustrato son huesos.

Otros tipos de sustratos son el cemento, conchas, vidrio, cuero, vitrales, plástico, ropa, ventanas de carros, vallas, techos, paredes entre otros; aunque la mayoría son materiales domésticos o comunes en la ciudad, se ha podido apreciar casos donde los líquenes se desarrollan en estos tipos de sustratos, y por ello el interés de trabajar con los líquenes, debido a que pueden ser considerados como bioindicadores locales.

La Tabla 1, indica algunos ejemplos sobre los tipos de sustratos líquénicos.

**Tabla 1.** Tipos de sustratos liquénicos

| SUSTRATO   | EJEMPLOS   |   |
|--|--|---|
| <b>SAXÍCOLAS</b><br>(Sobre rocas o minerales)                  | <br><i>Umbilicaria calvescens Nyl*</i>      | <br><i>Xanthoria parietina</i>  |
| <b>CORTICÍCOLAS O CORTÍCULAS</b><br>(Sobre corteza de árboles) | <br><i>Parmelia quercina (Willd.) Hale</i> | <br><i>Xanthoria parietina</i> |
| <b>ZOOBIÓTICO</b><br>(Sobre huesos)                            | <br><i>Xanthoria parietina</i>           |   |
| <b>EPIFILOS</b><br>(Sobre hojas)                               | <br><i>Xanthoria parietina</i>           |   |

\*Foto de recolección en Huancayo tomado por J. Ramos (2013)

Imágenes tomadas de <http://www.alcozar.net/florafauna/li011.htm>

Imágenes tomadas de <http://jardin-mundani.blogspot.pe/search?q=Xanthoria+parietina>

---







Otra forma de clasificación es de acuerdo a la morfología de sus talos y a la manera de adherirse al sustrato. Se pueden distinguir 7 biotipos<sup>1</sup>.

A continuación se describen los 7 biotipos liquénicos de acuerdo a su morfología.

- i. Fruticulosos, este biotipo esta adherido al sustrato por una parte muy estrecha y se ramifica similar a un arbusto, creciendo de forma perpendicular a la superficie donde se asientan (firmes) o colgantes (péndulos). Estos talos pueden tener una sección circular caso del género *Úsnea* o planas como el género *Ramalina*.
- ii. Foliáceos, donde el talo es una lámina que crece paralelo al sustrato por lo que son fáciles de retirar del sustrato. Normalmente se unen a la superficie por ricinas. En el caso del que solo se unan por un punto central al sustrato (disco de fijación), se denominan talos umbilicados. Ejemplo: *Xanthoria*, *Umbilicaria*.
- iii. Escamosos, se caracterizan por estar formados por un conjunto de escamas cercanas entre sí, y por presentar un borde no adherido al sustrato. Ejemplo: *Fuscopannaria*.
- iv. Gelatinosos, son aquellos de color negro y aspecto foliáceos o fruticuloso en estado deshidratado, que cuando se hidratan se hinchan siendo blandos al tacto. Un ejemplo de este tipo de liquen es el género *Collema*.
- v. Filamentosos, los cuales están constituidos por una maraña de filamentos finos y de aspecto lanoso, son muy parecidos al fruticuloso. Ejemplo: *Cystocoleus*, *Racodium*.
- vi. Crustáceos, son líquenes que crecen muy despacio, están muy ligados al sustrato (roca, corteza de árbol o tierra), por lo que son muy difíciles de recolectar. Ejemplo: *Lecidea abromunnea*.
- vii. Compuestos, son aquellos líquenes constituidos por dos tipos diferentes de talo, uno primario generalmente escamoso y otro secundario fruticuloso. Este tipo de talo es característico de las especies del género *Cladonia*.

La Tabla 2, indica los 7 biotipos liquénicos según su forma de crecimiento mencionados anteriormente.

**Tabla 2.** Biotipos liquénicos según su forma de crecimiento

| <b>BIOTIPO</b>      | <b>EJEMPLOS</b>  | <b>LIQUEN</b>  |
|---------------------|--|--|
| <b>FRUTICULOSOS</b> |    | <i>Everniastrum<br/>cirrhatu</i>                         |
| <b>FOLIÁCEOS</b>    |    | <i>Pseudocyphellaria<br/>aurata (Ach.)<br/>Vainio</i>    |
| <b>ESCAMOSOS</b>    |   | <i>Normandina<br/>pulchella (Borrer)<br/>Nyl.</i>        |
| <b>GELATINOSOS</b>  |  | <i>Leptogium<br/>phyllocarpum (Pers.)<br/>Mont.</i>      |
| <b>FILAMENTOSOS</b> |  | <i>Coenogonium<br/>linkii</i>                            |
| <b>CRUSTÁCEOS</b>   |  | <i>Chrysothrix<br/>chlorina</i>                          |
| <b>COMPUESTOS</b>   |  | <i>Dibaeis<br/>absoluta (Tuck.)<br/>Kalb &amp; Gierl</i> |

Imágenes tomadas de <http://lichenportal.org/portal/index.php>

Imágenes tomadas de <http://www.inbio.ac.cr/papers/liquenes/crecimiento.html>



### 3. Usos e importancia de los líquenes

Tradicionalmente los líquenes son usados como fuente de alimento, como medicina, como tintes y perfumes. Sin embargo, algunos de estos líquenes producen reacciones alérgicas, como dermatitis, al tener contacto con ellos. En la actualidad los líquenes se utilizan en perfumería y en la industria farmacéutica, que busca sobre todo nuevas moléculas orgánicas con propiedades antibacterianas y anticancerígenas.

El uso medicinal se debe a su efectividad en el tratamiento de catarrros, gripes, hemorragias y hematomas. Así también, presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianos, estudiados en las especies *Umbilicaria polyphyla* y *Umbilicaria esculenta*. En China, Corea y Japón, el liquen *Umbilicaria esculenta* es considerada un manjar que se consume en sopas o en ensaladas, por su alto contenido proteico. En la región del Himalaya los hombres utilizan la especie *Lobaria pulmonaria* para el tratamiento de hemorragias, tuberculosis y asma<sup>4</sup>.

En perfumería las especies más utilizadas son *Pseudevernia furfurácea* y *Evernia prunastri*, que tienen la propiedad de fijar las esencias. Otro campo de aplicación es la de tintes naturales, los cuales no dañan las fibras del material y más bien protegen contra la acción de microorganismos e insectos, de modo que los tejidos no se apolillan y tardan mucho en degradarse. Cabe señalar que algunos líquenes se han usado como potentes venenos, es el caso de *Letharia vulpina*, ubicada en zonas frías, cuya acción venenosa se debe al ácido vulpínico<sup>5</sup>.

De ciertas especies liquénicas se obtiene el tornasol, empleados en laboratorios como indicador de pH; y algunas especies como *Lobaria pulmonaria*, se usan como sustituto del lúpulo en la fabricación de cerveza.

Algunos líquenes tienen como fotobionte una especie de cianobacterias (alga verde azul) que atrapan nitrógeno de la atmósfera y así contribuyen al ciclo del nitrógeno en los ecosistemas, el cual facilita el crecimiento y la floración de las plantas. Asimismo, los líquenes son muy sensibles a la contaminación ambiental, por tal motivo son empleados como bioindicadores; la mayoría de las especies liquénicas

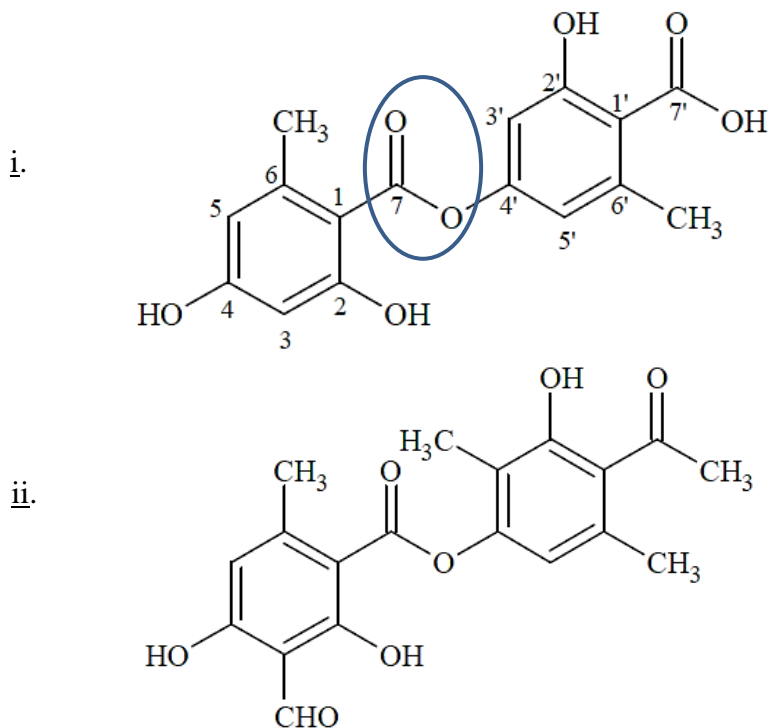
son altamente sensibles al dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno y al ozono, por lo que la presencia de estos tóxicos puede llevar a la erradicación de los líquenes<sup>3</sup>.

#### 4. Compuestos Liquénicos

Los líquenes contienen compuestos líquénicos, que son productos naturales sintetizados única y exclusivamente por los líquenes. Estos se clasifican de acuerdo a su estructura en cuatro grupos, conocidos como: dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos<sup>6,7</sup>.

##### a. Dépsidos (Figura 3)

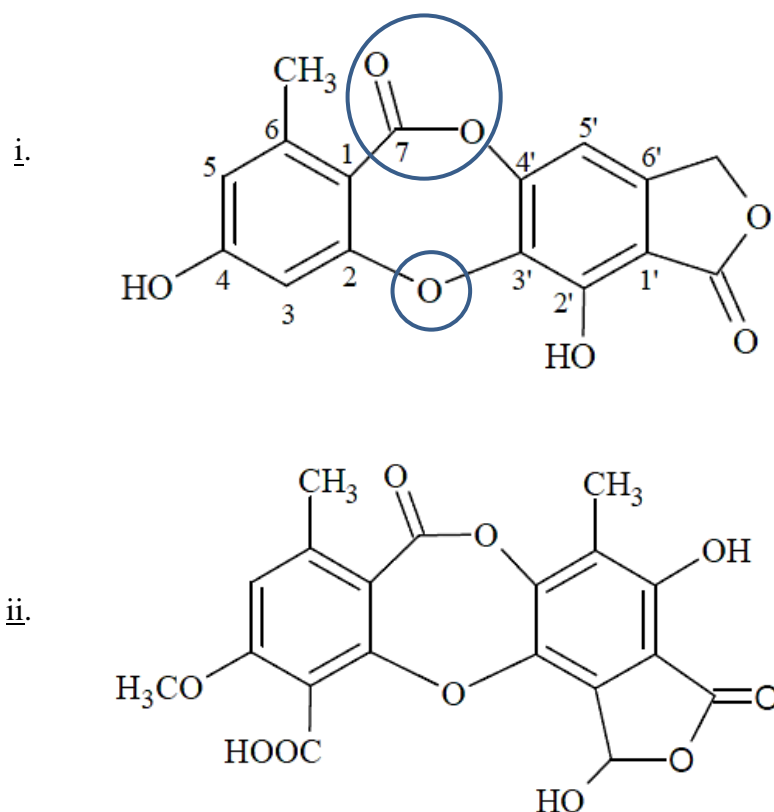
Son compuestos que presentan en su estructura dos o más unidades aromáticas unidas por un enlace éster y presentan propiedades antibióticas, antivirales, antioxidantes y antiinflamatorias. En este grupo se encuentran el ácido lecanórico (Figura 3, i.) y la atranorina (Figura 3, ii.)<sup>8</sup>.



**Figura 3.** Dépsidos: i. ácido lecanórico; ii. atranorina.

### b. Depsidonas (Figura 4)

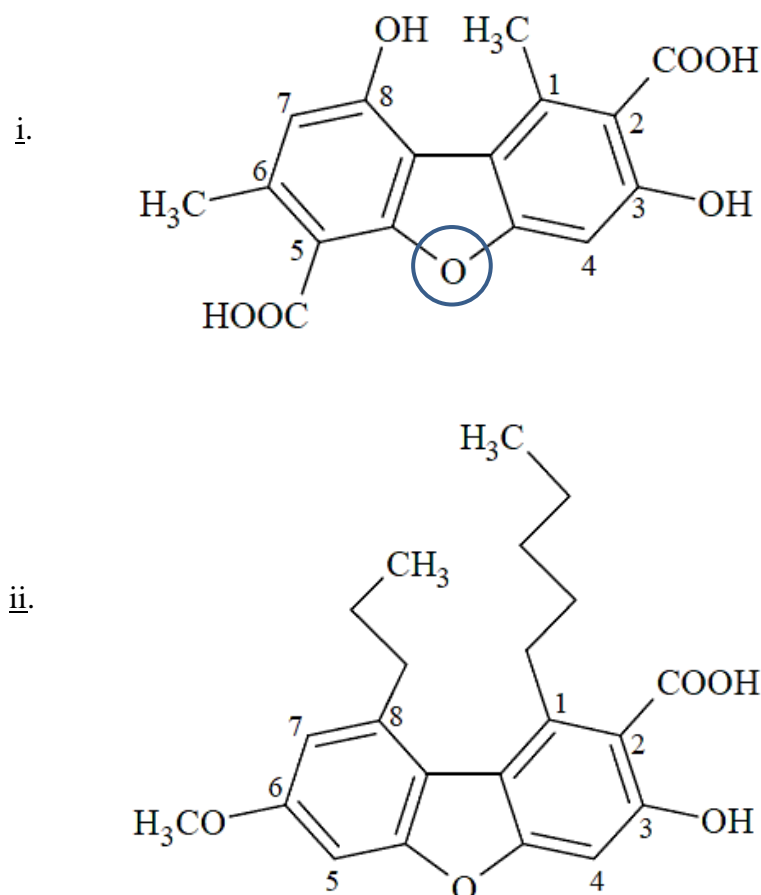
Son compuestos que presentan en su estructura dos núcleos bencénicos que están unidos entre sí por puentes del tipo éster y éter. En este grupo se encuentran el ácido variolárico (Figura 4, i.) y el ácido estético (Figura 4, ii.)<sup>9</sup>.



**Figura 4.** Depsidonas: i. ácido variolárico; ii. ácido estético.

### c. Dibenzofuranos (Figura 5)

Los dibenzofuranos presentan un enlace carbono-carbono y un enlace éter entre dos unidades fenólicas. Se pueden dividir en dos grupos: un grupo incluye los compuestos que tienen un grupo carboxilo en la posición 5 del primer anillo, como el ácido panárico (Figura 5, i.) y el otro grupo en el que el carboxilo no está en dicha posición, como en el ácido didímico (Figura 5, ii.)<sup>10</sup>.



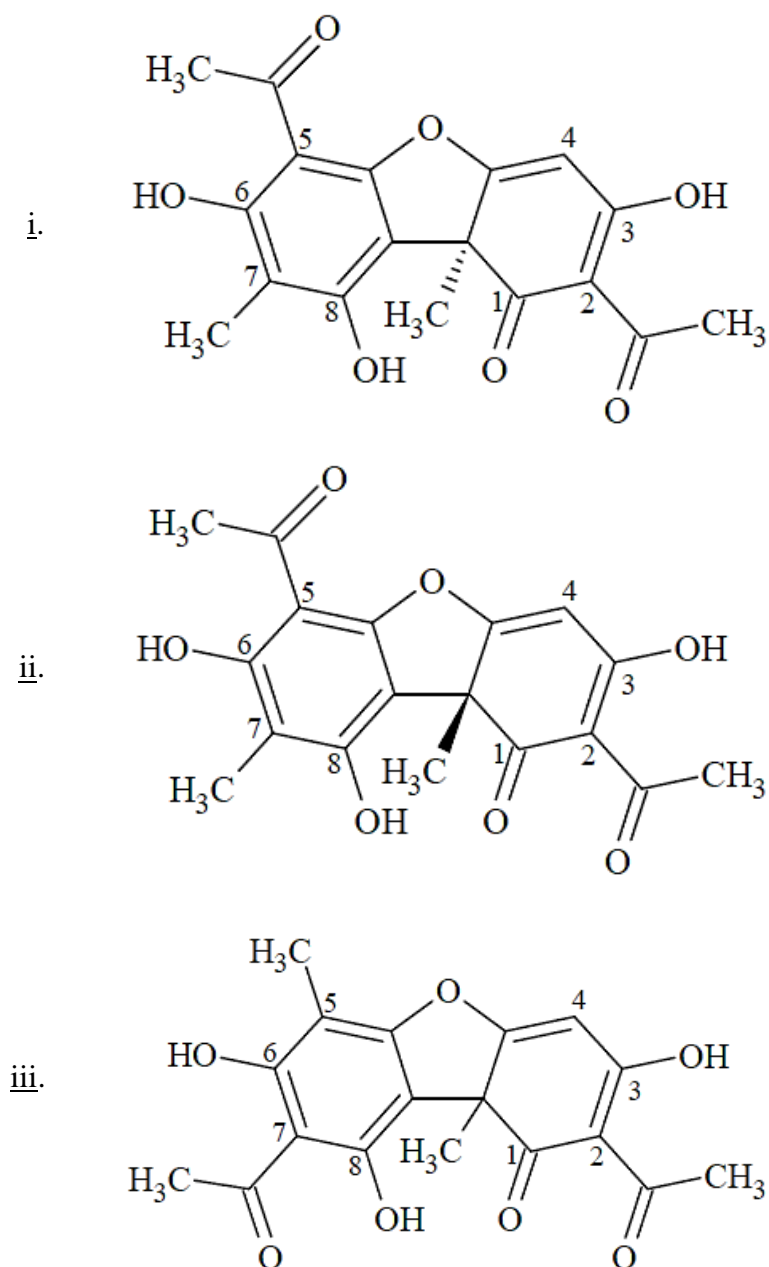
**Figura 5.** Dibenzofuranos: i. ácido panárico; ii. ácido didímico.

#### d. Ácidos Úsnicos (Figura 6)

El compuesto liquénico más conocido es el ácido úsnico, aislado por primera vez en 1934 a partir de *Ramalina calicaris*, *Usnea barbata* y de otras especies liquénicas. Presenta dos formas isoméricas: (-) ácido úsnico  $[\alpha]_D^{20} - 495^\circ$  (Figura 6, i.) y (+) ácido úsnico  $[\alpha]_D^{20} + 495^\circ$  (Figura 6, ii.)<sup>11</sup>.

La característica principal de los compuestos de este grupo es que presentan diversas acciones biológicas; en el caso del ácido úsnico presenta actividad antimicrobial, antiinflamatoria y antiviral. En este grupo se encuentran el ácido úsnico y el ácido isoúsnico (Figura 6, iii.).





**Figura 6.** Ácidos úsnicos: i. (-) ácido úsnico; ii. (+) ácido úsnico; iii. ácido isoúsnico.

En resumen, los líquenes se caracterizan por sus peculiares constituyentes aromáticos cristalinos que se acumulan sobre la superficie externa de las hifas (zona interna del líquen) y en algunos casos en el córtex (zona sujeta al suelo) del líquen. La concentración de estos compuestos liquénicos son ampliamente influenciados por las condiciones climáticas, el sustrato al que se adhieren y la intensidad de iluminación que reciben<sup>12</sup>.

---

## 5. Usos e importancia de los compuestos liquénicos

### a. Ácido Úsnico

Los líquenes que contienen ácido úsnico han sido utilizados tradicionalmente como fármacos: muchas especies liquénicas de *Cladonia* en el tratamiento de la tuberculosis pulmonar; las especies de *Usnea* se han utilizado en Asia, África y Europa para el alivio del dolor y control de la fiebre; la *U. barbata* para tratar problemas urinarios y como una fuente de ácido úsnico en preparados farmacéuticos y cosméticos; la *U. longissima* para la cicatrización de heridas y como expectorante; y la *Ramalina thausta* se utilizó en Finlandia para el tratamiento de heridas, pie de atleta u otras afecciones de la piel, y por vía oral para tratar el dolor de garganta y dolor de muelas<sup>13</sup>.

Se han realizado estudios sobre las diferentes actividades del ácido úsnico. Para la actividad antiinflamatoria se analizó la acción del ácido úsnico en ratones comparada a la acción del ibuprofeno (misma dosis en otro grupo de ratones) obteniéndose resultados positivos del primer grupo (Vijayakumar, 2000)<sup>14</sup>. La actividad antimicótica fue analizada mediante el tratamiento con la sal de ácido úsnico a 65 pacientes con *tinea pedis*, los cuales mostraron una mejoría significativa en su condición clínica (De Battisti, 1991)<sup>15</sup>. El efecto inhibitorio del ácido úsnico fue estudiado contra el protozoo patógeno *Trichomonas* (Wu, 1995)<sup>16</sup> y de igual forma se obtuvo resultados satisfactorios del compuesto sobre la eliminación del parásito (Fournier, 1997)<sup>17</sup>. Para la quimio-prevención del cáncer, el (+)-ácido úsnico aislado del *Usnea*, fue significativamente eficaz contra el tumor inducido por el virus *Epstein-Barr* (Yamamoto, 1995)<sup>18</sup>. De igual forma el (+)-ácido úsnico también inhibió los efectos citopáticos del Herpes simple tipo 1 y virus de la polio del tipo 1 en las células infectadas del riñón de un mono africano (Perry, 1999)<sup>19</sup>. Asimismo, el (+)-ácido úsnico causó una inhibición moderada en el ensayo de la leucemia murina, y también exhibió actividad citotóxica contra sus células cultivadas, comprobándose así su actividad antiviral y antiproliferativa (Takai, 1979)<sup>20</sup>.

---

## b. Ácido Lecanórico

Otro compuesto liquénico de gran importancia es el ácido lecanórico, sin embargo, a comparación del ácido úsnico existen menos estudios sobre las actividades biológicas del ácido lecanórico y sus derivados. Algunos de estos estudios evidencia su actividad antioxidante, actividad fungi-toxica y actividad antimicrobiana. Para la actividad antioxidante se realizó un ensayo del contenido de radical libre en los extractos de acetona y metanol de los líquenes *Umbilicaria antarctica*, *Cetraria aculeata*, *Cladonia furcata*, *Usnea antarctica*, *Stereocaulom alpinum*, *Pseudephebe pubescens*, *Sphaerophorus globosus* y *Usnea aurantiacoatra*, los resultados indicaron al ácido lecanórico como causante de esta actividad, siendo el extracto acetónico el de mayor actividad antioxidante (Heng Luo, 2009)<sup>21</sup>. Para la actividad fungi-tóxica se estudió el comportamiento del ácido lecanórico (aislado del líquen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale) frente al hongo *Cladosporium sphaerospermum*, para lo cual se trabajó en concentraciones de 50, 25, 10, 5 y 1 µg (siempre en 25 µL de acetona) del compuesto liquénico con una concentración de  $4.87 \times 10^7$  esporas/mL del hongo, observándose su efecto inhibitorio (Gomes, 2002)<sup>22</sup>. Para la actividad antimicrobiana se estudió el ácido lecanórico (aislado del *Ochrolechia androgyna*) frente a bacterias como *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloaceae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor mucedo*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium purpurescens*, *Penicillium verrucosum* y *Trichoderma harsianum*; observándose que a concentraciones de 0.062 mg/ mL del ácido lecanórico se lograba la inhibición de la mayoría de las bacterias (Rankovic & Misic, 2008)<sup>23</sup>.

## **B. ESTUDIOS QUÍMICOS PRECEDENTES RELATIVOS AL LÍQUEN *Umbilicaria calvescens* Nyl.**

En la revisión bibliográfica realizada en los bancos de datos (hasta agosto del 2017) no se ha encontrado ninguna publicación relativa al análisis fitoquímico, análisis cuantitativo ni al aislamiento de compuestos en el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl., por lo que esta tesis constituye el primer estudio químico de este líquen.

### **1. Composición Química del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.**

#### **a. Análisis preliminar (Marcha fitoquímica) y principales grupos liquénicos presentes en el líquen**

El análisis preliminar o marcha fitoquímica se refiere a la determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en una muestra vegetal o en cualquier organismo vivo, en base a la extracción con solventes adecuados del material en estudio e identificando el tipo de producto natural mediante reacciones de coloración y/o precipitación.

El análisis de los principales grupos liquénicos (dépsido, depsidona, dibenzofurano y ácidos úsnicos) también sigue un procedimiento cualitativo, debido a que se realiza un test de coloración para identificar los posibles compuestos liquénicos a partir del extracto acetónico del líquen. Este test de coloración también es empleado en el estudio botánico de líquenes, pues se emplea para analizar y comparar los compuestos liquénicos en diferentes partes del líquen (corteza, talo, apotecio).

En la bibliografía revisada, no se ha encontrado ningún trabajo relativo al análisis preliminar (marcha fitoquímica) ni al análisis de los compuestos liquénicos (test de coloración) en el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.

## **b. Análisis cuantitativo del ácido úsnico**

El ácido úsnico es el metabolito más común presente en los líquenes y por ende el primero en ser cuantificado. Por ello, Castro (2010)<sup>24</sup> realizó la cuantificación del ácido úsnico en distintas especies liquénicas mediante la espectrometría UV (ver Sección C, 1.c., Pág. 50).

En la bibliografía revisada, no se ha reportado el porcentaje de ácido úsnico en la especie liquénica *Umbilicaria calvescens* Nyl., material de estudio en esta tesis.

## **2. Aislamiento de compuestos liquénicos en el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.**

Como hemos referido, no se han reportado estudios sobre el aislamiento de compuestos liquénicos en el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. Sin embargo, se han encontrado procedimientos para el aislamiento de compuestos liquénicos como el ácido úsnico, el ácido porfirílico, entre otros, en otras especies liquénicas, y en la Sección C, 2. (Pág. 52), se presentarán estos procedimientos, los cuales han servido de base para la realización de este trabajo de investigación.

## **3. Identificación clásica del ácido úsnico y ácido lecanórico**

### **3.1. Ácido Úsnico**

#### **a. Características físicas**

- i. Cristales amarillos (Huneck & Yoshimura, 1996)<sup>25</sup>
- ii. Sólido de color amarillo en forma de agujas (Cóndor, 2012)<sup>11</sup>

#### **b. Punto de fusión**

- i. 203°C (Huneck & Yoshimura, 1996)<sup>25</sup>
- ii. 204 - 205°C (Castro, 2004)<sup>6</sup> y (Cóndor, 2012)<sup>11</sup>

---

**c. Comportamiento cromatográfico: Cromatografía en Capa Fina - CCF (Castro, 2004)<sup>6</sup>**

- i. Adsorbente: Kieselgel G, placa de 0.25mm de espesor
- ii. Eluente: EtOH: Acetona (1:1)
- iii. Revelador: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en MeOH (10%)
- iv. Rf: 0.63

**3.2.Ácido Lecanórico**

**a. Características físicas**

- i. Sólido blanco (Huneck & Yoshimura, 1996)<sup>25</sup>
- ii. Sólido blanco en forma de escamas (Martino, 2015)<sup>26</sup>

**b. Punto de fusión**

- i. 184°C (Huneck & Yoshimura, 1996)<sup>25</sup>
- ii. 172 - 174°C (Jayaprakasha, 1998)<sup>27</sup>
- iii. 181 - 183°C (Martino, 2015)<sup>26</sup>

**c. Comportamiento cromatográfico: Cromatografía en Placa Preparativa - CPP (Jayaprakasha, 1998)<sup>27</sup>**

- i. Adsorbente: Sílica Gel, placa de 20x20 cm y 0.25mm de espesor
- ii. Revelador: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en MeOH (10%)
- iii. Eluente-1: Hexano: Acetato de etilo (80:20); Rf = 0.30
- iv. Eluente-2: Cloroformo: Metanol (98:2); Rf = 0.23
- v. Eluente-3: Benceno: Etanoato de etilo (95:5); Rf = 0.27

#### 4. Identificación espectroscópica del ácido úsnico y ácido lecanórico

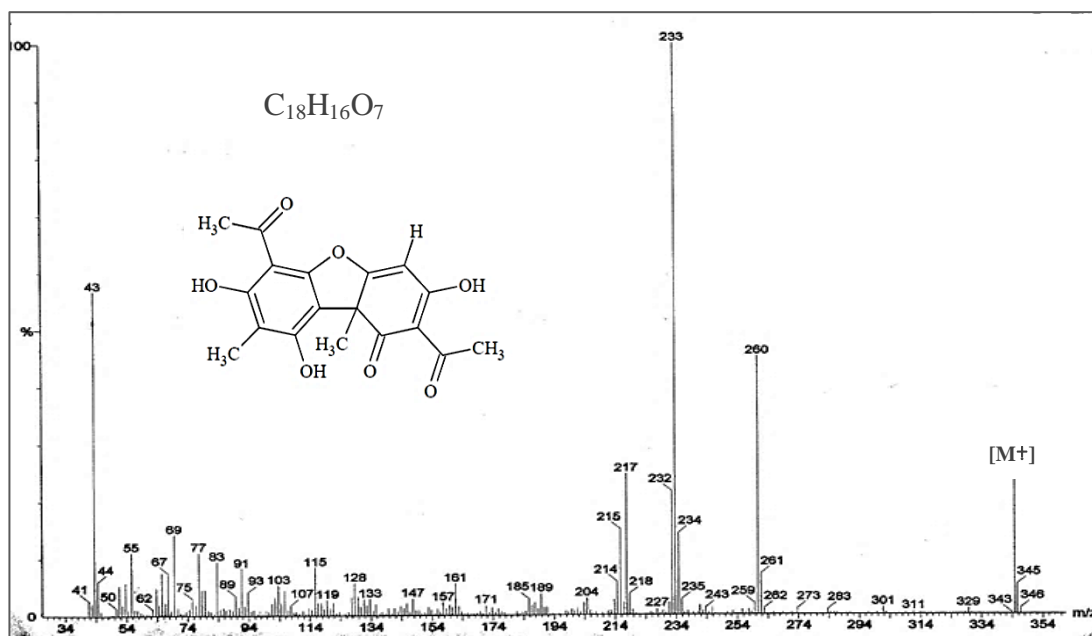
En la Sección C, 3. (Identificación espectroscópica de compuestos orgánicos, Pág. 55) se indicarán los fundamentos teóricos y aspectos generales de las principales técnicas espectroscópicas (EM, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, IR y UV), las cuales fueron empleadas para la caracterización del ácido úsnico y ácido lecanórico.

##### 4.1. Ácido Úsnico

###### a. Espectros de Masas, EM

###### i. Cóndor - 2012<sup>11</sup>

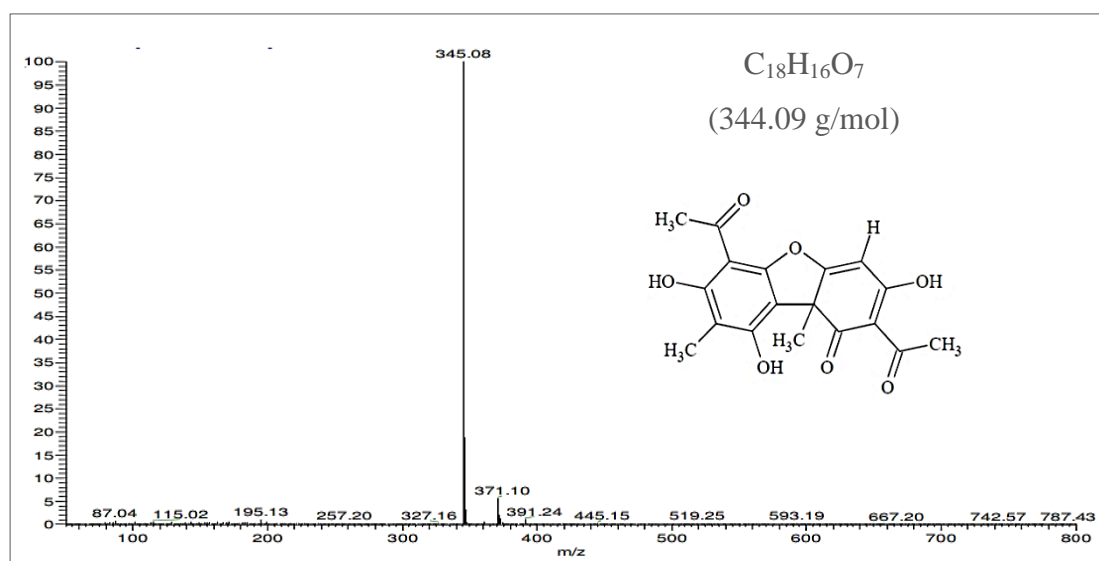
En la Figura 7 se observa el espectro de masas del ácido úsnico aislado del líquen *Xanthoparmelia tasmanica*, obtenido mediante la técnica de impacto de electrones (EI), y cuyos principales fragmentos iónicos son: 344 [M<sup>+</sup>], 260 (45%), 233 (100%), 217 (25%).



**Figura 7.** Espectro de masas (EI) del ácido úsnico obtenido del líquen *Xanthoparmelia tasmanica* (Cóndor, 2012)<sup>11</sup>.

## ii. Viteri - 2015<sup>28</sup>

Viteri (2015) proporciona el espectro de masas del ácido úsnico aislado del líquen *Usnea antarctica*, ver Figura 8, mediante la técnica ESI (Electron Spray Ionization), y en donde se exhibió un ión molecular  $[M+H]^+$  a 345.08 m/z, que correspondería a la fórmula molecular  $C_{18}H_{16}O_7$  (344.09 g/mol).



**Figura 8.** Espectro de masas (ESI) del ácido úsnico obtenido del líquen *Usnea antarctica* (Viteri, 2015)<sup>28</sup>.

## iii. Comparación de espectros de masas

En el primer caso, Córdor (2012) utiliza una fuente de ionización por impacto electrónico (EI), el cual es una técnica dura (voltaje de 70 eV) por lo que induce a una extensiva fragmentación; además, proporciona picos con valores verdaderos de masas, en este caso a 344 m/z que corresponde al peso molecular del compuesto.

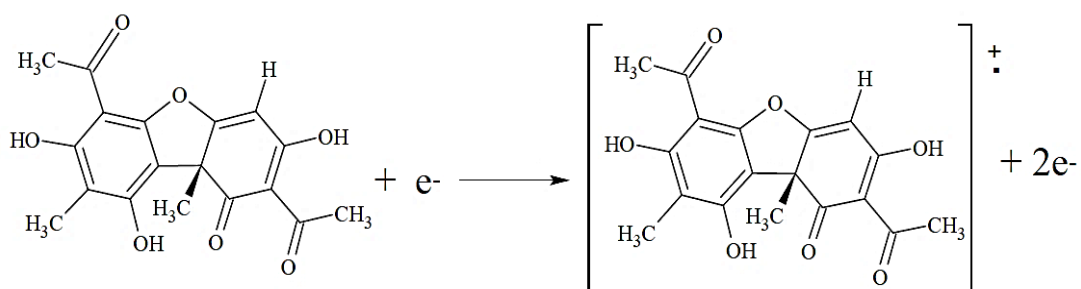
Por otro lado, Viteri (2015) utiliza la técnica ESI, el cual es más suave; es decir, no se evidenciará demasiadas fragmentaciones; asimismo, el espectro proporciona un pico M+1 de mayor intensidad, debido a la reacción que se tiene con el gas reactivo. En este tipo de espectro la información que se presenta es el peso molecular del compuesto, el cual se obtiene luego de restar (ión positivo) el portador de carga.



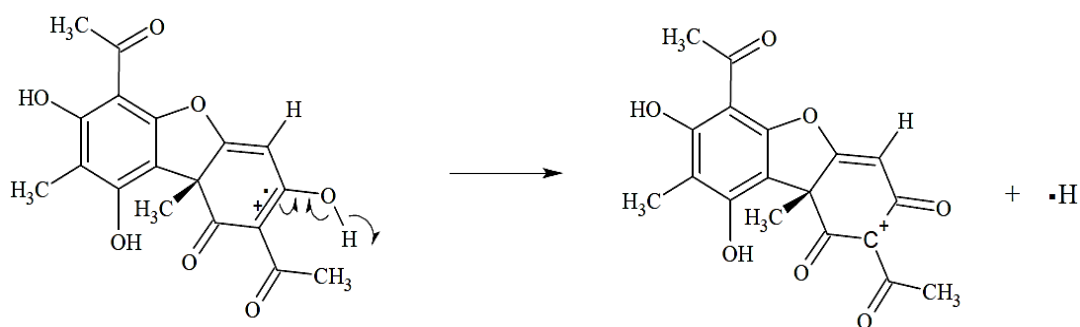
#### iv. Ecuaciones de fragmentación

A continuación se presenta las fragmentaciones de los principales picos en el EM del ácido úsnico.

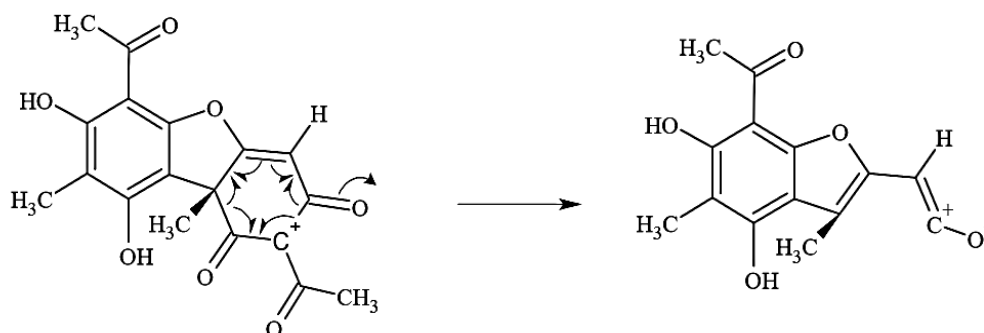
$M^+$  344



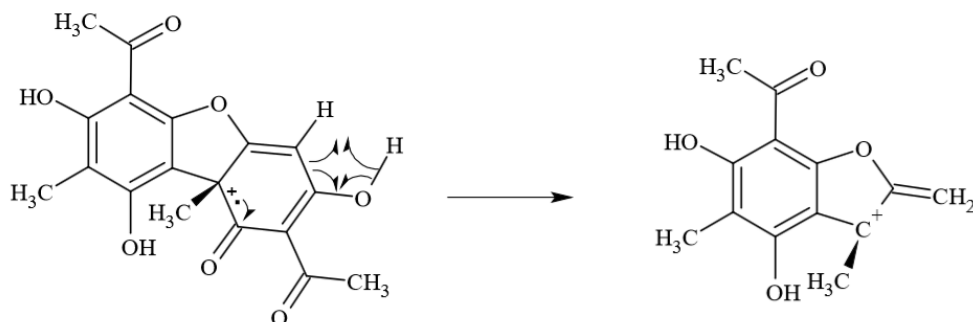
$m/z$  343



$m/z$  260



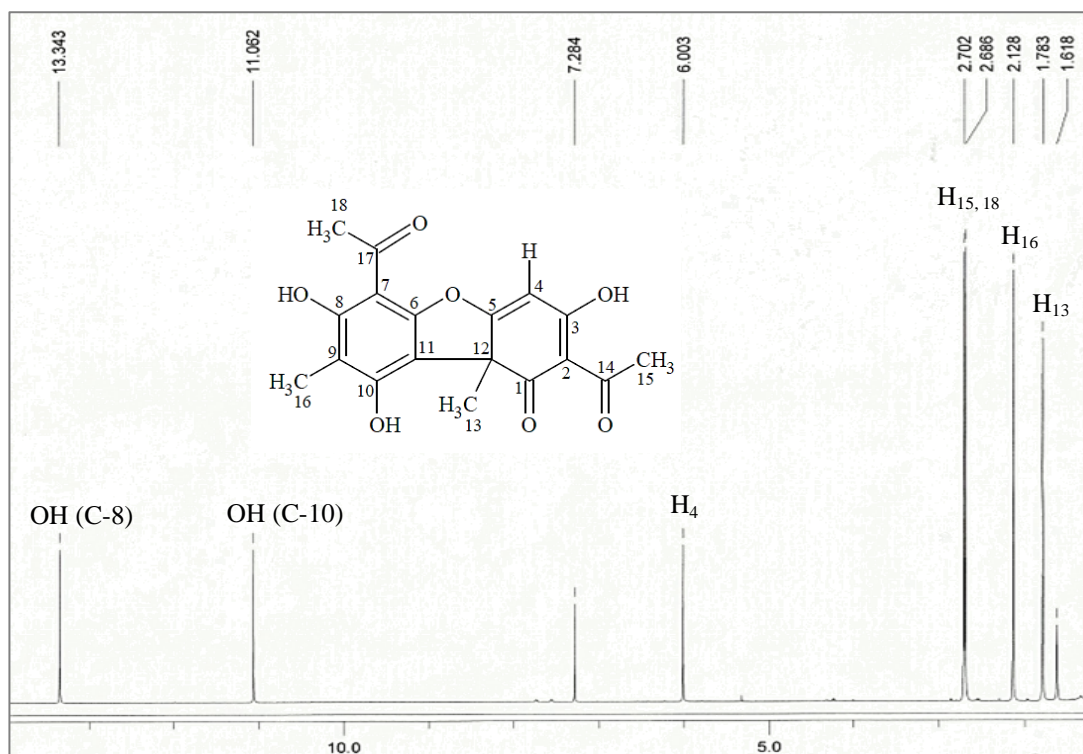
m/z 233



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

### i. Córdor - 2012<sup>11</sup>

En la Figura 9 se observa el espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido úsnico (aislado del líquen *Xanthoparmelia tasmanica*), en CDCl<sub>3</sub>, los cuales se presentan en la Tabla 3.

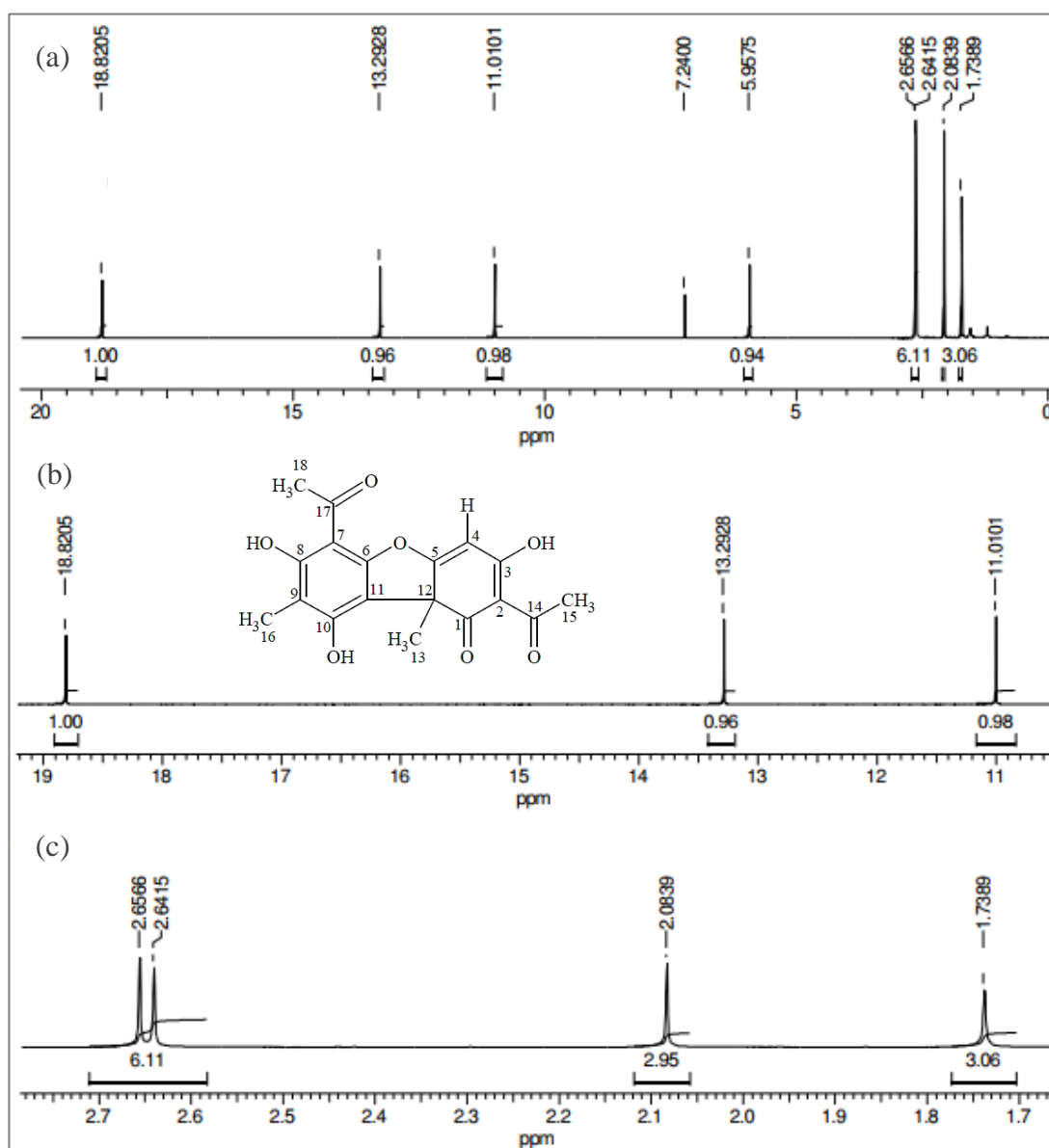


**Figura 9.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del ácido úsnico obtenido del líquen *Xanthoparmelia tasmanica* (Córdor, 2012)<sup>11</sup>.

## ii. Viteri - 2015<sup>28</sup>

Proporciona el espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido úsnico (aislado del líquen *Usnea antarctica*), en CDCl<sub>3</sub> (Figura 10).

$\delta$  (ppm): 1.74 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.64 (s, 3H), 2.66 (s, 3H), 5.96 (s, 1H), 7.24 (CDCl<sub>3</sub>), 11.01 (s, 1H), 13.29 (s, 1H), 18.82 (s, 1H).



**Figura 10.** (a) Espectro de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del ácido úsnico aislado del *Usnea antarctica*; ampliación a (b) campo bajo y (c) campo alto (Viteri, 2015)<sup>28</sup>.

### iii. Comparación de los espectros de RMN<sup>1</sup>H

En la Tabla 3 se resumen los resultados obtenidos de las referencias y los valores obtenidos para el espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido úsnico aislado del líquen *U. calvescens*, en CDCl<sub>3</sub> (el cual se presenta en el Capítulo III, Sec. 8, Pág. 97). De estos resultados se observa la correspondencia que existe entre los valores obtenidos y los publicados en la bibliografía.

**Tabla 3.** Datos comparativos del espectro de RMN<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) del ácido úsnico

| POSICIÓN                 | Cóndor (2012) <sup>11</sup>                     | Viteri (2015) <sup>28</sup>                     | Tesis Ramos<br>(Compuesto U)                    |
|--------------------------|---|---|---|
|                          | Tipo de H, Integración,<br>δ <sub>H</sub> (ppm) | Tipo de H, Integración,<br>δ <sub>H</sub> (ppm) | Tipo de H, Integración,<br>δ <sub>H</sub> (ppm) |
| C-3 (-OH)                | -   | s, 1H, 18.82                                    | s, 1H, 18.86                                    |
| C-4 (Ar-H)               | s, 1H, 6.00                                     | s, 1H, 5.96                                     | s, 1H, 6.00                                     |
| C-8 (-OH)                | s, 1H, 13.34                                    | s, 1H, 13.29                                    | s, 1H, 13.34                                    |
| C-10 (-OH)               | s, 1H, 11.06                                    | s, 1H, 11.01                                    | s, 1H, 11.05                                    |
| C-13 (-CH <sub>3</sub> ) | s, 3H, 1.78                                     | s, 3H, 1.74                                     | s, 3H, 1.79                                     |
| C-15 (-CH <sub>3</sub> ) | s, 3H, 2.68                                     | s, 3H, 2.64                                     | s, 3H, 2.69                                     |
| C-16 (-CH <sub>3</sub> ) | s, 3H, 2.12                                     | s, 3H, 2.08                                     | s, 3H, 2.13                                     |
| C-18 (-CH <sub>3</sub> ) | s, 3H, 2.70                                     | s, 3H, 2.66                                     | s, 3H, 2.70                                     |

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

#### i. Huneck & Yoshimura - 1996<sup>25</sup>

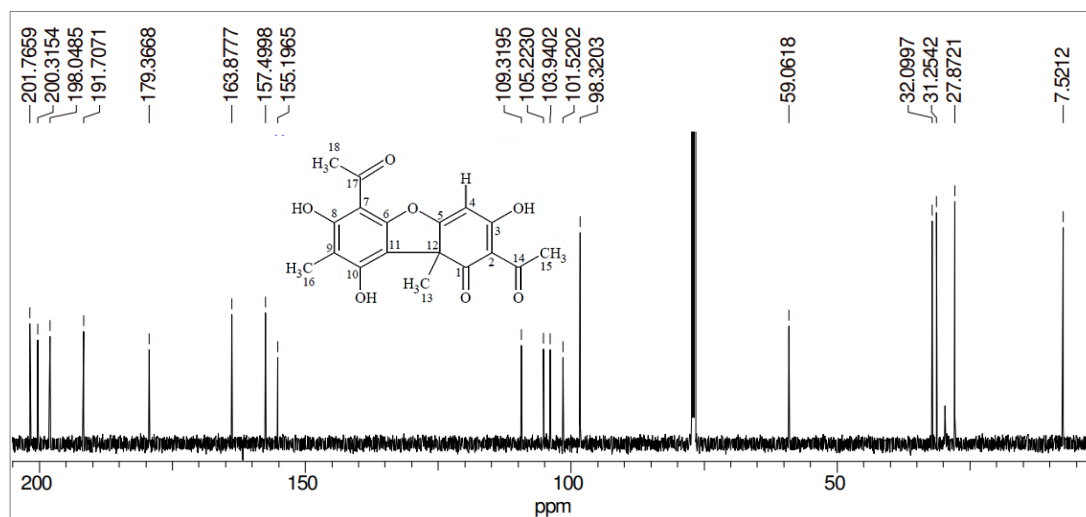
Proporciona los desplazamientos químicos de RMN<sup>13</sup>C de protones desacoplado para el ácido úsico (aislado del líquen *Evernia prumastri* (L). Ach.), en CDCl<sub>3</sub>.

δ (ppm): 7.7 (C-16), 27.4 (C-13), 30.9 (C-18), 32.0 (C-15), 59.2 (C-12), 98.3 (C-4), 101.7 (C-5), 104.2 (C-9), 105.4 (C-11), 109.5 (C-7), 155.1 (C-3), 157.6 (C-8), 164.1 (C-10), 179.4 (C-2), 191.7 (C-6), 198.2 (C-1), 200.1 (C-14), 201.3 (C-17).

#### ii. Viteri - 2015<sup>28</sup>

En la Figura 11 se observa el espectro de RMN<sup>13</sup>C de protones desacoplado para el ácido úsico (aislado del líquen *Usnea antarctica*), en CDCl<sub>3</sub>.

δ (ppm): 7.52 (C-16), 27.87 (C-13), 31.25 (C-18), 32.09 (C-15), 59.09 (C-12), 98.32 (C-4), 101.52 (C-5), 103.94 (C-9), 105.22 (C-11), 109.31 (C-7), 155.19 (C-3), 157.5 (C-8), 163.88 (C-10), 179.37 (C-2), 191.71 (C-6), 198.05 (C-1), 200.32 (C-14), 201.77 (C-17).



**Figura 11.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del ácido úsico obtenido del líquen *Usnea antarctica* (Viteri, 2015)<sup>28</sup>.

### iii. Comparación de los espectros de RMN<sup>13</sup>C

En la Tabla 4 se resumen los desplazamientos químicos obtenidos de las referencias citadas y los valores obtenidos para el espectro de RMN<sup>13</sup>C del ácido úsnico aislado del líquen *U. calvescens*, en CDCl<sub>3</sub> (el cual se presenta en el Capítulo III, Sec. 8, Pág. 100). De estos resultados se observa la correspondencia que existe entre los valores obtenidos y los publicados en la bibliografía.

**Tabla 4.** Datos comparativos del espectro de RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) del ácido úsnico

| N° Carbono  | Huneck & Yoshimura<br>(1996) <sup>25</sup> | Viteri (2015) <sup>28</sup> | Tesis Ramos<br>(Compuesto U) |
|-------------|--|-----------------------------|------------------------------|
|             | δ (ppm)                                    | δ (ppm)                     | δ (ppm)                      |
| <b>C-1</b>  | 198.2                                      | 198.05                      | 198.07                       |
| <b>C-2</b>  | 179.4                                      | 179.37                      | 179.40                       |
| <b>C-3</b>  | 155.1                                      | 155.19                      | 155.22                       |
| <b>C-4</b>  | 98.3                                       | 98.32                       | 98.35                        |
| <b>C-5</b>  | 101.7                                      | 101.52                      | 101.55                       |
| <b>C-6</b>  | 191.7                                      | 191.71                      | 191.73                       |
| <b>C-7</b>  | 109.5                                      | 109.31                      | 109.35                       |
| <b>C-8</b>  | 157.6                                      | 157.50                      | 157.52                       |
| <b>C-9</b>  | 104.2                                      | 103.94                      | 103.96                       |
| <b>C-10</b> | 164.1                                      | 163.88                      | 163.91                       |
| <b>C-11</b> | 105.4                                      | 105.22                      | 105.25                       |
| <b>C-12</b> | 59.2                                       | 59.09                       | 59.09                        |
| <b>C-13</b> | 27.4                                       | 27.87                       | 27.91                        |
| <b>C-14</b> | 200.1                                      | 200.32                      | 200.34                       |
| <b>C-15</b> | 32.0                                       | 32.09                       | 32.13                        |
| <b>C-16</b> | 7.7  | 7.52                        | 7.55                         |
| <b>C-17</b> | 201.3                                      | 201.77                      | 201.79                       |
| <b>C-18</b> | 30.9                                       | 31.25                       | 31.29                        |

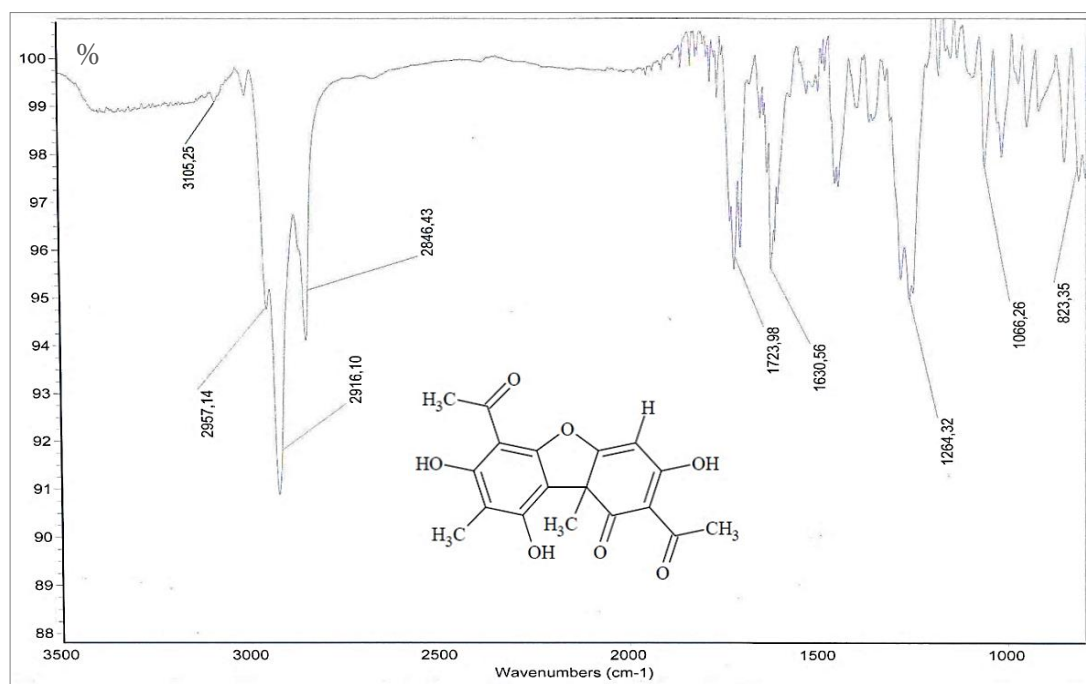
#### d. Espectro Infrarrojo, IR

##### i. Cóndor - 2012<sup>11</sup>

Reporta cinco bandas características en el espectro IR del ácido úsnico (aislado del liquen *Xanthoparmelia tasmanica*), los cuales se presentan en la Tabla 5.

##### ii. Martino - 2015<sup>26</sup>

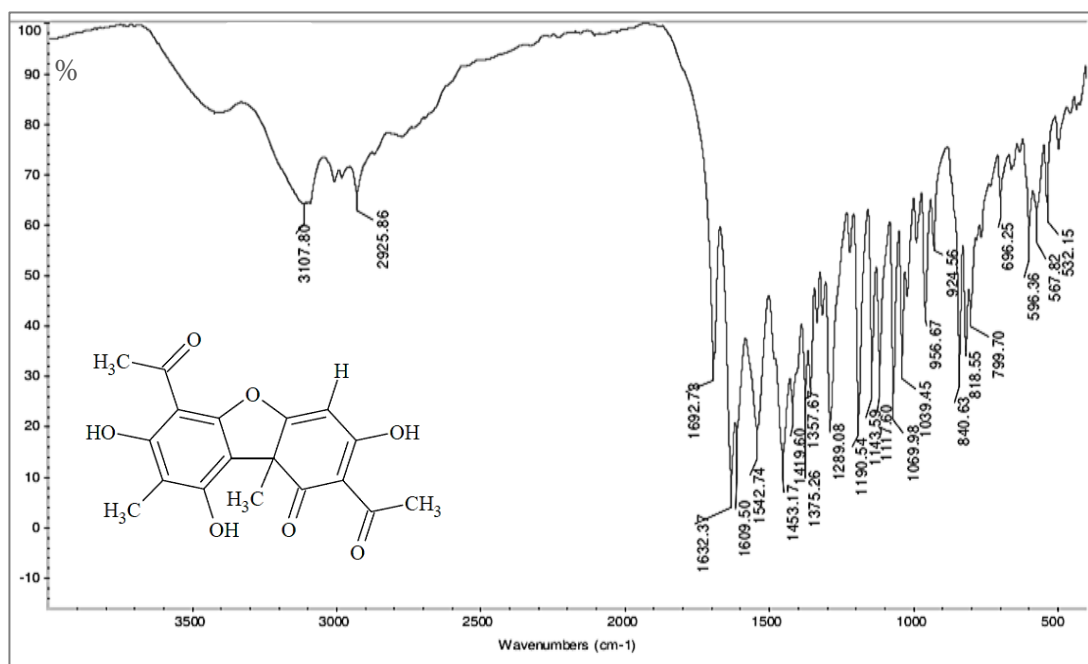
En la Figura 12 se observa el espectro IR del ácido úsnico (aislado del liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale.), en KBr y en donde se reportan cinco bandas características, los cuales se presentan en la Tabla 5.



**Figura 12.** Espectro IR del ácido úsnico obtenido del liquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale (Martino, 2015)<sup>26</sup>.

##### iii. Viteri - 2015<sup>28</sup>

Proporciona el espectro IR del ácido úsnico (aislado del liquen *Usnea antarctica*), ver Figura 13, observándose cinco bandas características, los cuales se reportan en la Tabla 5.



**Figura 13.** Espectro IR del ácido úsnico obtenido del líquen *Usnea antarctica* (Viteri, 2015)<sup>28</sup>.

#### iv. Comparación de los espectros IR

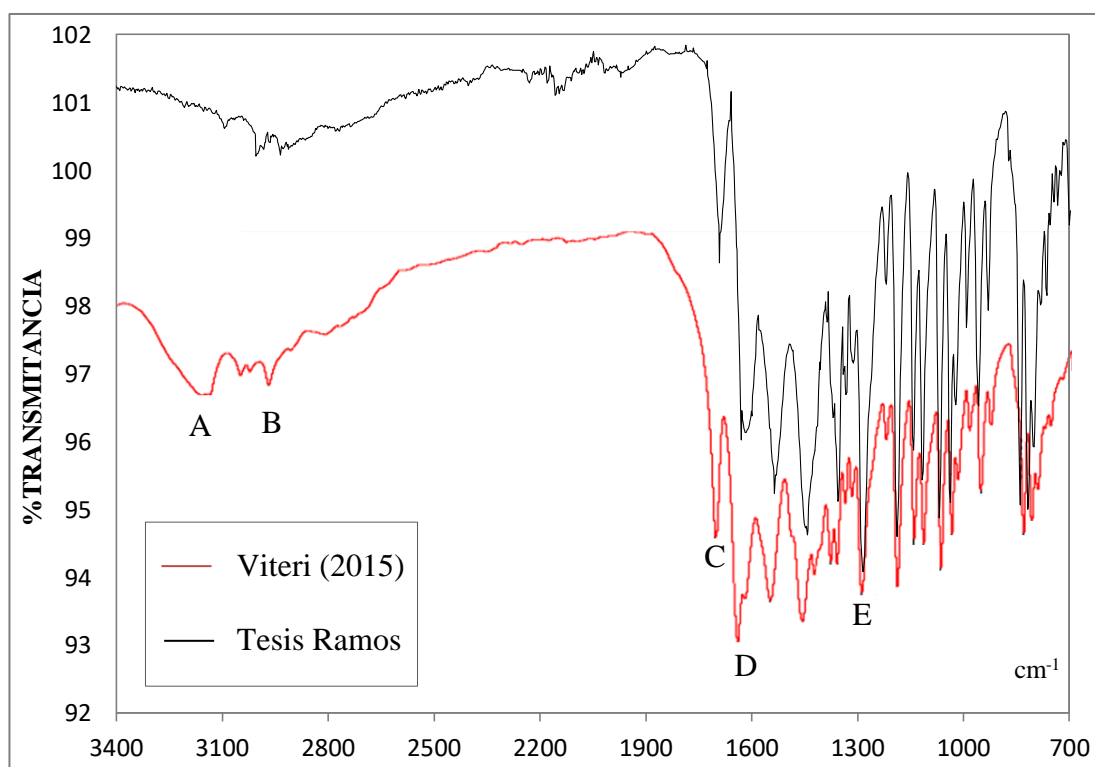
En la Tabla 5 se resumen los resultados obtenidos de las referencias mencionadas y los valores obtenidos en el espectro IR para el ácido úsnico aislado del líquen *U. calvescens* (el cual se presenta en el Capítulo III, Sec. 8, Pág. 105), reportándose la asignación de cinco bandas características y de estos resultados se observa la correspondencia que existe entre los valores obtenidos y los publicados en la bibliografía.

En la Figura 14 se observa la correlación que existe entre los espectros IR del ácido úsnico aislado del líquen *U. calvescens* y el reportado por Viteri (2015), para lo cual se realizó la superposición de los espectros IR.



**Tabla 5.** Bandas características del espectro IR para el ácido úsnico

| Banda | Asignatura             | $\nu^{-1}$ (cm <sup>-1</sup> ) |                              |                             |                           |
|-------|------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
|       |                        | Cóndor (2012) <sup>11</sup>    | Martino (2015) <sup>26</sup> | Viteri (2015) <sup>28</sup> | Tesis Ramos (Compuesto U) |
| A     | Alargamiento OH        | 3093                           | 3105                         | 3107                        | 3086                      |
| B     | Flexión C-H aromáticos | 2928                           | 2916                         | 2925                        | 2913                      |
| C     | Alargamiento C=O       | 1686                           | 1722                         | 1692                        | 1692                      |
| D     | Alargamiento C=C       | 1625                           | 1630                         | 1632                        | 1629                      |
| E     | Alargamiento del C-O-C | 1373                           | 1266                         | 1289                        | 1284                      |

**Figura 14.** Comparación de los espectros IR del ácido úsnico reportados por Viteri (2015)<sup>28</sup> y Ramos (Tesis).

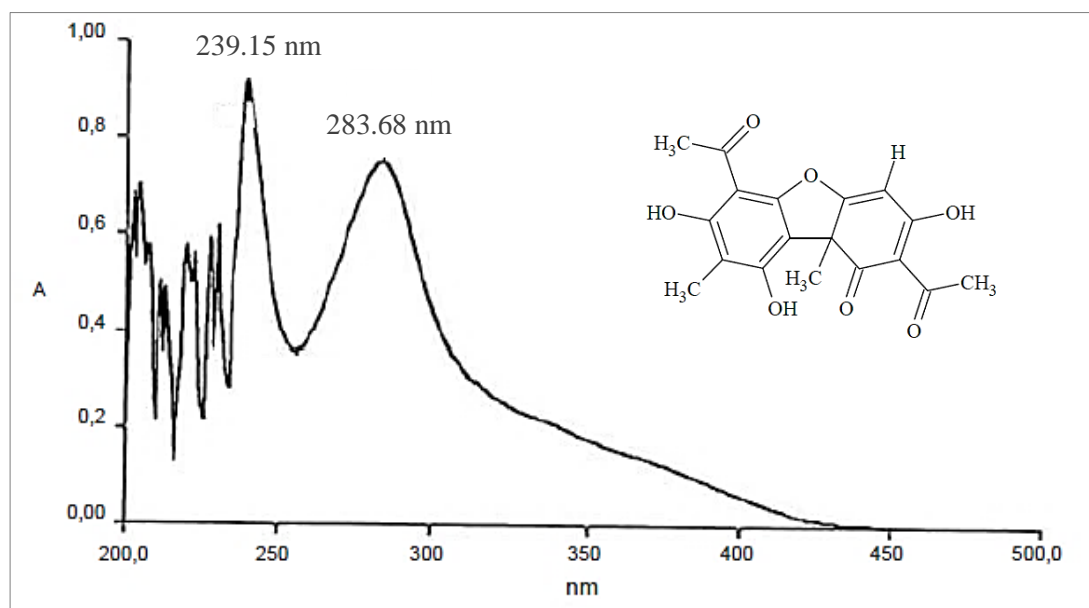
## e. Espectro Ultravioleta, UV

### i. Culberson - 1963<sup>29</sup>

Reporta dos bandas de máxima absorción en el espectro UV del ácido úsnico (aislado del líquen *Evernia prunastri* (L.) Ach.) a 233.3 y 283.2 nm.

### ii. Castro - 2004<sup>6</sup>

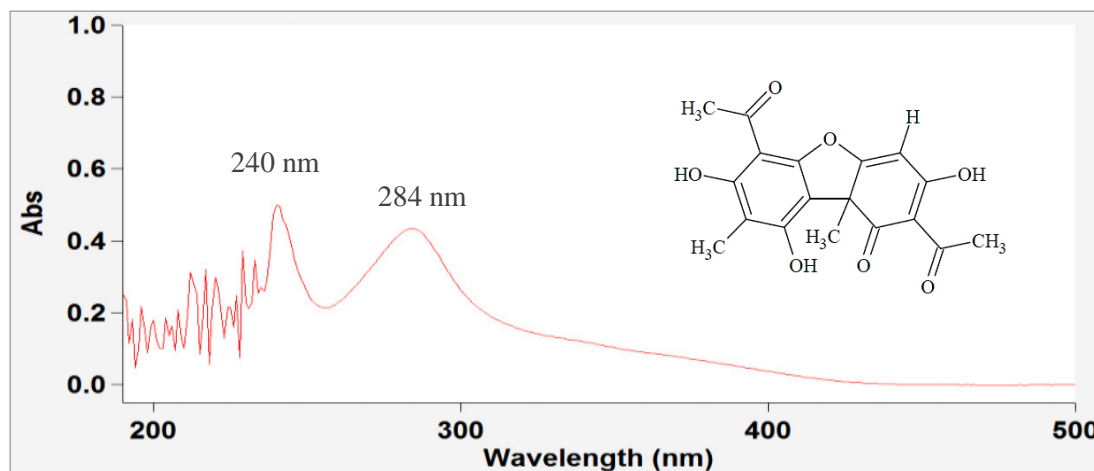
Proporciona las bandas de máxima absorción del ácido úsnico (aislado del líquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale.), en cloroformo, ver Figura 15, los cuales se reportan en la Tabla 6.



**Figura 15.** Espectro UV del ácido úsnico obtenido del líquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale. (Castro, 2004)<sup>6</sup>.

### iii. Viteri - 2015<sup>28</sup>

En la Figura 16 se observa el espectro UV del ácido úsnico (aislado del líquen *Usnea antarctica*), en cloroformo, observándose dos bandas características, los cuales se presentan en la Tabla 6.



**Figura 16.** Espectro UV del ácido úsnico obtenido del líquen *Usnea antarctica* (Viteri, 2015)<sup>28</sup>.

#### iv. Comparación de los espectros UV

En la Tabla 6 se reportan las bandas de máxima absorción de las referencias citadas anteriormente y los valores obtenidos para el espectro UV del ácido úsnico aislado del líquen *U. calvescens*, cloroformo (el cual se presenta en el Capítulo III, Sec. 8, Pág. 107). De estos resultados se observa la correspondencia que existe entre los valores obtenidos y los revisados en la bibliografía.

**Tabla 6.** Bandas de máxima absorción en el espectro UV para el ácido úsnico

| Referencia                     | Bandas de Máxima Absorción |          |
|--------------------------------|----------------------------|----------|
|                                | Banda 1                    | Banda 2  |
| Culberson (1963) <sup>29</sup> | 233.3 nm                   | 283.2 nm |
| Castro (2004) <sup>6</sup>     | 239.6 nm                   | 283.1 nm |
| Viteri (2015) <sup>28</sup>    | 240.0 nm                   | 284.0 nm |
| Tesis Ramos (Compuesto U)      | 233.7 nm                   | 283.6 nm |

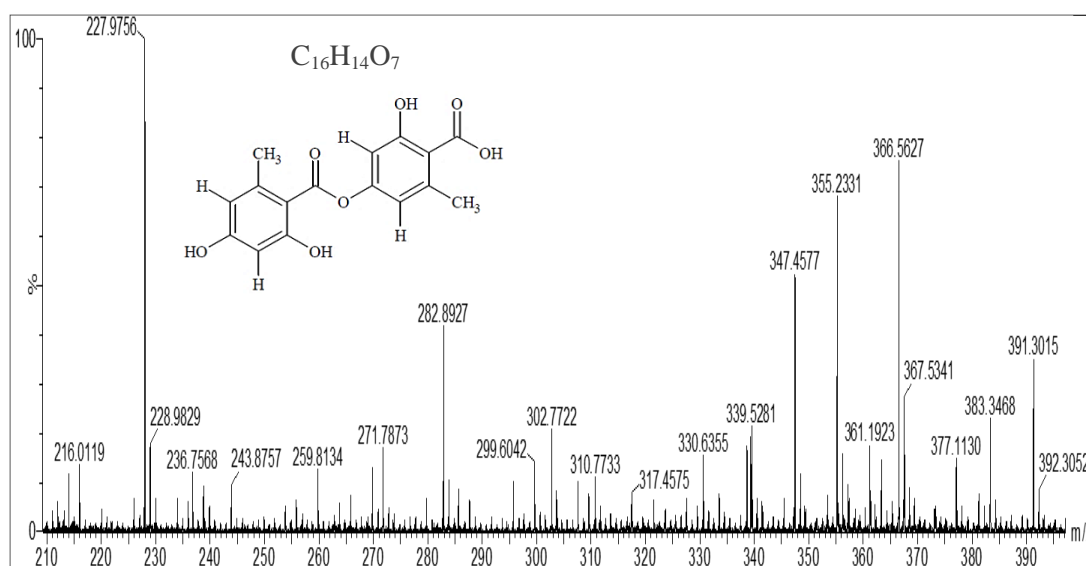
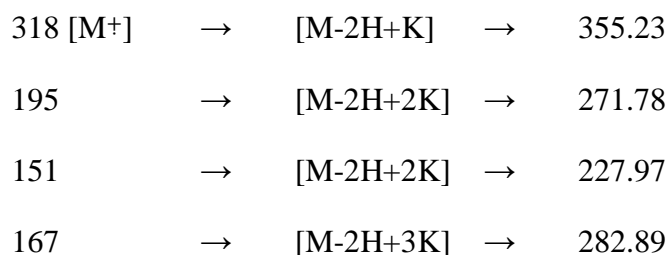
## 4.2. Ácido Lecanórico

### a. Espectros de masas, EM

#### i. Martino - 2015<sup>26</sup>

Martino (2015) reporta las fragmentaciones del espectro de masas del ácido lecanórico aislado del líquen *Flavopunctelia flaventior* (Stirt.) Hale, mediante la técnica ESI (Electron Spray Ionization), y cuyos principales fragmentos iónicos se representan como  $[M+K]$  o  $[M+Na]$  debido a la presencia de los iones  $K^+$  y  $Na^+$ .

En la Figura 17, se observa los fragmentos iónicos del EM (ESI) del ácido lecanórico, cuyos principales picos son:



**Figura 17.** Espectro de masas (ESI) del ácido lecanórico obtenido del líquen *Flavopunctelia flaventior* (Stirt.) Hale (Martino, 2015)<sup>26</sup>.

## ii. Huneck & Yoshimura - 1996<sup>25</sup>

Proporciona las fragmentaciones del espectro de masas del ácido lecanórico aislado del líquen *Hypocenomyce scalaris* (Arch. Ex Lilj) M. Choisy, y cuyos principales fragmentos iónicos son: 318 [M<sup>+</sup>] (10%), 317 (20%), 300 (5%), 273 (8%), 167 (100%), 150 (58%) 122 (78).

## iii. Comparación de espectros de masas

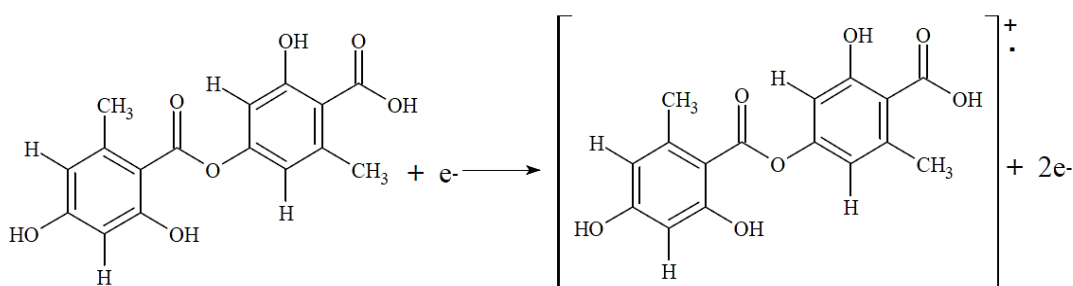
En el primer caso, Martino (2015) utiliza la técnica ESI, en donde evidencia fragmentos iónicos de la forma [M+K] o [M+Na] o múltiplos de estos iones, debido a la presencia en trazas de los iones K<sup>+</sup> o Na<sup>+</sup> que se encuentran en los detergentes los cuales son empleados para la limpieza de los materiales. Sin embargo, aún es posible determinarse los principales picos.

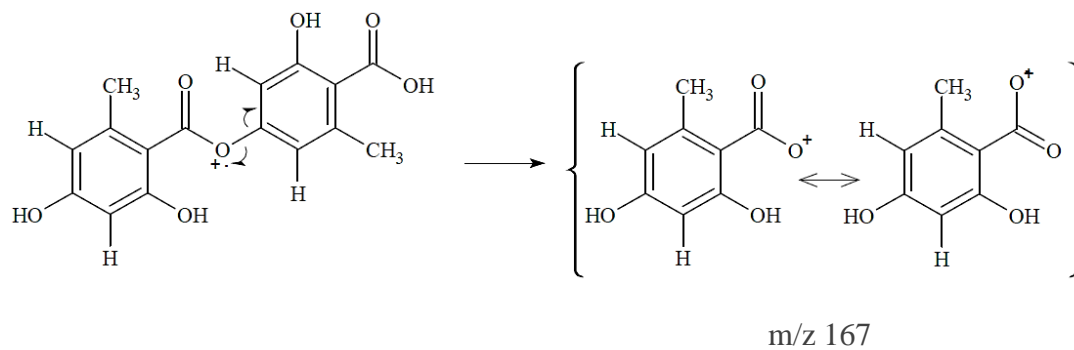
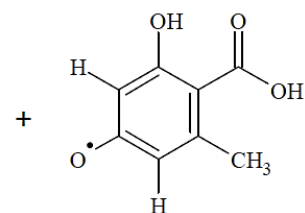
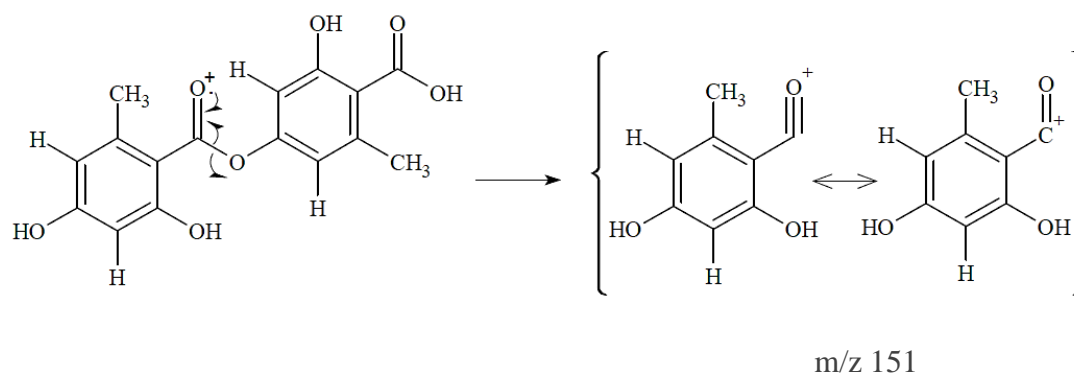
Por otro lado, Huneck & Yoshimura (1996) utiliza una fuente de ionización por impacto electrónico (EI), por lo que induce a una extensiva fragmentación; además, proporciona picos con valores verdaderos de masas, en este caso a m/z 318 que corresponde al peso molecular del compuesto.

## iv. Ecuaciones de fragmentación

A continuación se presenta las fragmentaciones de los principales picos en el EM del ácido lecanórico.

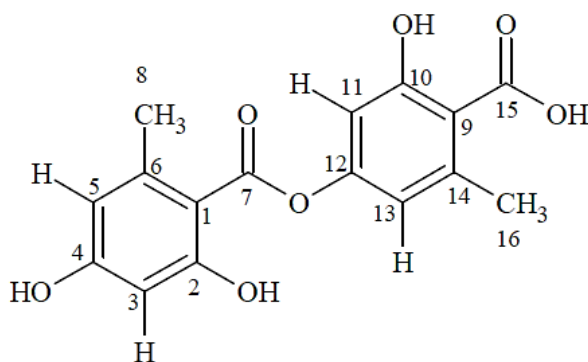
M<sup>+</sup> 318



m/z 167m/z 151

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

Para la interpretación de los espectros de RMN<sup>1</sup>H del ácido lecanórico que se reportan en la bibliografía y en la presente tesis, se adoptará la siguiente notación numérica (Figura 18):



**Figura 18.** Notación numérica en la estructura del ácido lecanórico.

### i. Jayaprakasha - 2000<sup>30</sup>

Reporta los desplazamientos químicos de RMN<sup>1</sup>H para el ácido lecanórico (aislado del liquen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale), en DMSO, los cuales se presentan en la Tabla 7.

### ii. Electronic Supplementary Material (ESM) or Analytical Methods. The Royal Society of Chemistry - 2015<sup>31</sup>

La ESM proporciona los desplazamientos químicos de RMN<sup>1</sup>H para el ácido úsnico (aislado del liquen *Parmotrema grayana*), en DMSO (ver tabla 7).

### iii. Comparación de los espectros de RMN<sup>1</sup>H

En la Tabla 7 se resumen los resultados obtenidos de las referencias citadas anteriormente y los valores obtenidos para el espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido lecanórico aislado del liquen *U. calvescens*, en DMSO (el cual se presenta en el

Capítulo III, Sec. 8, Pág. 110). De estos resultados se observa la correlación que existe entre los valores obtenidos y los revisados en la bibliografía.

**Tabla 7.** Datos comparativos del espectro de RMN<sup>1</sup>H del ácido lecanórico

| POSICIÓN                 | Jayaprakasha<br>(2000) <sup>30</sup>           | ESM - RSC<br>(2015) <sup>31</sup>           | Tesis Ramos<br>(Compuesto L)                |
|--------------------------|--|---|---|
|                          | Tipo de H,<br>Integración, $\delta_H$<br>(ppm) | Tipo de H, Integración,<br>$\delta_H$ (ppm) | Tipo de H, Integración,<br>$\delta_H$ (ppm) |
|                          | DMSO   | DMSO  | DMSO  |
| C-2 (-OH)                | s, 1H, 10.48                                   | -   | s, 1H, 10.49                                |
| C-3 (Ar-H)               | d, 1H, 6.22                                    | d, 1H, 6.22                                 | d, 1H, 6.23<br>(J = 2.19 Hz)                |
| C-4 (-OH)                | s, 1H, 10.47                                   | -   | -   |
| C-5 (Ar-H)               | d, 1H, 6.62                                    | d, 1H, 6.22                                 | d, 1H, 6.24<br>(J = 2.19 Hz)                |
| C-8 (-CH <sub>3</sub> )  | s, 3H, 2.35                                    | s, 3H, 2.35                                 | s, 3H, 2.36                                 |
| C-10 (-OH)               | s, 1H, 10.33                                   | s, 1H, 10.31                                | s, 1H, 10.31                                |
| C-11 (Ar-H)              | d, 1H, 6.00                                    | d, 1H, 6.62<br>(J = 2.1 Hz)                 | d, 1H, 6.67<br>(J = 2.20 Hz)                |
| C-13 (Ar-H)              | d, 1H, 6.61                                    | d, 1H, 6.59<br>(J = 2.1 Hz)                 | d, 1H, 6.62<br>(J = 2.20 Hz)                |
| C-15 (-COOH)             | s, 1H, 10.01                                   | s, 1H, 9.99                                 | s, 1H, 10.01                                |
| C-16 (-CH <sub>3</sub> ) | s, 3H, 2.37                                    | s, 3H, 2.37                                 | s, 3H, 2.37                                 |



---

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

Para la interpretación de los espectros de RMN<sup>13</sup>C del ácido lecanórico que se reportan en la bibliografía y en la presente tesis, se adoptará la notación numérica de la sección anterior (ver Figura 18).

#### **i. Huneck & Yoshimura - 1996<sup>25</sup>**

Proporciona los desplazamientos químicos de RMN<sup>13</sup>C para el ácido lecanórico (aislado del liquen *Hypocenomyce scalaris* (Arch. Ex Lilj) M. Choisy), en DMSO, los cuales se reportan en la Tabla 8.

#### **ii. Jayaprakasha - 2000<sup>30</sup>**

Reporta los desplazamientos químicos de RMN<sup>13</sup>C para el ácido lecanórico (aislado del liquen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale), en DMSO (ver Tabla 8).

#### **iii. Electronic Supplementary Material (ESM) or Analytical Methods. The Royal Society of Chemistry - 2015<sup>31</sup>**

La ESM proporciona los desplazamientos químicos de RMN<sup>13</sup>C para el ácido lecanórico (aislado del liquen *Parmotrema grayana*), en DMSO, los cuales se indican en la Tabla 8.

#### **iv. Comparación de los espectros de RMN<sup>13</sup>C**

En la Tabla 8 se resumen los resultados obtenidos de las referencias citadas anteriormente y los valores obtenidos para el espectro de RMN<sup>13</sup>C del ácido lecanórico aislado del liquen *U. calvescens*, en DMSO (el cual se presenta en el Capítulo III, Sec. 8, Pág. 113), observándose que existe correlación entre los valores obtenidos y los publicados en la bibliografía.

**Tabla 8.** Datos comparativos del espectro de RMN<sup>13</sup>C del ácido lecanórico

| N°<br>Carbono | Huneck &<br>Yoshimura<br>(1996) <sup>25</sup> | Jayaprakasha<br>(2000) <sup>30</sup> | ESM - RSC<br>(2015) <sup>31</sup> | Tesis Ramos<br>(Compuesto L) |
|---------------|---|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
|               | δ (ppm)                                       | δ (ppm)                              | δ (ppm)                           | δ (ppm)                      |
| <b>C-1</b>    | 105.5   | 108.2                                | 108.1                             | 108.93                       |
| <b>C-2</b>    | 162.2   | 160.2                                | 160.0                             | 160.46                       |
| <b>C-3</b>    | 100.8   | 100.5                                | 100.4                             | 100.99                       |
| <b>C-4</b>    | 162.7   | 161.5                                | 161.0                             | 161.57                       |
| <b>C-5</b>    | 111.8   | 109.9                                | 109.8                             | 110.31                       |
| <b>C-6</b>    | 141.6   | 140.4                                | 139.4                             | 138.49                       |
| <b>C-7</b>    | 167.9   | 167.2                                | 166.6                             | 167.63                       |
| <b>C-8</b>    | 22.5  | 25.4                                 | 21.37                             | 21.37                        |
| <b>C-9</b>    | 116.2   | 116.4                                | 116.3                             | 117.70                       |
| <b>C-10</b>   | 151.9   | 158.7                                | 158.8                             | 159.22                       |
| <b>C-11</b>   | 111.0   | 107.4                                | 107.3                             | 107.67                       |
| <b>C-12</b>   | 159.9   | 152.3                                | 152.1                             | 152.61                       |
| <b>C-13</b>   | 116.9   | 114.8                                | 114.6                             | 114.73                       |
| <b>C-14</b>   | 137.9   | 139.6                                | 140.2                             | 140.01                       |
| <b>C-15</b>   | 171.2   | 170.7                                | 170.4                             | 170.97                       |
| <b>C-16</b>   | 21.5  | 21.0                                 | 21.4                              | 21.75                        |

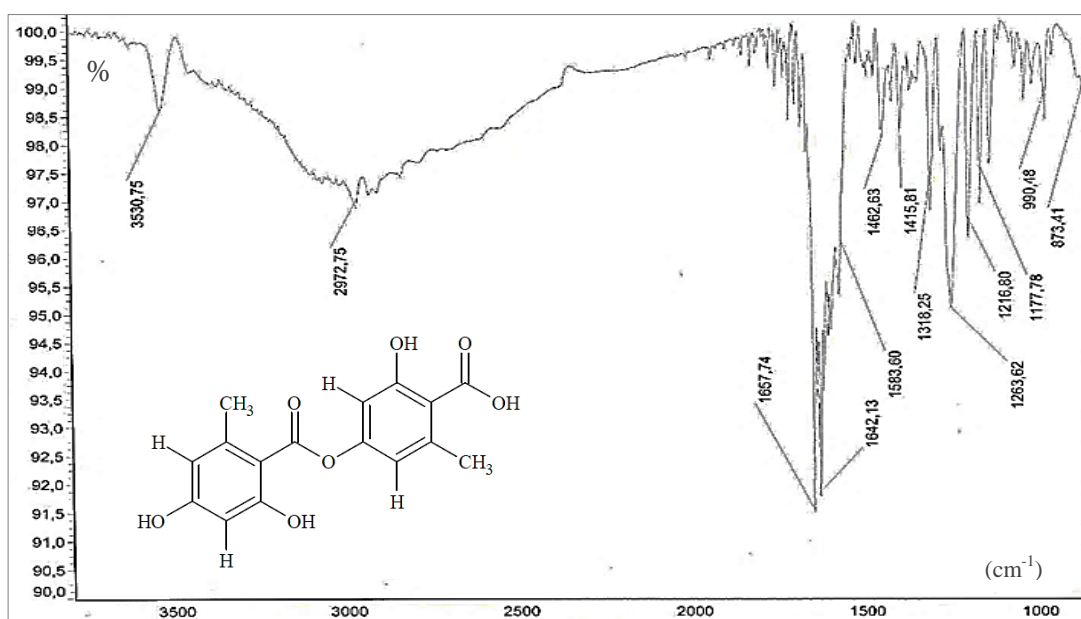
#### d. Espectro Infrarrojo, IR

##### i. Huneck & Yoshimura - 1996<sup>25</sup>

Proporciona el espectro IR del ácido lecanórico (aislado del líquen *Hypocenomyce scalaris* (Arch. Ex Lilj) M. Choisy), cuyas bandas se presentan en la Tabla 9.

##### ii. Martino - 2015<sup>26</sup>

En la Figura 19 se observa el espectro IR del ácido lecanórico (aislado del líquen *Flavopunctelia Flaventior* (Stirt.) Hale.), en KBr y en la Tabla 9 se reportan las bandas características del compuesto aislado.



**Figura 19.** Espectro IR del ácido lecanórico obtenido del líquen *Flavopunctelia flaventior* (Stirt.) Hale. (Martino, 2015)<sup>26</sup>.

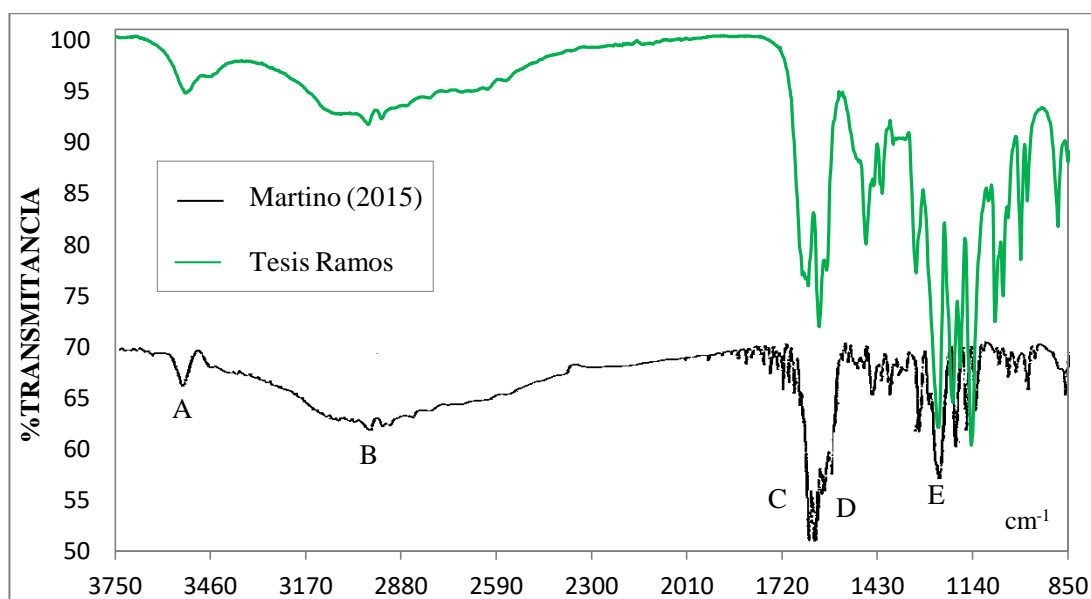
##### iii. Comparación de los espectros IR

En la Tabla 9 se resumen los resultados obtenidos de las referencias mencionadas y los valores obtenidos en el espectro IR para el ácido lecanórico aislado del líquen *U. calvescens* (ver Capítulo III, Sec. 8, Pág. 118), observándose que existe correlación entre los valores obtenidos y los publicados en la bibliografía.

**Tabla 9.** Bandas características del espectro IR para el ácido lecanórico

| Banda | Asignatura             | $\nu^{-1}$ (cm <sup>-1</sup> )          |                              |                           |
|-------|------------------------|---|------------------------------|---------------------------|
|       |                        | Huneck & Yoshimura (1996) <sup>25</sup> | Martino (2015) <sup>26</sup> | Tesis Ramos (Compuesto L) |
| A     | Alargamiento OH        | 3550                                    | 3530                         | 3533                      |
| B     | Flexión C-H aromáticos | 3100                                    | 2972                         | 2980                      |
| C     | Alargamiento C=O       | 1650                                    | 1657                         | 1658                      |
| D     | Alargamiento C=C       | 1615                                    | 1583                         | 1606                      |
| E     | Flexión O-H carbonilo  | 1250                                    | 1263                         | 1240                      |

En la Figura 20 se observa la correlación que existe entre los espectros IR del ácido lecanórico aislado del líquen *U. calvescens* y el reportado por Martino (2015), para lo cual se realizó la superposición de los espectros IR.



**Figura 20.** Comparación de los espectros IR del ácido lecanórico reportados por Martino (2015)<sup>26</sup> y Ramos (Tesis).

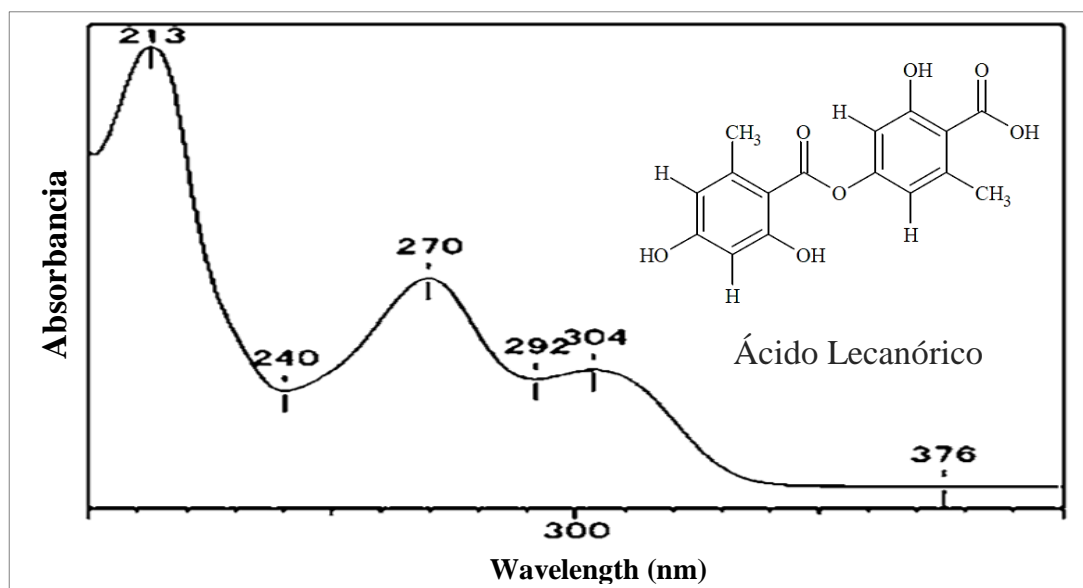
### e. Espectro Ultravioleta, UV

#### i. Huneck & Yoshimura - 1996<sup>25</sup>

Reporta dos bandas características en el espectro UV del ácido lecanórico (aislado del líquen *Hypocenomyce scalaris* (Arch. Ex Lilj) M. Choisy), en metanol, los cuales se presentan en la Tabla 10.

#### ii. Heng Luo - 2009<sup>21</sup>

Proporciona las bandas de máxima absorción en el espectro UV del ácido lecanórico (aislado del líquen *Umbilicaria antártica*), en metanol, cuyos valores se encuentran a 213, 270 y 304 nm (Figura 21).



**Figura 21.** Espectro UV del ácido lecanórico obtenido del líquen *Umbilicaria antártica* (Heng Luo, 2009)<sup>21</sup>.

#### iii. Martino - 2015<sup>26</sup>

Reporta dos bandas de máxima absorción en el espectro UV del ácido lecanórico (aislado del líquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale.), en metanol, los cuales se reportan en la Tabla 10.

#### iv. Comparación de los espectros UV

En la Tabla N°10 se observa la correspondencia que existe entre las bandas de máxima absorción reportados en las referencias mencionadas anteriormente y los obtenidos para el espectro UV del ácido lecanórico aislado del líquen *U. calvescens* (el cual se presenta en el Capítulo III, Sec. 8, Pág. 120).

**Tabla 10.** Bandas de máxima absorción en el espectro UV para el ácido lecanórico

| Referencia                              | Bandas de Máxima Absorción |          |
|---|----------------------------|----------|
|   | Banda 1                    | Banda 2  |
| Huneck & Yoshimura (1996) <sup>25</sup> | 270.5 nm                   | 305.5 nm |
| Heng Luo (2009) <sup>21</sup>           | 270.0 nm                   | 304.0 nm |
| Martino (2015) <sup>26</sup>            | 277.0 nm                   | 307.5 nm |
| Tesis Ramos (Compuesto L)               | 270.8 nm                   | 304.2 nm |

### C. ESTUDIOS QUÍMICOS GENERALES

#### 1. Composición Química del material liquénico

##### a. Análisis cualitativo (Marcha Fitoquímica)

De la búsqueda bibliográfica, se ha encontrado una gran variedad de procedimientos experimentales para el análisis preliminar (marcha fitoquímica) de una muestra vegetal; entre estos se optó por trabajar el procedimiento experimental adaptado del Dr. Victor M. Reyna Pinedo (1999)<sup>32</sup>, de acuerdo a la marcha fitoquímica de Rondina & Coussio (1969)<sup>33</sup>, el cual se basa en reacciones de coloración y precipitación, empleadas para la identificación de los diferentes metabolitos secundarios presentes en una muestra. En el Anexo 5 y 7, se describen el procedimiento y el diagrama experimental, respectivo.

## **b. Test de coloración para compuestos liquénicos**

Este tipo de prueba se basa en las diversas coloraciones que exhiben los compuestos liquénicos al ser puestas en contacto con diversos reactivos químicos, o la fluorescencia que producen bajo las radiaciones UV de longitud de onda entre 254 a 336 nm.

Para reconocer los ácidos fenólicos se emplea cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ , solución al 1%), con este reactivo se evidencia cuatro tipos de coloraciones (rojo, pardo, azul y violeta), los cuales se presentarán dependiendo del compuesto liquénico; un grupo de los compuestos liquénicos solo mostrará el color azul o violeta, mientras que otro grupo tendrá cambios de coloración de rojiza a parda y de azul a violeta. En el caso del ácido úsnico se observará el cambio de coloración de rojizo a pardo.

Para reconocer la presencia de compuestos liquénicos que posean dos grupos hidroxilo en posición meta (2-4 ó 2-6) en uno de los anillos de su estructura, se emplea una disolución acuosa saturada de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) o hipoclorito de calcio ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ), con este reactivo si se obtiene el color rojo sangre será evidencia de la presencia del ácido lecanórico.

Para reconocer las depsidonas, dépsidos y ácidos úsnicos se emplea una disolución acuosa de hidróxido de potasio ( $\text{KOH}$ , entre 5 a 10%), con este reactivo se evidencia tres tipos de coloraciones (rojo, rojo vino y amarillo); para las depsidonas y dépsidos se mostrará un color rojo vino o rojo, mientras que otro grupo de los compuestos liquénicos tendrá una coloración amarilla. En el caso del ácido úsnico el color característico que se observa es amarillo<sup>5, 12</sup>.

En esta tesis se han realizado algunas modificaciones en cuanto a las cantidades de reactivo y muestra, siguiendo el fundamento experimental de Robles (1992)<sup>12</sup>.

En el Anexo 6 y 7, se describen el procedimiento y el diagrama experimental realizado.

### c. Análisis cuantitativo del ácido úsnico

De la revisión bibliográfica, se observaron dos procedimientos referentes a la cuantificación del ácido úsnico en líquenes: el método descrito por Castro (2004)<sup>6</sup>, en el cual emplea la espectrometría UV, y el descrito por Nedeljko (2011)<sup>34</sup>, en el cual emplea cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

En adición, Castro (2010) realizó un estudio comparativo en el que determinó el porcentaje (w/w) de ácido úsnico en distintas especies liquénicas (ver Tabla 11) mediante la técnica de espectrometría UV. En este estudio se reportan valores entre 0.7 a 0.35 % de ácido úsnico.

**Tabla 11.** Porcentaje del ácido úsnico en 11 especies liquénicas (Castro, 2010)<sup>24</sup>

| Nº | MUESTRA LIQUÉNICA                                    | FAMILIA         | %Ácido Úsnico |
|----|--|-----------------|---------------|
| 1  | <i>Flavoparmelia caperata</i>                        | Parmeliaceae    | 0.35 %        |
| 2  | <i>Flavoparmelia cucullata</i>                       | Parmeliaceae    | 0.31 %        |
| 3  | <i>Xanthoparmelia conspersa</i>                      | Parmeliaceae    | 0.32 %        |
| 4  | <i>Alectoria ochrolechia</i>                         | Parmeliaceae    | 0.29 %        |
| 5  | <i>Hypotrachyna parámense</i>                        | Parmeliaceae    | 0.25 %        |
| 6  | <i>Psiloparmelia denotata</i>                        | Parmeliaceae    | 0.34 %        |
| 7  | <i>Psiloparmelia distincta</i>                       | Parmeliaceae    | 0.32 %        |
| 8  | <i>Thamnolia vermicularis</i><br>subsp. Vermicularis | Siphulaceae     | 0.06 %        |
| 9  | <i>Thamnolia vermicularis</i><br>subsp. Solida       | Siphulaceae     | 0.07 %        |
| 10 | <i>Cladina arbusculata</i>                           | Cladoniaceae    | 0.10 %        |
| 11 | <i>Stereocaulon vesuviaum</i>                        | Stereocaulaceae | 0.12 %        |

Asimismo, el ácido úsnico está ampliamente distribuido en los siguientes géneros de líquenes: *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Alectoria* (Alectoriaceae),



---

*Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalia* (Ramalinaceae), *Evenia* y *Parmelia* (Parmeliaceae), en el cual el género *Alectoria* contiene hasta un 6% de ácido úsnico (Proska, 1996)<sup>35</sup>, siendo este valor mucho mayor al reportado entre las especies líquénicas estudiadas por Castro (2010).

A continuación se describirán los métodos mencionados anteriormente, los cuales involucran el tratamiento de la muestra líquénica, la preparación de los estándares y la respectiva cuantificación del ácido úsnico.

### **c.1. Procedimiento de Castro (2004)<sup>6</sup>**

**“Estudio fitoquímico del liquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale.”**

- **Muestra líquénica:** 1 g de muestra limpia y seca del liquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale.
- **Preparación de las soluciones estándares y curva de calibración**
  - i. Se preparó una solución de ácido úsnico de 0.1 ppm en cloroformo.
  - ii. Se registró el espectro UV entre 200 a 400 nm, obteniéndose la longitud de onda de máxima absorción a 284 nm (con la cual se trabajó las demás lecturas).
  - iii. Se preparó diluciones dentro del rango de linealidad (soluciones estándar)
  - iv. Se midió las absorbancias máximas de los estándares a 284 nm.
  - v. Se ploteó concentración vs absorbancia para obtener la curva de calibración con su respectiva ecuación.
- **Preparación y evaluación de la muestra problema**
  - vi. Se extrajo 1 g de muestra con 150 mL de cloroformo en equipo Soxhlet (2 veces). Luego, se juntó los extractos, se concentró y se enrasó hasta 100 mL (solución problema).

- 
- vii. A partir de la solución problema se realizó diluciones de 1/10, 1/50, 1/100, 1/500 y 1/1000, se registró sus absorbancias máximas y se calculó el porcentaje de ácido úsnico por gramo de muestra de la solución problema y sus diluciones.

### **c.2. Procedimiento de Nedeljko (2011)<sup>34</sup>**

**“The isolation, analytical characterization by HPLC-UV and NMR spectroscopy, cytotoxic and antioxidant activities of baeomycesic acid from *Thamnia vermicularis* var. *subuliformis*.”**

- **Muestra líquénica:** 500 g de muestra seca del liquen *Thamnia vermicularis* var. *subuliformis*.
- **Extracción sólido - líquido**
  - i. Se maceró 500 g de muestra líquénica seca y pulverizada en 2 L de cloroformo (con agitación constante) a temperatura ambiente durante 48 h.
  - ii. El extracto obtenido se filtró con papel filtro Whatman N°42 y se concentró.
- **Evaluación de la muestra líquénica por HPLC**
  - iii. El extracto concentrado fue analizado por HPLC en una columna C18 (C18; 25 cm x 4.6 mm, 10 m) acoplado a un detector espectrofotométrico de UV, siendo el medio empleado metanol: ácido fosfórico: agua (80: 20: 0,9 v / v / v; Metanol de grado HPLC-Merck, ácido fosfórico de grado analítico, agua ultrapura) y con un flujo de 1 mL/ min. Los datos obtenidos del tiempo de retención y el espectro de absorción fue comparado con la data del equipo.

### **c.3. Comparación de procedimientos**

La técnica por HPLC resulta más costosa debido a los reactivos requeridos, además de disponer del equipo HPLC, el cual no se tiene, por lo que en esta tesis se optó por utilizar la técnica de espectrometría UV, la cual se describe en el Capítulo III, Sección 6 (Pág. 76).

## 2. Aislamiento de compuestos liquénicos

En la bibliografía, se han publicado diversos procedimientos para el aislamiento de compuestos liquénicos como el ácido úsnico, ácido lecanórico, parietina, ácido orselínico, atranorina entre otros; de estas publicaciones se describen dos procedimientos que sirvieron de guía para el procedimiento experimental realizado en esta tesis.

### 2.1. Procedimiento de Córdor (2012)<sup>11</sup>

**“Estudio Químico de los líquenes *Xanthoparmelia tasmanica* y *Xanthomendoza mendozae*”**

**a. Muestra utilizada:** muestra seca de *Xanthoparmelia tasmanica*

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

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

---

### c. Separación Cromatográfica

- i. Se realizó un análisis preliminar en CCF. Luego, se realizó una CC-Sephadex LH-20 de 0.5269 g de EBO, empleándose como eluente la mezcla de diclorometano: metanol: éter (1:1:1), obteniéndose 10 fracciones.
- ii. Se realizó una derivatización del extracto, debido a que los compuestos presentaban una alta polaridad en CCF; para lo cual se acetiló el extracto.
- iii. El EBO acetilado (0.4863 g) fue tratado en CC en Sílica gel, empleándose como eluentes éter: acetato de etilo (6:4, 1:1, 6:4), acetato de etilo y metanol; obteniéndose 10 fracciones.

### d. Purificación y caracterización

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

**e. Resultados:** ácidos grasos insaturados y ácido úsnico.

## 2.2. Procedimiento de Martino (2015)<sup>26</sup>

“Estudio Químico *Flavopunctelia flaventior* (Stirt.) Hale.”

**a. Muestra utilizada:** muestra seca de *Flavopunctelia flaventior* (Stirt.) Hale.

### b. Extracción sólido - líquido (Obtención del EBO)

- i. Se maceró 20.5, 17 y 26 g de muestra seca y molida con 200 mL de acetona a temperatura ambiente durante 48 h cada uno; debido a que fueron recolectadas en distintas fechas se rotuló con A, B y C (Se repitió 4 veces).
- ii. Se realizó una CCF previa a los extractos y se procedió a juntarlas debido a que presentaban un mismo desplazamiento. Luego, se concentró en un rotavapor, obteniéndose 6.9 g de EBO.

---

### c. Separación Cromatográfica

- i. Se realizó una CCF preliminar para la búsqueda de eluentes. Luego, se realizó una CC-Sephadex de 0.766 g de EBO, empleándose como eluente metanol, obteniéndose 10 fracciones.
- ii. 0.0891 g de una de las fracciones obtenidas de la columna anterior, fue tratada en una CC-Sílica gel, empleándose como eluentes éter de petróleo 100%, éter de petróleo: acetato de etilo (9:1, 8:2, 7:3 y 6:4), acetato de etilo 100%, acetato de etilo: metanol (9:1, 8:2, 7:3 y 6:4), metanol: agua (5:5) y agua. Se reagrupó en 13 fracciones.
- iii. Se pesó 0.5 g de ácido oxálico y se disolvió en 100 mL de metanol, luego se añadió 41.7 g de sílica gel, se homogenizó y se secó a 100 °C durante 1 h 30 min.
- iv. Se realizó una CC-sílica gel impregnada con ácido oxálico (obtenida de la sección anterior) de 0.6240 g de EBO inicial, empleándose como eluentes éter de petróleo 100%, éter de petróleo: tolueno (3:1, 3:3 y 1:3), tolueno 100%, tolueno: acetato de etilo (98:2, 95:5, 90:10, 70:30, 60:40 y 80:20), acetato de etilo 100%, acetato de etilo: metanol (95:5, 80:20 y 50:50) y metanol 100% y se reagrupó en 8 fracciones.
- v. Se realizó una cromatografía en placa preparativa (CPP) para algunas fracciones obtenidas de las columnas anteriores, usando como eluentes cloroformo: metanol (98:2), obteniéndose 3 fracciones.

### d. Purificación y Caracterización

- i. Se recrystalizaron los compuestos con agua: acetona (5:5) para el ácido lecanórico y con cloroformo para el ácido úsnico.
- ii. Se caracterizaron los compuestos mediante su punto de fusión y el análisis de sus espectros de masas, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, HMBC, IR y UV.

**e. Resultados:** ácido úsnico, ácido lecanórico y  $\beta$ -orcinol carboxilato de metilo.

### **2.3. Procedimiento realizado en la tesis**

El procedimiento utilizado en esta tesis se resume en las siguientes etapas:

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

- i. Extracción con n-hexano y acetona.
- ii. Concentración de los extractos

#### **b. Separación Cromatográfica**

- i. Análisis preliminar por CCF
- ii. Separación cromatográfica en sílica gel, realizando una elusión isocrática y en gradiente.

#### **c. Purificación y caracterización**

- i. Recristalización de los compuestos aislados
- ii. Caracterización de los compuestos obtenidos mediante su punto de fusión y el análisis de sus espectros de masas, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, IR y UV.

### **3. Identificación Espectroscópica de Compuestos Orgánicos**

Las técnicas espectroscópicas son las herramientas de caracterización o análisis para la elucidación e identificación de compuestos orgánicos; donde se estudia el resultado de la interacción de las radiaciones electromagnéticas con la materia. Esta interacción es dado por las transiciones de los diferentes niveles de energía de los sistemas y del cambio de la frecuencia de la radiación; de esta manera, puede medirse la radiación absorbida, emitida, transmitida, dispersada o reflejada de acuerdo con los diferentes métodos. Dependiendo de la energía puesta o radiación involucrada en el proceso, se consideran las siguientes clases de espectros:

- 
- i. Espectros rotacionales, producidos por cambios en la energía de rotación de las moléculas o grupos moleculares presentes, siendo la frecuencia de radiación en la región del microondas.
  - ii. Espectros vibracionales, producidos por los modos de vibración de las moléculas al incidir una radiación en la frecuencia de la región infrarroja.
  - iii. Espectros electrónicos, producidos por los cambios de energía de los diferentes estados electrónicos de las moléculas u sistema, siendo la frecuencia de radiación en la región ultravioleta-visible.

Entre las técnicas espectroscópicas para la caracterización de los compuestos orgánicos, se han establecido las técnicas fundamentales de análisis; estos son la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN<sup>1</sup>H), la espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (RMN<sup>13</sup>C), la espectroscopia Infrarroja (IR) y la espectroscopia Ultravioleta (UV); adicionalmente la Espectrometría de Masas (EM), aunque en esta técnica no se involucra la radiación, la información que ofrece es de gran utilidad.

Para el empleo de estas técnicas, es necesario evaluar las ventajas y desventajas de su uso, así como evaluar la información útil obtenible y a la interpretación factible de los espectros; el cual varía dependiendo de la molécula a analizar. Dependiendo de la cantidad de información obtenida, el orden de utilidad de las técnicas es:

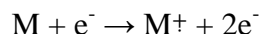
$$\text{RMN } (^1\text{H y } ^{13}\text{C}) > \text{EM} \gg \text{IR} > \text{UV}$$

#### **a. Espectrometría de Masas, EM<sup>36, 37, 38</sup>**

La espectrometría de masas es una técnica universal, de alta sensibilidad, que permite identificar compuestos químicos; difiere de la espectroscopia infrarroja, ultravioleta y de resonancia magnética nuclear debido a que estas técnicas presentan una absorción de radiación electromagnética, mientras que en la espectrometría de masas se da un choque de electrones de alta energía, ocasionando la ionización de las moléculas cuando colisionan con la muestra.

---

En la espectrometría de masas, una muestra molecular, la cual es representada por M, se evapora; luego la muestra gaseosa de M se bombardea con un haz de electrones ( $e^-$ ), y uno de los efectos que este bombardeo produce es desprender un electrón de la molécula y producir un ion al que se denomina ion molecular ( $M^+$ ). La siguiente ecuación muestra este proceso.



El ion molecular es una especie altamente energética e inestable. Su energía se disipa a través de una serie de reacciones de fragmentación que conducen a iones más pequeños y a moléculas neutras. La relación masa/carga ( $m/z$ ) de cualquier ion puede detectarse y registrarse por medio de un espectrómetro de masas. A partir de estos datos se puede determinar el peso molecular y la estructura del compuesto.

Un espectrómetro de masas consta fundamentalmente de una cámara de ionización, un acelerador de iones, un sistema de enfoque de los mismos y un detector conectado a un registrador o dispositivo de lectura.

En función al modo de ionización (o fuente de iones) existen distintas formas de análisis, entre las cuales se pueden citar la ionización por impacto electrónico (EI), ionización química (CI), ionización por electro spray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI), desorción/ionización de matriz asistida por láser (MALDI) entre otros; siendo la polaridad del analito la que determina la fuente de ionización. En el Anexo 3 se describe una breve información sobre la ionización química a presión atmosférica (APCI), el cual fue realizado en la tesis.

En general, la espectrometría de masas tiene dos aplicaciones importantes en el estudio de compuestos orgánicos, estos son:

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



**b. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno, RMN<sup>1</sup>H<sup>36, 39</sup>**

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es la técnica espectroscópica de gran importancia y valiosa en información para la elucidación de un compuesto orgánico, y es la principal técnica a la que recurren los químicos orgánicos, debido a la información útil que se obtiene.

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

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

Los instrumentos conocidos como espectrómetros de RMN permiten medir la absorción de energía en los núcleos de hidrógeno (de un compuesto orgánico). Estos instrumentos están diseñados de manera que irradian al compuesto con energía electromagnética de frecuencia constante (60, 80, 200, 500 u 800 MHz) mientras se varía la fuerza del campo magnético. Cuando este campo magnético alcanza la fuerza correcta, los núcleos de hidrógeno absorben energía (y se produce la “resonancia”), esta absorción es registrada por el instrumento como una señal (un pico o una serie de picos) sobre una hoja de papel calibrado.

El espectro de RMN constituye la gráfica de la frecuencia de los picos de absorción (expresado en unidades de  $\delta$ , ppm) en función de las intensidades de tales señales.

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

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

Un espectro de RMN se considera plenamente identificado cuando cada una de las señales que aparecen en el espectro se le puede asignar uno o un grupo de hidrógenos de la molécula en estudio; es decir, a cada hidrógeno o grupo de hidrógenos equivalentes de la molécula debe corresponder una señal en el espectro que satisfaga los requerimientos del desplazamiento químico, integración e interacción espín - espín correspondientes. Sin embargo, el “modus operandi” del químico orgánico al interpretar un espectro de RMN es identificar solo aquellas señales donde puedan deducirse fácilmente los acoplamientos espín - espín y, por lo general, no está interesado en encontrar soluciones precisas a sistemas complejos.

### **c. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de carbono, RMN<sup>13</sup>C<sup>36,39,40</sup>**

La RMN<sup>13</sup>C es una técnica complementaria a la del RMN<sup>1</sup>H, mientras que en el espectro de RMN<sup>1</sup>H se deduce la estructura o esqueleto carbonado en relación al entorno magnético de los átomos de hidrógeno, la RMN<sup>13</sup>C determina el entorno magnético de los átomos de carbono, las cuales se enlazan con la del hidrógeno. Recordemos que la RMN estudia los átomos con número impar de protones y neutrones; sin embargo, el 99% de los carbonos en la muestra son del tipo <sup>12</sup>C, el cual es un número par y por ende no presentaría señal en el espectro; por ende, se trabaja con el 1% que es el isótopo de <sup>13</sup>C que presenta espín magnético igual al protón, siguiendo el mismo fundamento de la técnica de RMN<sup>1</sup>H.

---

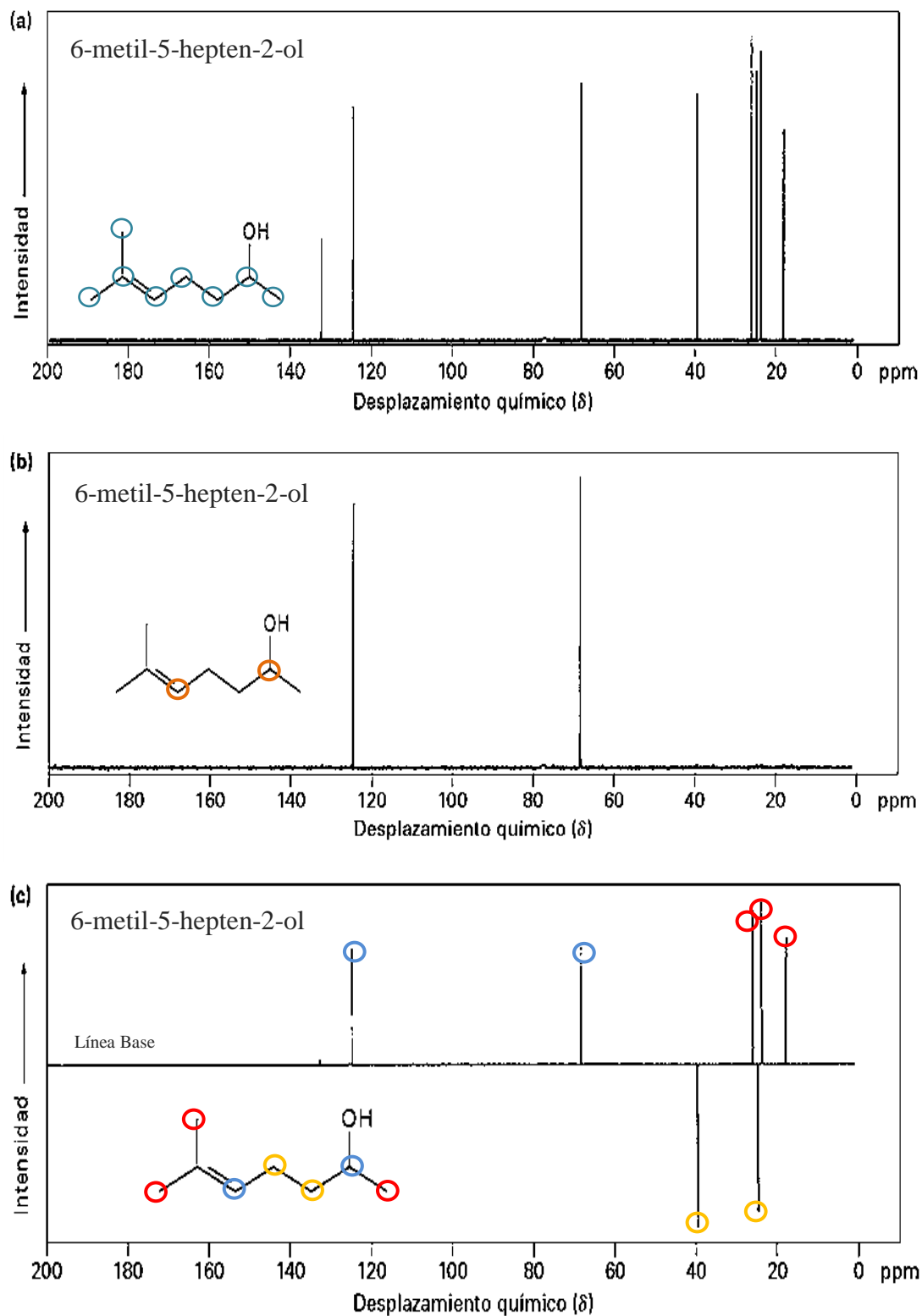
A comparación con la RMN<sup>1</sup>H, la sensibilidad en a RMN<sup>13</sup>C es menor debido al 1% que representa el isótopo <sup>13</sup>C, así como la frecuencia de resonancia para esta técnica representa la cuarta parte de la RMN<sup>1</sup>H.

Con respecto a los desplazamientos químicos del carbono estas son mayores que la del hidrógeno debido a la cercanía directa de los átomos de carbono con los átomos apantallantes o desapantallantes. Asimismo, no hay desdoblamiento espín-espín de las señales en el espectro de <sup>13</sup>C debido a la poca probabilidad de tener adyacentes dos núcleos de <sup>13</sup>C (menos del 1%), lo que resulta ventajoso. Sin embargo, el <sup>13</sup>C al ser menos abundante, ocasionaría una notable aparición de ruido de fondo en sus espectros, debido a que las señales del <sup>13</sup>C serían tan débiles que estarían superpuestas con el ruido de fondo, obteniéndose señales no muy claras (sensibilidad baja). Para solucionar este problema se procede a la obtención de un promedio de las corridas individuales de las señales, debido a que el promedio del ruido de fondo es nulo, solo se observarán las señales no nulas ocasionadas del <sup>13</sup>C. Con respecto a la sensibilidad del equipo, se empleará conjuntamente la RMN de la transformada de Fourier (TF-RMN) la cual aumenta la velocidad del equipo y su sensibilidad.

Existen tres clases de espectros de RMN<sup>13</sup>C, en uno se observa los acoplamiento espín - espín <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H (espectro acoplado a <sup>1</sup>H), y en los otros dos espectros no (espectro desacoplado a <sup>1</sup>H y DEPT); estos espectros se describen como:

- i. El espectro de RMN<sup>13</sup>C desacoplado a <sup>1</sup>H de banda ancha (Figura 22-a), en el cual el núcleo de <sup>13</sup>C no está acoplado con los del <sup>1</sup>H y, por lo tanto, no muestra acoplamiento espín - espín. El desacoplamiento se hace electrónicamente irradiando la muestra con una segunda radiofrecuencia. Dado que no hay desdoblamiento de señales, la señal de cada grupo de átomos de carbono magnéticamente equivalentes aparece como un “singulete”. Este tipo de espectro permite determinar el número de átomos de carbono diferentes en la molécula, que corresponde al número de señales que aparecen en el espectro.

- 
- ii. En los espectros de RMN<sup>13</sup>C acoplado a <sup>1</sup>H no se suprime el acoplamiento <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>H y, en este caso, la señal de cada carbono se desdobla por acción de los protones directamente enlazados a él, aplicándose la regla “n + 1”, donde n es el número de átomos de hidrógeno enlazados al átomo de carbono que se analiza. Así, un carbono cuaternario (enlazado a cuatro grupos alquílicos y sin H enlazado a él) presenta una señal singulete; un carbono terciario (que solo tiene 1H enlazado) presenta un doblete; un carbono secundario (que tiene 2H) presenta un triplete y un carbono primario (un grupo metilo, CH<sub>3</sub>) presentará un cuadruplete.
- iii. Los espectros de RMN<sup>13</sup>C - DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer o Transferencia por polarización aumentada y no distorsionada) permiten distinguir el tipo de carbono CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH o C<sub>cuaternario</sub>, al que pertenece una determinada señal. Entre los tipos de DEPT se tienen los espectros registrados con pulsos de 45° (DEPT - 45) en donde aparecen las señales de CH, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>; los espectros registrados con pulsos de 90° (DEPT - 90, ver Figura 22-b) en donde solo hay señales del CH, mientras que las señales del CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> y los carbonos cuaternarios no se observan; y los espectros registrados con pulsos de 135° (DEPT - 135, ver Figura 22-c) en el cual se obtendrán las señales del CH<sub>3</sub> y CH en el plano positivo (vista arriba de la línea base); y las señales del CH<sub>2</sub> aparecerá en el plano negativo (vista debajo de la línea base), en ambos planos no se indicarán los carbonos cuaternarios.



**Figura 22.** (a) Espectro desacoplado de banda ancha, presenta los 8 carbonos; (b) espectro DEPT-90, presenta 2 carbonos del CH; (c) espectro DEPT-135, presenta señales positivas para los 2 CH y 3 CH<sub>3</sub>, y señales negativas para los 2 CH<sub>2</sub>.

#### d. Espectroscopia Infrarroja, IR<sup>36, 41</sup>

Es una técnica analítica instrumental que permite conocer los principales grupos funcionales presentes en la estructura molecular de un compuesto. Para ello, el compuesto es sometido a radiación infrarroja (4000 a 666.7  $\text{cm}^{-1}$ ) en el espectrofotómetro, obteniéndose su espectro de absorción. Este espectro se representa mediante la gráfica de la longitud de onda ( $\lambda$ , nm) o el número de onda ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ) frente al porcentaje de transmitancia (%T) o de Absorbancia (A), y en donde la transmitancia y la absorbancia son representadas en las siguientes ecuaciones:

$$\%T = \frac{\text{Intensidad transmitida}}{\text{Intensidad incidente}} \times 100 \qquad A = \text{Log}_{10} (T^{-1})$$

La absorción IR por un compuesto a una longitud de onda determinada, origina una disminución en el %T, observándose un pico o banda en el espectro; cuando no hay absorción, el %T es 100% siendo esta la línea base. Estas bandas son correspondientes a los modos de vibración; caracterizada por la posición e intensidad. El número de bandas o los grados de simetría, queda determinado por el número de átomos y la simetría del sólido; mientras que su posición o frecuencia, e intensidad son características de su naturaleza química.

A diferencia de los espectros de masas y de RMN, los espectros IR aún de moléculas muy simples pueden ser extremadamente complejos. Sin embargo, el químico orgánico toma ventaja de esta complejidad cuando compara el espectro de un compuesto desconocido con aquel de una muestra de referencia, la correlación de las bandas de absorción de ambos espectros es una excelente evidencia de identidad. No es posible que dos compuestos cualesquiera, excepto los enantiómeros ópticos, tengan el mismo espectro IR, esto es relacionado con tener su propia huella dactilar.

A pesar de esta complejidad y del hecho que el espectro IR es característico de toda la molécula, ciertos grupos de átomos (los grupos funcionales) originan bandas a, o cerca de, la misma frecuencia sin importar la estructura del resto de la molécula, lo que permite al químico obtener útil información estructural acerca de los grupos funcionales presentes (por ejemplo: el grupo oxhidrilo OH, el grupo carbonilo C=O,

etc.) mediante simple inspección del espectro y la referencia a las tablas de frecuencia de tales grupos.

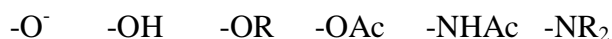
Teniendo en cuenta la información útil que se obtiene de los espectros de masa y de RMN para la identificación de un compuesto orgánico, no es necesario un análisis detallado del espectro de IR (limitándose a la identificación de grupos funcionales).

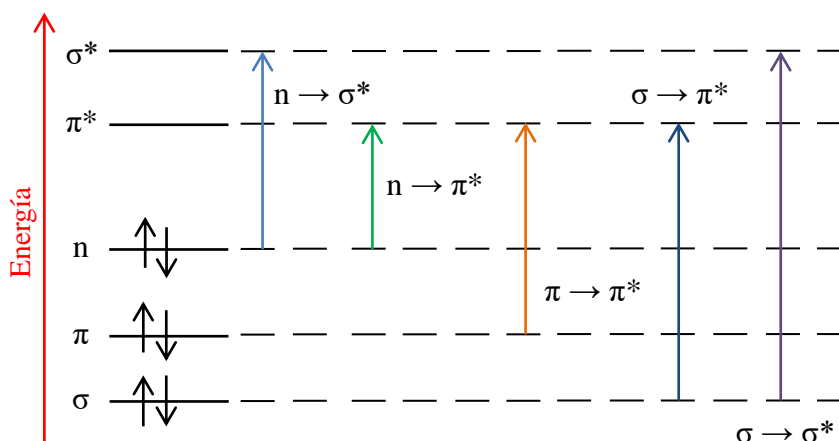
#### e. Espectroscopia Ultravioleta, UV<sup>36, 42, 43</sup>

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

El fundamento de la absorción de los compuestos orgánicos, se debe a que estos compuestos tienen electrones de valencia (situados en orbitales moleculares sigma ( $\sigma$ ), pi ( $\pi$ ) y no enlazantes ( $n$ )) que pueden ser excitados para llegar a niveles de energía superiores; es decir, se basan en transiciones electrónicas (Figura 23); estas pueden ser: transiciones de los electrones  $n$  al estado excitado  $\sigma^*$ , o transiciones de los electrones  $n$  y  $\pi$  al estado excitado  $\pi^*$ , teniendo en cuenta, que la energía requerida para estos procesos lleva las bandas de absorción hacia dentro de la región ultravioleta-visible (200 a 700nm). Las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$  requieren de la presencia de un grupo funcional no saturado que aporte los orbitales  $\pi$ ; estos son los cromóforos (grupo funcional capaz de absorber la radiación UV).

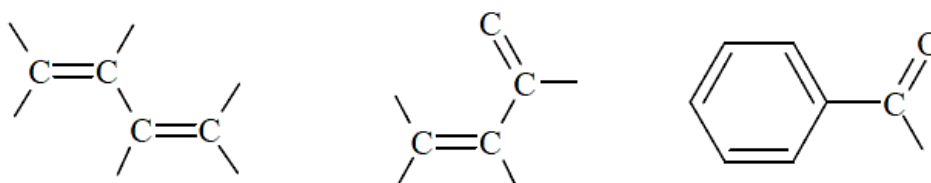
Otro grupo existente son los auxocromos, los cuales no comunican color a las combinaciones saturadas, pero si pueden intensificar la acción del cromóforo, ya sea disminuyendo o incrementando la intensidad del color. Los auxocromos solo tienen transiciones  $n \rightarrow \pi^*$ ; entre estos grupo tenemos:





**Figura 23.** Transiciones electrónicas

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



**Figura 24.** Ejemplos de sistemas conjugados

La espectroscopia UV toma ventaja de esta selectividad para caracterizar sistemas conjugados, debido a que la mayor parte de una molécula compleja resulta transparente (no absorbe) en el UV, entonces solo los grupos conjugados característicos pueden ser puestos en evidencia dentro de la molécula.

En general, la espectroscopia UV solo nos permite evidenciar la existencia de grupos cromóforos o de sistemas conjugados en la molécula por medio de sus absorbancias.



En resumen, las técnicas espectroscópicas mencionadas anteriormente, permiten la identificación, caracterización o elucidación de un compuesto orgánico, ya sea un compuesto aislado o sintetizado. La Tabla 12 representa un esquema general de la información obtenida al aplicar estas técnicas.

**Tabla 12.** Resumen de las Técnicas Espectroscópicas

| <b>Técnica espectroscópica</b>  | <b>Cuestionamiento</b>  | <b>Información obtenida</b>   |
|---|---|---|
| Espectrometría de masas (*)   | ¿Cuál es el peso molecular?<br>¿Qué fragmentos están relacionados?  | Obtención de la fórmula y estructura molecular a partir de sus fragmentaciones u iones obtenidos.   |
| Resonancia Magnética Nuclear (RMN <sup>1</sup> H y RMN <sup>13</sup> C) | ¿Cuál es la relación Carbono - Hidrógeno?<br>¿Estructura molecular? | Análisis más complejo sobre los grupos funcionales, estructuras, conectividades, estereoquímica, entre otros; mediante el análisis de los desplazamientos químicos, las áreas de los picos y constantes de acoplamiento. Relación en el tipo de enlace entre C e H. |
| Infrarrojo  | ¿Qué grupos funcionales están presentes?                            | Obtención de los grupos funcionales a partir de sus absorciones.  |
| Ultravioleta - Visible  | ¿Presenta un sistema de electrones $\pi$ conjugado?                 | Identificación de grupos cromóforos o sistemas conjugados en la molécula, mediante el análisis de su espectro de absorción.   |

(\*) La espectrometría de masas no es una técnica espectroscópica, debido a que no se involucra radiación electromagnética, ni absorción de radiación.

---

# CAPÍTULO III

---

## PARTE EXPERIMENTAL

---

---

## PRESENTACIÓN

El desarrollo de un trabajo de investigación emplea todas las etapas del método científico, la cual se enfoca en el trabajo preliminar, el trabajo experimental y en la publicación o reporte del estudio realizado. Es así que en este trabajo de investigación, como trabajo preliminar se seleccionó a los líquenes como el material de interés, siendo su recolección en el camino al nevado de Huaytapallana (Prov. de Huancayo, dpto. de Junín) en octubre del 2013 y 2015; y en cuya identificación botánica resultó ser el liquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. Una vez identificada se realizó la respectiva revisión bibliográfica de la muestra.

Como trabajo experimental, se realizó el tratamiento de la muestra (secado y molienda) para su posterior análisis cualitativo (Marcha Fitoquímica - Test de coloración para líquenes) identificando los principales metabolitos secundarios y los compuestos liquénicos presentes en la muestra, seguidamente se realizó la cuantificación del ácido úsnico, realizando pruebas por duplicidad para la veracidad de los resultados. En el aislamiento de los compuestos liquénicos se logró purificar el ácido úsnico y el ácido lecanórico mediante técnicas cromatográficas (CCF y CC), y su identificación fue por la interpretación de los espectros de RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, espectro de masas (obtenidos en los Laboratorios de Investigación del departamento de Química de la Universidad de Columbia), y de sus espectros UV e IR (obtenidos en el Laboratorio de Investigación de Síntesis de Materiales Avanzados de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería). Asimismo, el trabajo experimental fue realizado en el ambiente de Investigación de Química de los Productos Naturales ubicado en el Laboratorio N°12 de la Facultad de Ciencias, durante tres periodos de estudio. El primero de enero a marzo del 2014 (secado, molienda y el análisis cualitativo, entre 6 a 7 horas/día y de 2 a 3 días/semana); el segundo de julio a septiembre del 2014 (análisis cuantitativo del ácido úsnico, con 8 horas/día y de 2 días/semana); y el tercero de mayo del 2016 a agosto del 2017 (aislamiento y elucidación de los compuestos liquénicos).

Finalmente la presentación de esta tesis de licenciatura es la culminación de este trabajo de investigación.

## A. TRABAJO PRELIMINAR

### 1. Recolección de la muestra

La recolecta de la muestra liquénica fue realizada por la autora del trabajo de investigación en dos oportunidades. La primera recolección fue el día 19 de Octubre del 2013, esta muestra botánica colectada fue usada para su identificación botánica y para su análisis cualitativo y cuantitativo. La segunda recolección fue el 31 de Octubre del 2015, siendo la muestra colectada empleada para el aislamiento de los compuestos liquénicos.



**Foto 1.** Superior izquierda y derecha, Zona de recolección, Camino al nevado de Huaytapallana; Inferior derecha, muestra liquénica recolectada. Foto tomada por Judith Ramos (2013)

La muestra liquénica en estudio, fue colectada en un hábitat rocoso, sobre las rocas alrededor del lago de la zona (Foto 1 y Foto 2), camino al nevado de Huaytapallana, aproximadamente entre el Km. 17-18, con una altitud entre 4000-4500 msnm, siendo las coordenadas geográficas S 11° 58' 35", W 075° 05' 21", en el distrito de Huancayo, provincia de Huancayo y departamento de Junín. La zona de recolección presentaba un clima templado, idóneo para la proliferación de líquenes



**Foto 2.** Zona de recolecta, Huaytapallana, Dep. Junín, Prov. Huancayo, Distrito de Huancayo. Foto tomada por Judith Ramos (2015)


## **2. Determinación (Identificación) Botánica (Anexo 1)**

La determinación botánica del liquen fue realizada por el Blgo. Ángel Manuel Ramírez Ordaya (N° Col. Blgo. 6632), investigador del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Asimismo, una parte de la muestra liquénica fue ingresada al Herbario San Marcos con el código USM 279635.

A continuación, la Tabla 13 presenta la clasificación taxonómica de la muestra en estudio.



**Tabla 13.** Clasificación Taxonómica de la muestra Liquénica

| <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl.   |                                    |
|--|------------------------------------|
|  |                                    |
| Clasificación Taxonómica   |                                    |
| <b>Reino</b>   | Fungi                              |
| <b>Phylum</b>  | Ascomycota                         |
| <b>Clase</b>   | Lecanoromycetes                    |
| <b>Orden</b>   | Lecanorales                        |
| <b>Familia</b>   | Umbilicariaceae                    |
| <b>Género</b>  | Umbilicaria                        |
| <b>Especie</b>   | <i>Umbilicaria calvescens</i> Nyl. |

El líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl., es del tipo folioso, presenta un talo aplanado, es similar a algunas hojas, pero arrugadas en el centro (Ver Anexo 2). Su exterior (cara del líquen) es de color crema o marrón dependiendo del clima al que está expuesta, presentando manchas circulares de color negro, llamadas apotecios (zona reproductiva). Su interior (reverso del líquen) es de color marrón oscuro con minúsculas vellosidades, el cual está parcialmente adherido al sustrato, en nuestro caso a las rocas, por lo que la recolecta de la muestra puede realizarse sin necesidad de destruir el líquen. La forma de sujetarse al sustrato es por medio de sus diversos órganos apendiculares (vellosidades), los cuales captan el agua del sustrato y del medio ambiente que lo rodea.

## **B. TRABAJO EXPERIMENTAL**

### **3. Equipos y materiales**

#### **3.1. Universidad Nacional de Ingeniería, Facultad de Ciencias (Perú)**

- i. Espectrofotómetro SHIMADZU UV- 1800
- ii. Espectrofotómetro de IR, IRPrestige-21 SHIMADZU
- iii. Balanza analítica marca Denver Instrument (con un error de  $\pm 0.00005$  g)
- iv. Rotavapor Buch R-169
- v. Equipo de extracción Soxhlet
- vi. Ácido úsnico, 98% marca SIGMA-ALDRICH, empleado como reactivo patrón para el análisis cuantitativo (Ver Anexo 4)
- vii. Sílica gel marca SIGMA-ALDRICH para las Columnas Cromatográficas
- viii. Lámpara UV MODEL UVGL-58 MINERALIGHT LAMP, MULTIBAND UV-254/ 366 nm
- ix. Equipo de punto de Fusión Thermo Fisher Scientific 9100

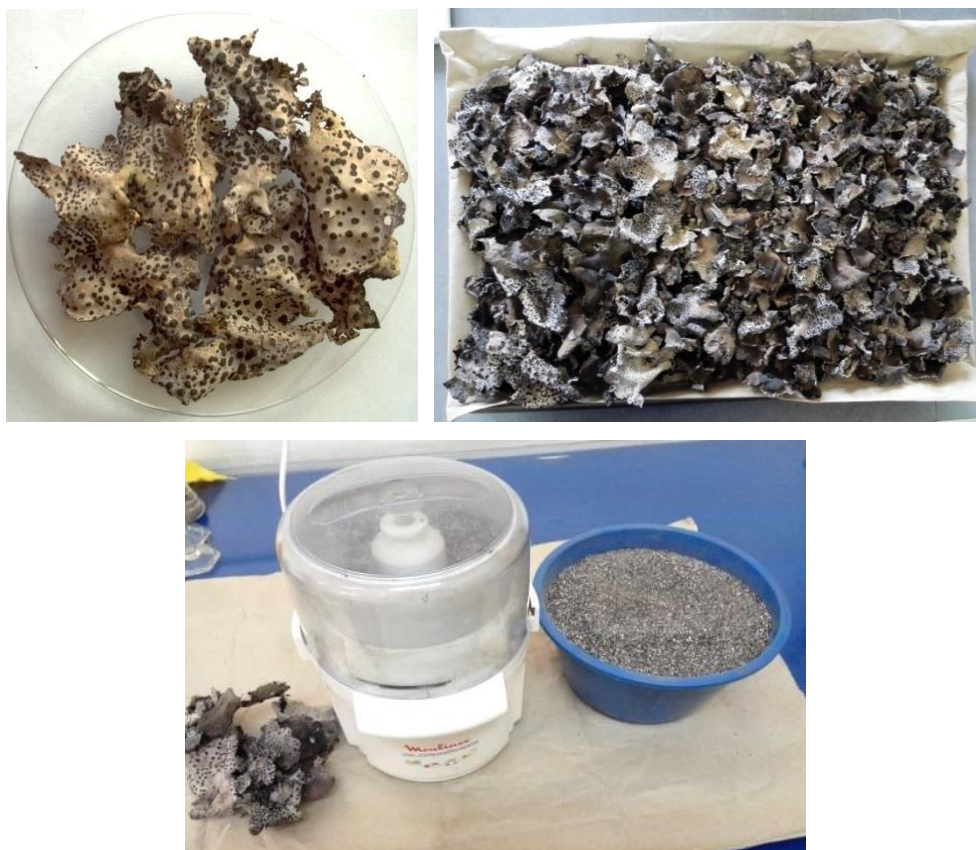
#### **3.2. Universidad de Columbia, Dpto. de Investigación de Química (E.E.U.U)**

- i. Espectrómetro de Masas MS ADVION COMPACT
- ii. Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance

### **4. Secado y molienda de la muestra**

El líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl, se limpió cuidadosamente en un periodo de 5 días y se secó en una estufa (Memmert) a 40°C durante 24 horas. Luego se procedió a su molienda por medio de una picadora doméstica (Moulinex), y para la obtención de una muestra homogénea se pasó la muestra pulverizada por un tamiz (malla de 500  $\mu$ m) y finalmente se guardó la muestra tratada en un frasco sellado.

La limpieza, secado y molienda de la muestra se realizó en el Laboratorio N°33 (Pabellón C) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería.



**Foto 3.** Superior, Muestra *U. calvescens* limpia y seca; Inferior, muestra pulverizada. Foto tomada por Judith Ramos (2016)

La Tabla 14, indica las cantidades iniciales y finales de la muestra líquénica obtenidas de las dos recolecciones.

**Tabla 14.** Cantidades de muestra recolectada

| Recolecta    | Fecha      | Peso Bruto | Masa seca | Masa Molida |
|--------------|------------|------------|-----------|-------------|
| 1° Recolecta | 19-10-2013 | 175.82 g   | 139.96 g  | 139.59 g    |
| 2° Recolecta | 31-10-2015 | 1314.44 g  | 953.06 g  | 945.26      |



## **5. Análisis Cualitativo**

### **5.1. Marcha Fitoquímica**

#### **a. Muestra**

A partir de 12 g de muestra seca y finamente pulverizada (6 g de muestra para cada análisis), se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios presentes en el líquen *U. calvescens*. Se realizó dos análisis para la comparación y precisión de los resultados.

**i. Primer análisis** : 16, 17 y 20 de Enero del 2014

**ii. Segundo análisis** : 26, 27 y 28 de Febrero del 2014

#### **b. Procedimiento Experimental**

El procedimiento realizado para la identificación de los diferentes principios activos o metabolitos secundarios presentes en la muestra líquénica fue la adaptada por el Dr. Victor M. Reyna Pinedo (1999)<sup>32</sup>, de acuerdo a la marcha fitoquímica de Rondina & Coussio (1969)<sup>33</sup>, el cual está basado en reacciones de coloración y precipitación. (Ver Anexo 5, procedimiento experimental y Anexo 7, diagrama del procedimiento experimental).

#### **c. Resultados (Anexo 8)**

Los resultados obtenidos de los dos análisis fueron similares, y se resumen a continuación:

**i. Contiene:** Aminogrupos primarios y/o secundarios, Grupos fenólicos libres, Taninos y Triterpenos y/o esteroides.

**ii. No contiene:** Flavonoides, Quinonas, Alcaloides, Leucoantocianidinas, Catequinas y Saponinas.

## **5.2. Test de coloración para compuestos liquénicos**

### **a. Muestra**

A partir de 1 g de muestra seca y finamente pulverizada se realizaron las pruebas específicas para la identificación de compuestos liquénicos (22 de Enero del 2014).

### **b. Procedimiento Experimental**

El procedimiento realizado para la identificación de compuestos liquénicos en la muestra *U. calvescens*, fue adaptado a nuestras condiciones de trabajo, de acuerdo al procedimiento experimental de Robles (1992)<sup>12</sup>, el cual se basa en reacciones de coloración, siendo algunas de estas muy rápidas de percibir por lo que es necesario seguir cuidadosamente todos los cambios. (Ver Anexo 6, Test de coloración de compuestos liquénicos y Anexo 7, diagrama del procedimiento experimental).

### **c. Resultados**

De acuerdo a la revisión bibliográfica sobre los compuestos liquénicos en el género *Umbilicaria* y al test de coloración realizado a la muestra, se confirmó y descartó los posibles compuestos liquénicos.

**i. Contiene:** Ácido úsnico, ácido lecanórico

**ii. No contiene:** Ácido norístico, ácido porfirílico, ácido picroliquénico.

---

## 6. Análisis cuantitativo del ácido úsnico en la muestra liquénica

### a. Muestra

4 muestras de 1 g cada una de la especie liquénica *U. calvescens* seco, pulverizado y tamizado (malla de 500  $\mu\text{m}$ ) se pesaron en una balanza analítica (Denver Instrument, con un error de  $\pm 0.00005$  g) en distintas fechas para la comparación y precisión de los resultados y del método.

Cada análisis se ejecutó con una diferencia de 10 días aproximadamente, en el cual se realizó una extracción sólido - líquido, seguido de una extracción soxhlet y de la respectiva lectura de la absorbancia de la solución muestra obtenida. Estas fechas fueron distribuidas de la siguiente manera:

- i. 1° y 2° análisis: 5, 7, 10, 12 y 14 de Febrero del 2014.
- ii. 3° y 4° análisis: 16, 18, 21, 23 y 25 de Julio del 2014.

### b. Procedimiento experimental

El procedimiento realizado para la cuantificación del ácido úsnico en la muestra *U. calvescens*, fue adaptado a nuestras condiciones de trabajo, de acuerdo al procedimiento experimental de Castro (2004)<sup>6</sup>, cuyas etapas principales son:

- i. La obtención de la longitud de onda de máxima absorbancia del ácido úsnico patrón (a partir de su espectro de absorción).
- ii. La determinación del rango de linealidad (preparación de la solución patrón y de los estándares del ácido úsnico).
- iii. El tratamiento de la muestra liquénica y su respectiva lectura.
- iv. La realización de los cálculos estadísticos de los datos experimentales.

El Anexo 7, presenta un esquema general de las etapas descritas.

**b.1. Obtención de la longitud de onda de máxima absorbancia del ácido úsnico patrón**

- i. Se preparó una solución de ácido úsnico patrón en un matraz aforado de 50 mL en medio clorofórmico.
- ii. Empleando el equipo UV (SHIMADZU UV- 1800) se realizó la lectura de la solución de ácido úsnico patrón en el intervalo de 200 a 400 nm; y se registró a 284 nm la máxima absorbancia a la cual el solvente no interfiere.

**b.2. Obtención del rango de linealidad para el ácido úsnico**

- i. La muestra de ácido úsnico patrón se secó en la estufa a 35°C durante una hora; luego se mantuvo guardado en un desecador, hasta el momento de ser pesado.
- ii. Se pesó 2.0 mg de ácido úsnico patrón, en un vaso de precipitado pequeño (aprox. 10 mL), empleando una balanza analítica (Denver Instrument).
- iii. El sólido pesado se disolvió en 8 mL de cloroformo y se vertió la solución en un matraz aforado de 50 mL. El vaso de precipitado se lavó con cloroformo varias veces de tal forma de no perder muestra. Finalmente, el matraz se enrasó con cloroformo, se agitó y se guardó en un ambiente seco y oscuro.
- iv. La concentración de la solución patrón fue de 40.0 µg/mL. A partir de esta concentración se prepararon los estándares de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 µg/mL en matraces aforados de 25 mL; luego se determinó la recta de calibración.

**b.3. Tratamiento de la muestra líquénica**

- i. Se pesó aproximadamente 1 g del líquen *U. calvescens* en papel de filtro “lento”; luego, el papel de filtro se dobló y se sellaron los extremos de tal manera de formar un sacó que contenga a la muestra. (Se realizaron 4 análisis, por lo que se pesó 4 muestras del líquen).
- ii. Cada muestra se colocó en un frasco de vidrio y se maceró con 150 mL de cloroformo a temperatura ambiente durante ocho días.

- iii. Los extractos obtenidos en la sección b.3.ii. (aprox. 150 mL en cada muestra) se colocaron con su respectiva muestra en un equipo Soxhlet y se añadió 50 mL de cloroformo a cada uno realizándose la extracción durante 4 horas.
- iv. Los extractos obtenidos en la sección b.3.iii. (aprox. 200 mL en cada muestra) se trasvasaron en un matraz aforado de 200 mL c/u y se enrasó con cloroformo.
- v. Se realizó una dilución 1/10 en un matraz aforado de 10 mL a cada una de las soluciones muestras obtenidas en la sección b.3.iv.; luego, se midió las absorbancias de cada dilución.

#### **b.4. Cálculos para la determinación del ácido úsnico**

- i. Cálculo de la concentración de la solución patrón

$$\text{Concentración de la solución patrón} = \frac{\text{Masa de ácido úsnico } (\mu\text{g})}{\text{Volumen del solvente (mL)}}$$

Donde Masa de ácido úsnico = 0.0020 g;

Volumen del Solvente = 50 mL de cloroformo

$$\therefore \text{Concentración de la solución patrón} = \frac{0.0020 \times 10^6 \mu\text{g}}{50 \text{ mL}} = 40.0 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

- ii. Cálculo de la concentración de los estándares

$$\text{Concentración}_i = \frac{\text{Volumen Patrón (mL)} \times \text{Concentración Patrón } (\mu\text{g/mL})}{\text{Volumen } i \text{ (mL)}}$$

Donde  $i = 1$  hasta 9 (número de estándares); Volumen patrón (Tabla 15);

Concentración Patrón = 40  $\mu\text{g/mL}$ ;

Volumen <sub>$i$</sub>  = 25 mL (para todos los estándares)

$$\therefore \text{Concentración}_{\text{Estándar } 1} = \frac{0.625 \text{ mL} \times 40 \text{ ppm}}{25 \text{ mL}} = 1.00 \text{ ppm}$$

iii. Curva de calibración para el ácido úsnico

- La Tabla 15 muestra las condiciones de trabajo y las absorbancias registradas para la obtención de la curva de calibración.

**Tabla 15.** Datos para la obtención de la curva de calibración

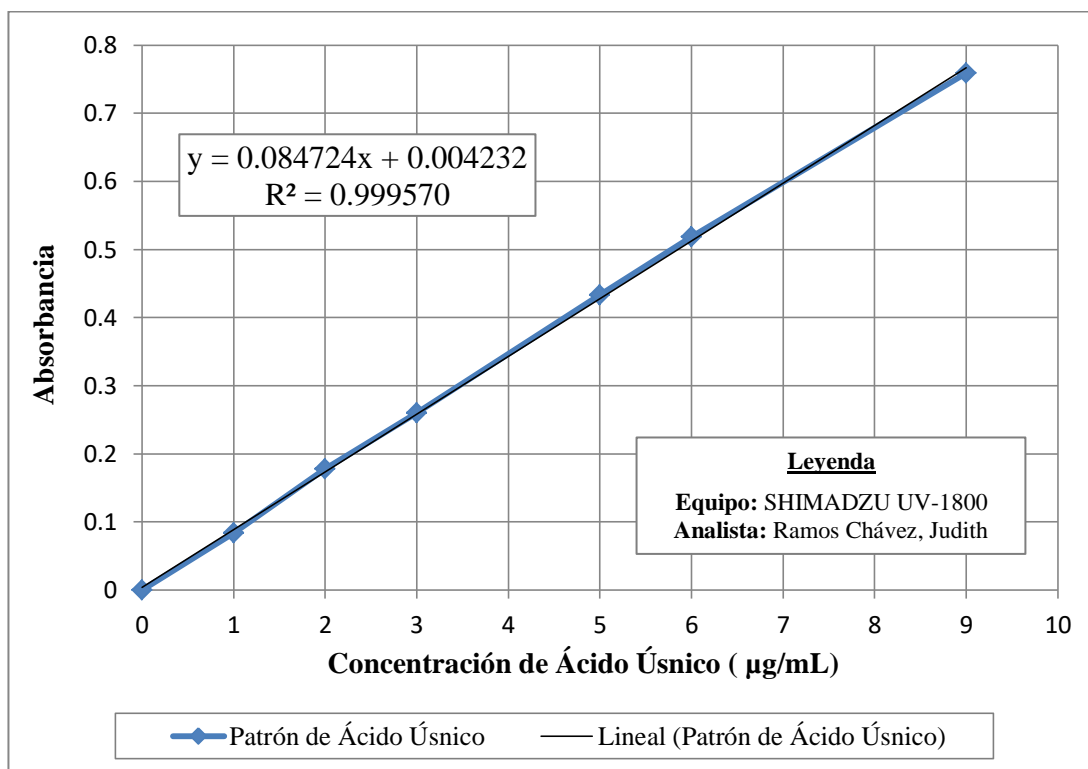
| SOLUCIÓN PATRÓN   |                                |                       |                       |                  |                  |
|-------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|------------------|
| Reactivo Patrón   | Solvente                       | Masa (mg)             | Concentración (µg/mL) | Equipo           | Longitud de onda |
| Ácido Úsnico, 98% | Cloroformo                     | 2                     | 40                    | SHIMADZU UV-1800 | 284 nm           |
| ESTÁNDARES        |                                |                       |                       |                  |                  |
| Estándar          | Volumen de patrón inicial (µL) | Concentración (µg/mL) |                       | Absorbancia      |                  |
| 1                 | 625                            | 1.00                  |                       | 0.084            |                  |
| 2                 | 1250                           | 2.00                  |                       | 0.178            |                  |
| 3                 | 1875                           | 3.00                  |                       | 0.261            |                  |
| 4                 | 2500                           | 4.00                  |                       | 0.356            |                  |
| 5                 | 3125                           | 5.00                  |                       | 0.433            |                  |
| 6                 | 3750                           | 6.00                  |                       | 0.518            |                  |
| 7                 | 4375                           | 7.00                  |                       | 0.586            |                  |
| 8                 | 5000                           | 8.00                  |                       | 0.659            |                  |
| 9                 | 5625                           | 9.00                  |                       | 0.759            |                  |

- En la Figura 25 se tiene la curva de calibración, obteniéndose como ecuación:

$$y = 0.084724x + 0.004232 \quad R^2 = 0.99957$$

Donde  $a = 0.004232$ ,  $b = 0.084724$

$y = \text{Absorbancia}$ ,  $x = \text{Concentración}$



**Figura 25.** Curva de Calibración para el Ácido Úsnico.

iv. Concentración del ácido úsnico en la muestra líquénica

- A partir de la curva de calibración se realizó el cálculo de la concentración y del porcentaje de ácido úsnico presentes en la muestra líquénica. Para lo cual se trabajó en una dilución 1/10 en todos los casos.
- Dilución 1/10, para la muestra M1 realizado por triplicado:

$$0.17933 = 0.084724x + 0.004232 \quad \rightarrow \quad x = 2.066 \mu\text{g/mL}$$

$$0.17933 = 0.084724x + 0.004232 \quad \rightarrow \quad x = 2.066 \mu\text{g/mL}$$

$$0.18002 = 0.084724x + 0.004232 \quad \rightarrow \quad x = 2.075 \mu\text{g/mL}$$

De igual forma se calculó las concentraciones para las muestras M2, M3 y M4, los cuales también se realizaron por triplicado cada una.

- De acuerdo a la siguiente fórmula se obtendrá el porcentaje de ácido úsnico.

$$\% \text{Ácido Úsnico} = \text{Concentración} \times \frac{\text{Vol. fiola dil. (mL)}}{\text{Alicuota retirada (mL)}} \times \frac{\text{Vol. fiola inicial (mL)}}{\text{Masa del Liquen (g)}} \times 10^{-6} \times 100\%$$

Donde Volumen del matraz aforado o fiola inicial = 200 mL;

Volumen del matraz aforado o fiola dilución = 10 mL;

Alícuota retirada = 1 mL (para todos los casos)

Siendo el porcentaje de ácido úsnico para la dilución 1/10 de la muestra M1 realizado por triplicado:

$$\% \text{Ácido Úsnico} = 2.066 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{10 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times \frac{200 \text{ mL}}{1.0006 \text{ g}} \times 10^{-6} \frac{\text{g}}{\mu\text{g}} \times 100\% = 0.412\%$$

$$\% \text{Ácido Úsnico} = 2.066 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{10 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times \frac{200 \text{ mL}}{1.0006 \text{ g}} \times 10^{-6} \frac{\text{g}}{\mu\text{g}} \times 100\% = 0.412\%$$

$$\% \text{Ácido Úsnico} = 2.075 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{10 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \times \frac{200 \text{ mL}}{1.0006 \text{ g}} \times 10^{-6} \frac{\text{g}}{\mu\text{g}} \times 100\% = 0.415\%$$

De igual forma se calculó el porcentaje de ácido úsnico para las muestras M2, M3 y M4, el promedio total y su respectiva incertidumbre. (Ver Anexo 11, Tratamiento Estadístico)<sup>44</sup>.

### c. Resultados (Anexo 9)

De acuerdo al tratamiento estadístico, se tiene evidencia suficiente para un nivel de confianza del 95% en indicar que el promedio del porcentaje de ácido úsnico total en el liquen *U. calvescens* es de  $0.409 \pm 0.007 \%$ .



---

## **7. Aislamiento de Compuestos Liguénicos**

**7.1. Muestra:** 500 g del liquen seco y molido de *Umbilicaria calvescens* Nyl.

### **7.2. Procedimiento**

#### **a. Extracción Sólido - Líquido (Obtención del Extracto Bruto Orgánico, EBO)**

Con la finalidad de extraer compuestos de distintas polaridades se realizaron extracciones consecutivas para la obtención del EBO con los solventes n-hexano y acetona. Este proceso fue realizado del 26 de Mayo al 8 de Julio del 2016.

A continuación se detalla la forma de obtención de cada extracto.

##### **a.1. Extracción con n-hexano (EBO - Fracción H)**

- i. En un frasco ámbar limpio y seco de 4 L, se maceró 500 g de la muestra liquénica con 1.7 L de n-hexano, durante 24 h a temperatura ambiente.
- ii. Luego se filtró por gravedad con papel filtro rápido y el extracto obtenido se colocó en un frasco ámbar de 2 L. El residuo sólido se volvió a macerar (Sec. iv).
- iii. El extracto hexánico se concentró en el rotavapor, obteniéndose 520 mg de EBO (se identificó como fracción H) y se guardó en un frasco ámbar pequeño (aprox. 20 mL); asimismo se recuperó 1.4 L de n-hexano.
- iv. El residuo sólido obtenido del filtrado (Sec. ii) se volvió a macerar con el n-hexano recuperado (aprox. 1.4 L), durante 24 h a temperatura ambiente.
- v. Se filtró por gravedad el residuo sólido. El extracto hexánico obtenido se concentró en el rotavapor y el EBO se agrupó con el EBO anterior (Sec. iii). Se obtuvo una masa final de 840 mg de EBO (Fracción H).
- vi. El residuo sólido obtenido del filtrado se colocó sobre papel de aluminio en una bandeja metálica y se secó durante 3 días a temperatura ambiente en la campana de extracción y luego en la estufa a 40°C durante 1h, de tal forma de eliminar completamente el n-hexano. Este residuo sólido será extraído en un solvente más polar, la acetona (Sec. a.2).

## a.2. Extracción con acetona (EBO - Fracción A)

- i. El residuo sólido seco obtenido (Sec. a.1) se colocó en un frasco ámbar de 4 L y se maceró con 1.8 L de acetona durante 24 h a temperatura ambiente.
- ii. Luego se filtró por gravedad con papel filtro rápido y el extracto obtenido se colocó en un frasco ámbar de 2 L. El residuo sólido se volvió a macerar (Sec. iv).
- iii. El extracto acetónico se concentró en el rotavapor, obteniéndose 70.42 g de EBO (se identificó como fracción A) y se guardó en un frasco ámbar pequeño (aprox. 40 mL); asimismo se recuperó 1.4 L de acetona.
- iv. El residuo sólido obtenido del filtrado (Sec. ii) se volvió a macerar con la acetona recuperada (aprox. 1.4 L), durante 24 h a temperatura ambiente.
- v. Se filtró por gravedad el residuo sólido. El extracto acetónico obtenido se concentró en el rotavapor y el EBO se agrupó con el EBO anterior (Sec. iii). Se obtuvo una masa final de 82.75 g de EBO (Fracción A).
- vi. El residuo sólido obtenido del filtrado se secó durante 4 días a temperatura ambiente en la campana de extracción y luego en la estufa a 40°C durante 1h, de tal forma de eliminar completamente la acetona



**Foto 4.** Izquierda, obtención del EBO. Derecha, Fracción A. Foto tomada por Judith Ramos (2016)

En resumen, se obtuvo 0.84 g de la Fracción H y 82.75 g de la Fracción A.

---

## **b. Separación y Purificación (obtención de los compuestos puros)**

Esta etapa se desarrolló en el Laboratorio N°12 de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, del 12 de Julio del 2016 al 10 de Enero del 2017. Para lo cual se realizó dos técnicas cromatográficas; estas son:

- i. Análisis preliminar por Cromatografía en Capa Fina (CCF)
- ii. Separación por Cromatografía en Columna (CC)

### **b.1. Análisis preliminar por Cromatografía en Capa Fina, CCF**

En esta etapa, se realizó un análisis preliminar por CCF para identificar los eluentes más adecuados para la purificación de los compuestos liquénicos por cromatografía en columna (CC); y cuyas condiciones son:

- i. **Muestra:** EBO - Fracciones A y H (obtenidas en la Sec. a)
- ii. **Muestra Patrón:** Ácido úsnico 98%, SIGMA-ALDRICH
- iii. **Absorbente:** Placa de aluminio Kieselgel 60F-254, 0.2 mm
- iv. **Eluentes:** Acetato de etilo: metanol (7:3)

Acetato de etilo: cloroformo (6:4)

Acetato de etilo: éter de petróleo (75:25; 50:50; 30:70)

Cloroformo: metanol (1:1, 6:4)

- v. **Revelador:** Lámpara UV, 254-365 nm / Ácido sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50%
- vi. **Procedimiento:** Se realizó el sembrado de las fracciones A y H junto con el patrón de ácido úsnico de acuerdo a los procedimientos descritos en los textos sobre técnicas básicas de laboratorio en química orgánica\*.
- vii. **Resultados:** Se detectaron más de 8 manchas, entre las cuales el valor de R<sub>f</sub> de una de ellas coincidió con la del patrón; por lo que se menciona al ácido úsnico como uno de los compuestos liquénicos presentes en el líquen *U. calvescens*.

---

\* Texto referencial: Compendio de Química Orgánica Experimental I, del Dr. Victor Reyna Pinedo.

## **b.2. Separación por Cromatografía en Columna, CC - Sílica gel**

Con la finalidad de obtener los compuestos liquénicos mayoritarios, se desarrolló como técnica cromatográfica la cromatografía en columna (CC - Sílica gel) en las fracciones A y H (obtenidos en la Sec. a); asimismo, se realizó nuevamente la CCF para la reagrupación de las sub-fracciones obtenidas en la CC.

A continuación se describen el procedimiento y las condiciones en las que se trabajaron las columnas cromatográficas (CC) para las fracciones A y H.

### **b.2.1. Fracción A**

Para la purificación de los compuestos mayoritarios se realizaron sucesivamente 3 columnas cromatográficas.

#### **➤ Primera Columna Cromatográfica**

**i. Muestra:** 500 mg de EBO-Fracción A\*

**ii. Características de la columna:**  $\phi = 3.9$  cm,  $h = 14.5$  cm

**iii. Adsorbente:** Sílica gel, tamaño de poro 60 Å, tamaño de partícula 35 - 75  $\mu\text{m}$  (marca SIGMA-ALDRICH).

**iv. Eluente:** Acetato de etilo (520 mL, elución isocrática) y metanol (80 mL)

#### **v. Procedimiento:**

- En un balón de 250 mL se colocó 500 mg de EBO-Fracción A con 16.46 g de sílica gel y 35 mL de acetona; se mezcló hasta obtener una papilla homogénea y se llevó a sequedad en el rotavapor; luego, se molió homogéneamente en un mortero la “muestra a separar”.
- Se preparó la columna, con sílica gel en acetato de etilo, y se agregó en la superficie la “muestra a separar” (previamente obtenido de la papilla).

---

\* La cantidad total del EBO-Fracción A obtenido en la Sec. a.1 fue de 82.75 g; sin embargo, se utilizó 500 mg para el desarrollo de la CC.

- Luego se agregó cuidadosamente el eluyente acetato de etilo, recolectándose las sub-fracciones en matraz erlenmeyer de 20 mL (6 primeras sub-fracciones) y tubos de ensayo de 13x100 mm; al final se añadió metanol recolectándolo en un matraz erlenmeyer de 150 mL (última sub-fracción).

Se recolectaron 47 sub-fracciones, las cuales al ser analizadas por CCF fueron reagrupadas en 5 grupos y se concentraron en un rotavapor (Tabla 16).

**Tabla 16.** Separación por CC de la Fracción A (1° Columna)

| Grupo (G) | Sub-fracciones (F) | Masa (mg) |
|-----------|--------------------|-----------|
| G1        | F1-F2              | 20        |
| G2        | F3-F4              | 120       |
| G3        | F5-F24             | 300       |
| G4        | F25-46             | 20        |
| G5        | F47                | 40        |

De acuerdo a la CCF, los grupos G3 y G4 tenían un compuesto mayoritario similar en Rf; sin embargo, el grupo G3, el cual presenta mayor masa, mostraba aun trazas de otros compuestos por lo que se optó a realizar otra CC con distinto eluyente.

#### ➤ Segunda Columna Cromatográfica

- i. **Muestra:** 300 mg del grupo G3, obtenida en la 1° columna de la Fracción A
- ii. **Características de la columna:**  $\phi = 3.9$  cm; h = 14.5 cm
- iii. **Adsorbente:** Sílica gel (marca SIGMA-ALDRICH)
- iv. **Eluyente:** Acetato de etilo: éter de petróleo (75:25; 457.5 mL y 152.5 mL) y metanol (80 mL)
- v. **Procedimiento:**
  - En un balón de 250 mL se colocó 300 mg de G3 con 10.12 g de sílica gel y 16 mL de acetona; se mezcló hasta obtener una papilla homogénea y se llevó a sequedad

en el rotavapor; luego, se molió homogéneamente en un mortero la “muestra a separar”.

- Se preparó la columna con sílica gel en medio de acetato de etilo: éter de petróleo (75:25), y se agregó en la superficie la “muestra a separar” (previamente obtenido de la papilla).
- Luego se agregó cuidadosamente con una pipeta pasteur el eluyente de acetato de etilo: éter de petróleo (75:25), recolectándose las sub-fracciones en matraz erlenmeyer de 20 mL y tubos de ensayo de 13x100 mm; al final se añadió metanol recolectándolo en un matraz erlenmeyer de 150 mL.

Se recolectaron 57 sub-fracciones, las cuales al ser analizadas por CCF fueron reagrupadas en 5 grupos y se concentraron en un rotavapor (Tabla 17).

**Tabla 17.** Separación por CC de la Fracción A (2° Columna)

| <b>Grupo (S)</b> | <b>Sub-fracciones (F)</b> | <b>Masa (mg)</b> |
|------------------|---------------------------|------------------|
| S1               | F1-F2                     | <10              |
| S2               | F3                        | 10               |
| S3               | F4-F9                     | <10              |
| S4               | F10-F14                   | <10              |
| S5               | F15-F30                   | 160              |
| S6               | F31-F56                   | 100              |
| S7               | F57                       | 10               |

El compuesto mayoritario de los grupos S5 y S6 coincidía con el Rf del G4, sin embargo, el grupo S6 aún mostraba leves trazas, por lo que se optó en realizar una tercera CC. Tener en cuenta que se realizará una posterior recrystalización por lo que se desea conseguir la mayor cantidad posible de compuesto y evitar la pérdida del mismo.

➤ **Tercera Columna Cromatográfica**

- i. Muestra:** 100 mg del grupo S6, obtenida en la 2° columna de la Fracción A
- ii. Características de la columna:**  $\phi = 2.1$  cm;  $h = 19$  cm
- iii. Adsorbente:** Sílica gel (marca SIGMA-ALDRICH)
- iv. Eluyente:** Acetato de etilo: éter de petróleo (50:50; 170 mL c/u) y metanol (80 mL)
- v. Procedimiento:**

- En un balón de 50 mL se colocó 100 mg de S6 con 3.2 g de sílica gel y 5 mL de acetona; se mezcló hasta obtener una papilla homogénea y se llevó a sequedad en el rotavapor; luego, se molió en un mortero la “muestra a separar”.
- Se preparó la columna con sílica gel en medio de acetato de etilo: éter de petróleo (50:50), y se agregó en la superficie la “muestra a separar”.
- Luego se agregó cuidadosamente con una pipeta pasteur el eluyente de acetato de etilo: éter de petróleo (50:50), recolectándose las sub-fracciones en matraz erlenmeyer de 20 mL y tubos de ensayo de 13x100 mm; al final se añadió metanol recolectándolo en un matraz erlenmeyer de 150 mL.

Se recolectaron 40 sub-fracciones, las cuales al ser analizadas por CCF fueron reagrupadas en 4 grupos y se concentraron en un rotavapor (Tabla 18).

**Tabla 18.** Separación por CC de la Fracción A (3° Columna)

| Grupo (T) | Sub-fracciones (F) | Masa (mg) |
|-----------|--------------------|-----------|
| T1        | F1-F11             | < 5       |
| T2        | F12-F19            | 35        |
| T3        | F20-F39            | 30        |
| T4        | F40                | 30        |

El compuesto del grupo T3 coincidió con el Rf del G4, por lo que se guardó en un ambiente seco para su posterior análisis junto con los grupos G4 y S5 (Anexo 10).

---

### **b.2.2. Fracción H**

Para la purificación de los compuestos mayoritarios se realizaron sucesivamente 2 columnas cromatográficas.

#### **➤ Primera Columna Cromatográfica**

**i. Muestra:** 840 mg de EBO-Fracción H, obtenida en la Sec. a.1

**ii. Características de la columna:**  $\phi = 3.9$  cm,  $h = 14.5$  cm

**iii. Adsorbente:** Sílica gel (marca SIGMA-ALDRICH).

**iv. Eluente:** Acetato de etilo: éter de petróleo (15:85, 200 mL; 20:80, 200 ml; 35:75, 100 mL; 50:50, 200 mL), acetato de etilo (300 mL) y metanol (100 mL)

#### **v. Procedimiento:**

- En un balón de 250 mL se colocó 840 mg de EBO-Fracción H con 7.2 g de sílica gel y 15 mL de acetona; se mezcló hasta obtener una papilla homogénea y se llevó a sequedad en el rotavapor; luego, se molió homogéneamente en un mortero la “muestra a separar”.
- Se preparó la columna con sílica gel en medio de acetato de etilo: éter de petróleo (15:85), y se agregó en la superficie la “muestra a separar”.
- Luego se realizó una elución en gradiente con creciente de polaridad, para lo cual se agregó cuidadosamente con una pipeta pasteur el eluente de acetato de etilo: éter de petróleo a las concentraciones de 15:85; 20:80; 35:75; 50:50; y acetato de etilo; recolectándose las sub-fracciones en tubos de ensayo de 13x100 mm; al final se añadió metanol recolectándolo en un matraz erlenmeyer de 250 mL (última sub-fracción).

Se recolectaron 79 sub-fracciones, las cuales al ser analizadas por CCF fueron reagrupadas en 7 grupos y se concentraron en un rotavapor (Tabla 19).



**Tabla 19.** Separación por CC de la Fracción H (1° Columna)

| <b>Grupo (I)</b> | <b>Sub-fracciones (F)</b> | <b>Masa (mg)</b> |
|------------------|---------------------------|------------------|
| I1               | F1-F3                     | 140              |
| I2               | F4-F10                    | 220              |
| I3               | F11-F50                   | 340              |
| I4               | F51-F62                   | 40               |
| I5               | F63-F69                   | 30               |
| I6               | F70-F78                   | 50               |
| I7               | F79                       | 20               |

Los grupos I1 hasta I7 fueron comparados con el Rf del patrón de ácido úsnico por medio de una CCF, observándose que el Rf de uno de los compuestos del grupo I3 coincidía con la del patrón; sin embargo, aún se tenían leves trazas de otro compuesto por lo que se optó en realizar una segunda CC con distinto eluente.

➤ **Segunda Columna Cromatográfica**

- i. Muestra:** 340 mg del grupo I3, obtenida en la 1° columna de la Fracción H.
- ii. Características de la columna:**  $\phi = 2.7$  cm; h = 19 cm
- iii. Adsorbente:** Sílica gel (marca SIGMA-ALDRICH)
- iv. Eluente:** Acetato de etilo: éter de petróleo (30:70; 111 mL y 259 mL) y metanol (100 mL)
- v. Procedimiento:**
  - En un balón de 250 mL se colocó 340 mg de I3 con 6 g de sílica gel y 10 mL de acetona; se mezcló hasta obtener una papilla homogénea y se llevó a sequedad en el rotavapor; luego, se molió homogéneamente en un mortero la “muestra a separar”.

- Se preparó la columna con sílica gel en medio de acetato de etilo: éter de petróleo (30:70), y se agregó en la superficie la “muestra a separar” (previamente obtenido de la papilla).
- Luego se agregó cuidadosamente con una pipeta pasteur el eluyente de acetato de etilo: éter de petróleo (30:70), recolectándose las sub-fracciones en tubos de ensayo de 13x100 mm; al final se añadió metanol recolectándolo en un matraz erlenmeyer de 150 mL.

Se recolectaron 35 sub-fracciones, las cuales al ser analizadas por CCF fueron reagrupadas en 4 grupos y se concentraron en un rotavapor (Tabla 20).

**Tabla 20.** Separación por CC de la Fracción H (2° Columna)

| <b>Grupo (U)</b> | <b>Sub-fracciones (F)</b> | <b>Masa (mg)</b> |
|------------------|---------------------------|------------------|
| U1               | F1-F6                     | 10               |
| U2               | F7-F17                    | 30               |
| U3               | F18-F35                   | 100              |
| U4               | F36                       | 60               |

De esta segunda columna cromatográfica, el grupo U3 presentó un Rf similar al patrón de ácido úsnico, por lo que se lo guardó en un ambiente seco para su posterior análisis.

Los sólidos obtenidos en los grupos G4, S5, T3 (obtenidos en la separación por CC de la Fracción A) y U3 (obtenido en la separación por CC de la fracción H) fueron secados a 35°C durante 30 min; luego, se midió el punto de fusión de cada uno, observándose similitudes entre los grupos G4, S5 y T3 por lo que fueron juntadas y rotuladas como Compuesto L con masa total de 210 mg; mientras el grupo U3 se rotuló como Compuesto U con masa total de 100 mg.

**c. Recristalización****c.1. Recristalización del Compuesto U**

**i. Muestra:** 100 mg del Compuesto U

**ii. Solventes:** etanol (100 mL)

**iii. Procedimiento**

- En un vaso de precipitado de 100 mL se calentó etanol a 45°C, luego se añadió poco a poco 100 mg del compuesto U, y se agitó hasta su disolución.
- Se enfrió a temperatura ambiente durante 3 minutos y después en un recipiente con hielo durante 45 minutos, observándose la formación de cristales amarillos.
- Se filtró con papel de filtro lento, lavando el sólido con etanol frío; los cristales obtenidos se secaron a 35°C, luego, se guardó en un desecador y en un ambiente oscuro para su posterior análisis.

**iv. Resultado:** 86 mg del compuesto U recristalizado.

**c.2. Recristalización del Compuesto L**

**i. Muestra:** 210 mg del Compuesto L

**ii. Solventes:** acetona: agua (1:1; 100 mL c/u)

**iii. Procedimiento**

- En un vaso de precipitado de 100 mL se calentó acetona: agua (1:1) a 45°C, luego se añadió poco a poco 160 mg del compuesto L, y se agitó hasta su disolución.
- Se enfrió a temperatura ambiente durante 2 minutos y después en un recipiente con hielo durante 30 minutos, observándose un precipitado blanco.
- Se filtró con papel de filtro lento, lavando el sólido con acetona: agua (1:1) fría; el sólido obtenido se secó a 35°C; luego, se guardó en un desecador y en un ambiente oscuro para su posterior análisis.

**iv. Resultado:** 206 mg del compuesto L recristalizado.

---

## 8. Identificación Clásica y Espectroscópica de los Compuestos Aislados

La identificación de los compuestos U y L aislados del líquen *U. calvescens* se realizó mediante métodos clásicos (características físicas y punto de fusión); y la determinación estructural a través del análisis de sus espectros de Masas (EM), RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, IR y UV.

### 8.1. Identificación Clásica del Compuesto U

La muestra analizada fue el sólido cristalino obtenido en la Sec. 7, c.1. (Pág. 92).

#### a. Características del compuesto

- i. **Físicamente:** Sólido cristalino de color amarillo
- ii. **Solubilidad:** Soluble en cloroformo y acetona, poco soluble en metanol y etanol.
- iii. **Reactividad con KOH:** Coloración amarillenta

#### b. Determinación del Punto de Fusión

##### b.1. Condiciones de trabajo

- i. **Equipo:** Punto de Fusión Thermo Fisher Scientific 9100
- ii. **Laboratorio:** Laboratorio N°12, Facultad de Ciencias, UNI
- iii. **Operador:** Judith Ramos Chávez
- iv. **Fecha:** 10 de Enero del 2017

##### b.2. Resultados

- i. **Punto de fusión:** 204°C - 205°C
- ii. **Referencias:** Ver Cap. II, Sec. B, 3.1., Pág. 22.

##### b.3. Conclusión

Este valor coincide con la del ácido úsnico según las literaturas revisadas.

---

### **c. Comportamiento cromatográfico (Cromatografía en Capa Fina - CCF)**

#### **c.1. Condiciones de trabajo**

- i. Laboratorio:** Laboratorio N°12, Facultad de Ciencias, UNI
- ii. Operador:** Judith Ramos Chávez
- iii. Fecha:** 25 de Noviembre del 2016
- iv. Adsorbente:** Placa de aluminio Kieselgel 60F-254, 0.2 mm
- v. Eluyente:** etanol: acetona (1:1)
- vi. Revelador:** Luz UV (Lámpara UV MODEL UVGL-58) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%

#### **c.2. Resultados**

Presentó un R<sub>f</sub> de 0.62 (Ver Cap. II. Sec. B, 3.1., Pág. 23)

#### **c.3. Conclusión**

Este valor es comparable con la del ácido úsnico reportada por Castro (2004).

### **8.2. Identificación Clásica del Compuesto L**

La muestra analizada fue el sólido obtenido en la Sec. 7, c.2. (Pág. 92).

#### **a. Características del compuesto**

- i. Físicamente:** Sólido de color blanco
- ii. Solubilidad:** Soluble en metanol y acetona, poco soluble en cloroformo.
- iii. Reactividad con Ca(ClO)<sub>2</sub>:** Coloración rojiza, lo cual es característico en los compuestos que presentan dos grupos hidroxilo (posición meta) en uno de sus anillos como en el caso del ácido lecanórico (ver Cap. II, Sec. C, 1.b, Pág. 48).

#### **b. Determinación del Punto de Fusión**

##### **b.1. Condiciones de trabajo**

- i. Equipo:** Punto de Fusión Thermo Fisher Scientific 9100

**ii. Laboratorio:** Laboratorio N°12, Facultad de Ciencias, UNI

**iii. Operador:** Judith Ramos Chávez

**iv. Fecha:** 10 de Enero del 2017

### **b.2. Resultados**

**i. Punto de fusión:** 182°C - 184°C

**ii. Referencias:** Ver Cap. II, Sec. B, 3.2., Pág. 23.

### **b.3. Conclusión**

El punto de fusión obtenido para el compuesto L coincide con el rango del punto de fusión del ácido lecanórico según las literaturas revisadas.

## **c. Comportamiento cromatográfico (Cromatografía en Capa Fina - CCF)**

### **c.1. Condiciones de trabajo**

**i. Laboratorio:** Laboratorio N°12, Facultad de Ciencias, UNI

**ii. Operador:** Judith Ramos Chávez

**iii. Fecha:** 25 de Noviembre del 2016

**iv. Adsorbente:** Placa de aluminio Kieselgel 60F-254, 0.2 mm

**v. Eluyente:** n-hexano: acetato de etilo (80:20)

**vi. Revelador:** Luz UV (Lámpara UV MODEL UVGL-58) y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10%

### **c.2. Resultado**

Presentó un R<sub>f</sub> de 0.29 (Ver Cap. II, Sec. B, 3.2., Pág. 23)

### **c.3. Conclusión**

Este valor es comparable con la del ácido lecanórico reportada por Jayaprakasha (1998)

### 8.3. Identificación Espectroscópica del Compuesto U

#### a. Espectro de Masas, EM (Figura 26)

##### a.1. Condiciones de trabajo

i. **Equipo:** Espectrómetro de masas MS ADVION COMPACT

ii. **Modo de Ionización:** APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

iii. **Laboratorio:** Departamento de Investigación de Química, Universidad de Columbia, NY, EE.UU.

iv. **Operador:** M. Sc. Pedro A. Baldera Aguayo, ex-alumno de la EPQ-FC

v. **Concentración de la muestra:** 7 mg/ 1.5 mL de acetona

vi. **Fecha:** 15 de Marzo del 2017

##### a.2. Características del espectro

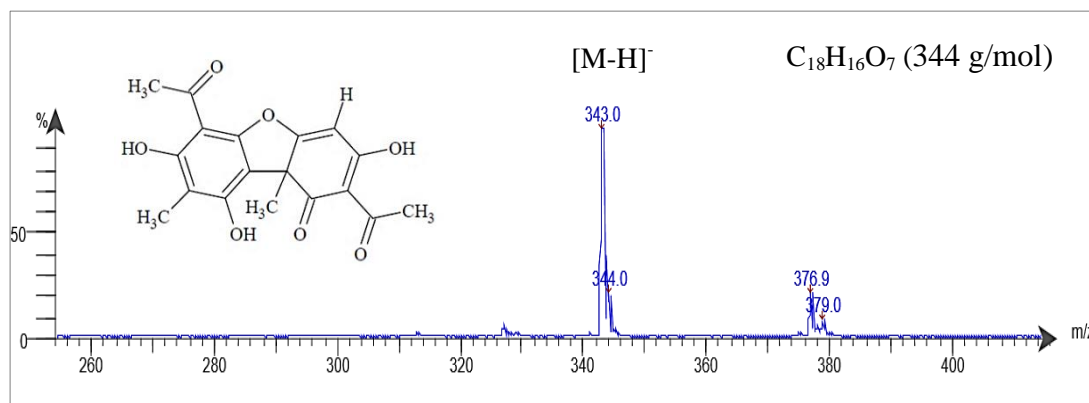
m/z: 379, 377, 344, 343 (pico base, 100%)

##### a.3. Análisis del espectro

En el espectro de masas obtenido para el compuesto U se observó un ión molecular  $[M-H]^-$  a m/z 343, el cual es concordante para la fórmula molecular  $C_{18}H_{16}O_7$  (344 g/mol); esto es debido a que el análisis es mediante la técnica APCI en modo negativo, donde la información que nos proporciona el pico base (m/z 343) luego de restar (ión positivo) el portador de carga es la del peso molecular. En el Anexo 3 se describe la técnica APCI. Adicionalmente, en el espectro se tiene un ión a m/z 379 el cual es un aducto formado por la presencia del  $NH_4^+$ .

##### a.4. Conclusión

El espectro de masas (APCI) obtenido en modo negativo brinda información del peso molecular del compuesto U (344 g/mol) siendo este valor correspondiente para el ácido úsnico.



**Figura 26.** EM (APCI) del compuesto U aislado del liquen *U. calvescens*.

## b. Espectro de RMN<sup>1</sup>H - CDCl<sub>3</sub> (Figura 27)

### b.1. Condiciones de trabajo

- i. **Equipo:** Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance
- ii. **Laboratorio:** Departamento de Investigación de Química, Universidad de Columbia, NY, EE.UU.
- iii. **Operador:** M. Sc. Pedro A. Baldera Aguayo, ex-alumno de la EPQ-FC
- iv. **Solvente:** Cloroformo deuterado, CDCl<sub>3</sub>
- v. **Fecha:** 26 de Agosto del 2017

### b.2. Características del espectro

Desplazamientos químicos ( $\delta$ ): 1.79 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.13 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.69 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.70 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 6.00 ppm (s, 1H, Ar-H), 7.26 ppm (CDCl<sub>3</sub>), 11.05 ppm (s, 1H, OH), 13.34 ppm (s, 1H, OH) y 18.86 ppm (s, 1H, OH).

### b.3. Análisis del espectro

En la Tabla 21, se indica el número de señales diferentes, la integración o el número de hidrógeno de cada tipo de señal, sus desplazamientos correspondientes y



el acoplamiento espín-espín o interacción de los hidrógenos vecinos obtenidos del espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto U.

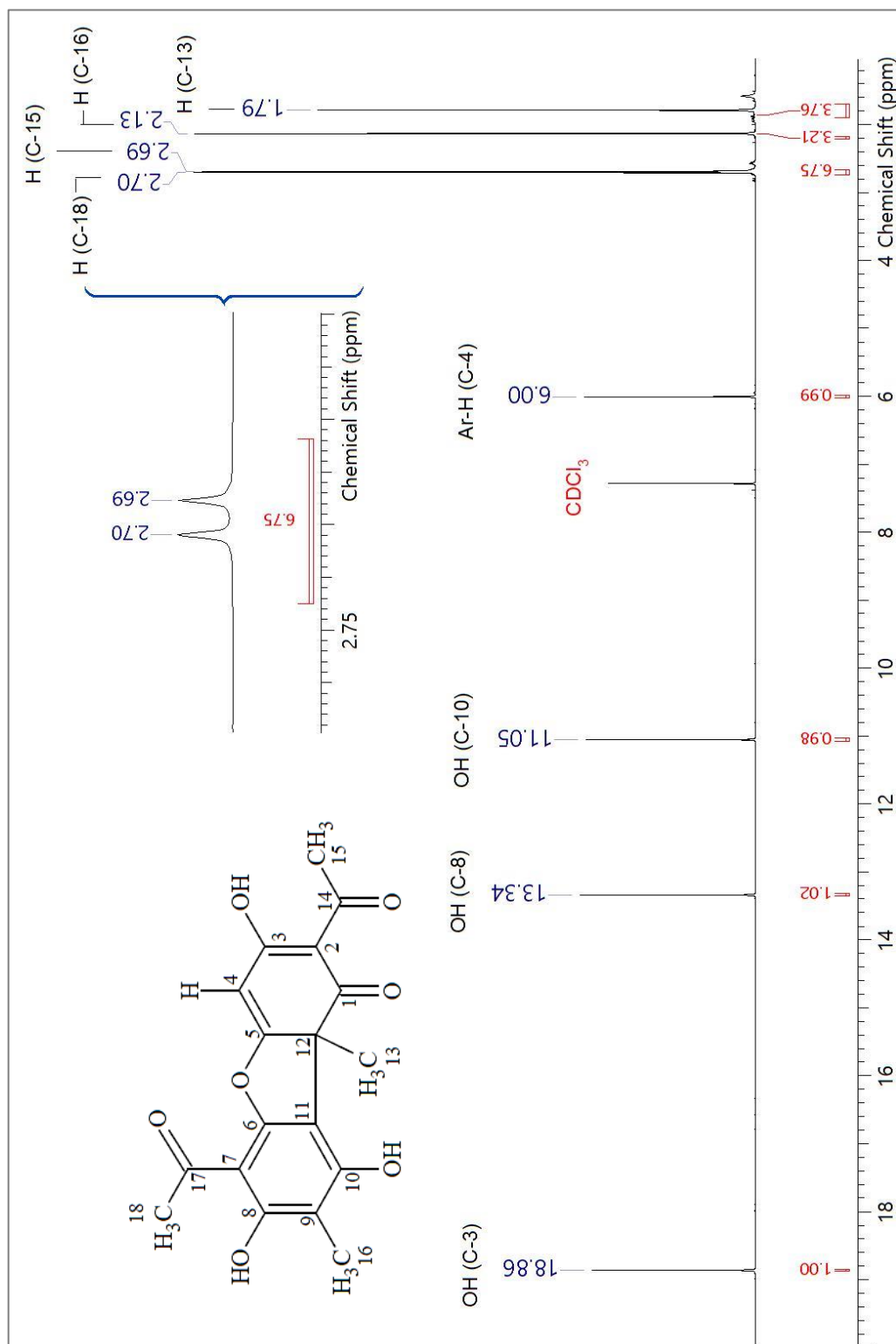
Estos valores son comparables con los reportados por Córdor (2012) y Viteri (2015), este último adicionalmente reporta el hidrógeno del tercer grupo OH (C-3) a 18.82 ppm (Ver Capítulo II, Sección B, 4.1., Pág. 27).

**Tabla 21.** Datos del espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Compuesto U

| Tipo de Hidrógeno       | Integración | Desplazamiento (δ , ppm) | Acoplamiento espín-espín |
|-------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|
| -CH <sub>3</sub> (C-13) | 3H          | 1.79                     | singlete                 |
| -CH <sub>3</sub> (C-16) | 3H          | 2.13                     | singlete                 |
| -CH <sub>3</sub> (C-15) | 3H          | 2.69                     | singlete                 |
| -CH <sub>3</sub> (C-18) | 3H          | 2.70                     | singlete                 |
| Ar-H (C-4)              | 1H          | 6.00                     | singlete                 |
| -OH (C-10)              | 1H          | 11.05                    | singlete                 |
| -OH (C-8)               | 1H          | 13.34                    | singlete                 |
| -OH (C-3)               | 1H          | 18.86                    | singlete                 |

#### b.4. Conclusión

El espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto U corresponde a lo esperado para la estructura del ácido úsnico. Además, existe correspondencia para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía.



**Figura 27.** Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del Compuesto U aislado del líquen *U. calvescens*.

---

**c. Espectro de RMN<sup>13</sup>C - CDCl<sub>3</sub>****c.1. Condiciones de trabajo**

- i. Equipo:** Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance
- ii. Laboratorio:** Departamento de Investigación de Química, Universidad de Columbia, NY, EE.UU.
- iii. Operador:** M. Sc. Pedro A. Baldera Aguayo, ex-alumno de la EPQ-FC
- iv. Solvente:** Cloroformo deuterado, CDCl<sub>3</sub>
- v. Fecha:** 26 de Agosto del 2017

**c.2. Características de los espectros****i. Espectro de RMN<sup>13</sup>C de protones desacoplado de banda ancha (Figura 28)**

( $\delta$ ): 7.55, 27.91, 31.29, 32.13, 59.09, 77.36 (CDCl<sub>3</sub>), 98.35, 101.55, 103.96, 105.25, 109.35, 155.22, 157.52, 163.91, 179.40, 191.73, 198.07, 200.34 y 201.79 ppm.

**ii. Espectro de RMN<sup>13</sup>C DEPT-90 (Figura 29)**

( $\delta$ ): 98.35 ppm.

**iii. Espectro de RMN<sup>13</sup>C DEPT-135 (Figura 30)**

( $\delta$ ): 7.55, 27.91, 31.30, 32.14 y 98.35 ppm.

**c.3. Análisis de los espectros de RMN<sup>13</sup>C, DEPT-90 y DEPT-135****i. Carbono cuaternario (C)**

Las trece señales registradas en el espectro RMN<sup>13</sup>C de protones desacoplado de banda ancha corresponden a los 13 carbonos cuaternarios del ácido úsnico.

---

( $\delta$ ): 59.09 (C-12), 101.55 (C-5), 103.96 (C-9), 105.25 (C-11), 109.35 (C-7), 155.22 (C-3), 157.52 (C-8), 163.91 (C-10), 179.40 (C-2), 191.73 (C-6), 198.07 (C-1), 200.34 (C-14) y 201.79 ppm (C-17).

## **ii. Carbonos primarios (CH<sub>3</sub>)**

Las cuatro señales registradas en los espectros de RMN<sup>13</sup>C y DEPT-135 corresponden a los 4 carbonos primarios presentes en el ácido úsnico.

( $\delta$ ): 7.55 (C-16), 27.91 (C-13), 31.29 (C-18) y 32.13 ppm (C-15).

## **iii. Carbonos secundarios (CH<sub>2</sub>)**

De acuerdo al espectro de RMN<sup>13</sup>C DEPT-135, no se registra ninguna señal en la parte inferior que indique la presencia de algún carbono secundario.

## **iv. Carbono terciarios (CH)**

La única señal registrada en los espectros de RMN<sup>13</sup>C, DEPT-90 y DEPT-135 corresponde al carbono terciario presente en el ácido úsnico.

( $\delta$ ): 98.35 ppm (C-4).

La Tabla 22 indica los desplazamientos químicos y la disposición del tipo de carbono obtenido de los espectros RMN<sup>13</sup>C, DEPT-90 y DEPT-135.

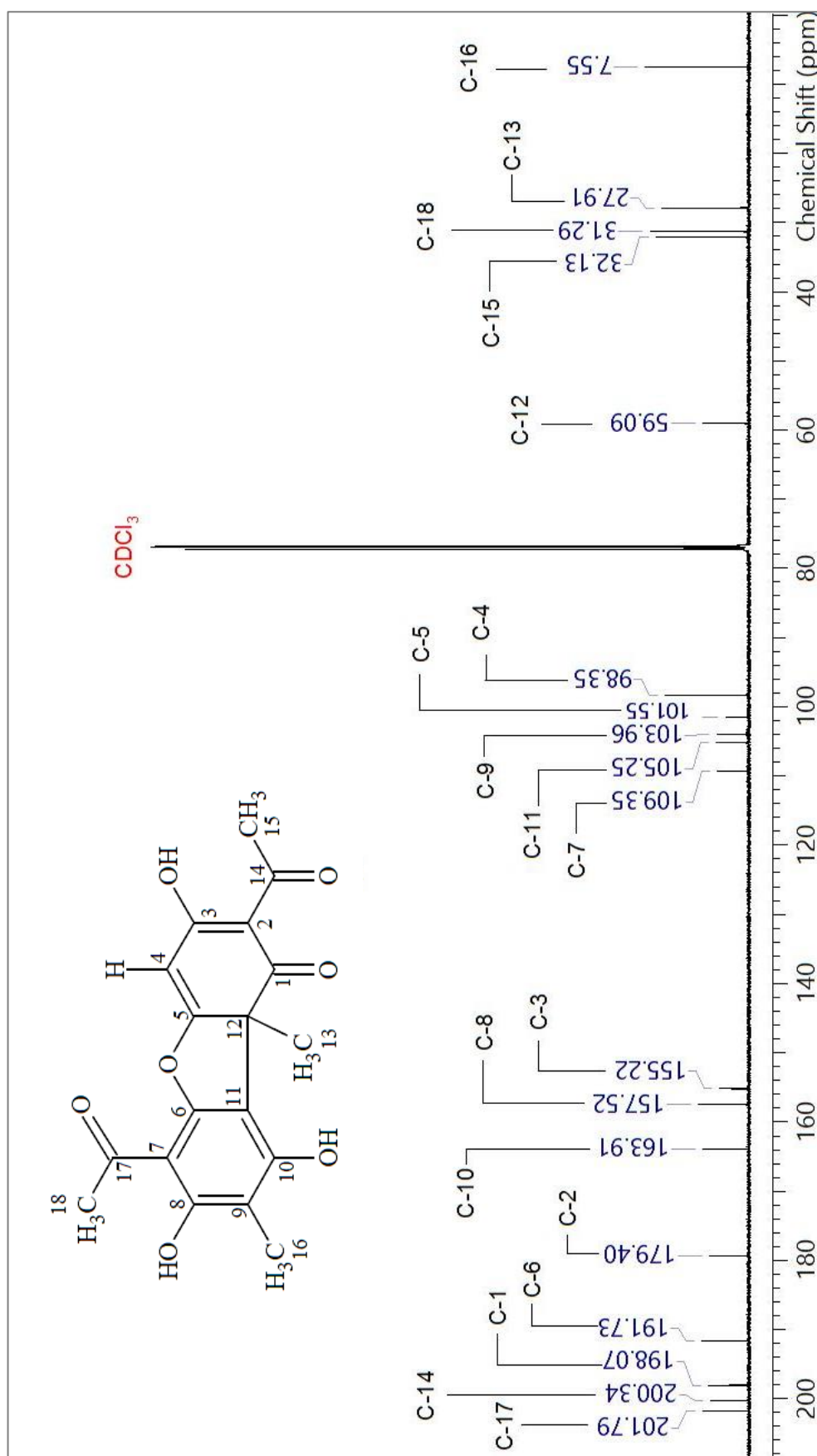
De acuerdo a las referencias, estos valores coinciden con los reportados por Huneck & Yoshimura (1996) y Viteri (2015) para el compuesto liquénico del ácido úsnico (Ver Capítulo II, Sección B, 4.1., Pág. 30).

**Tabla 22.** Datos del espectro de RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del Compuesto U

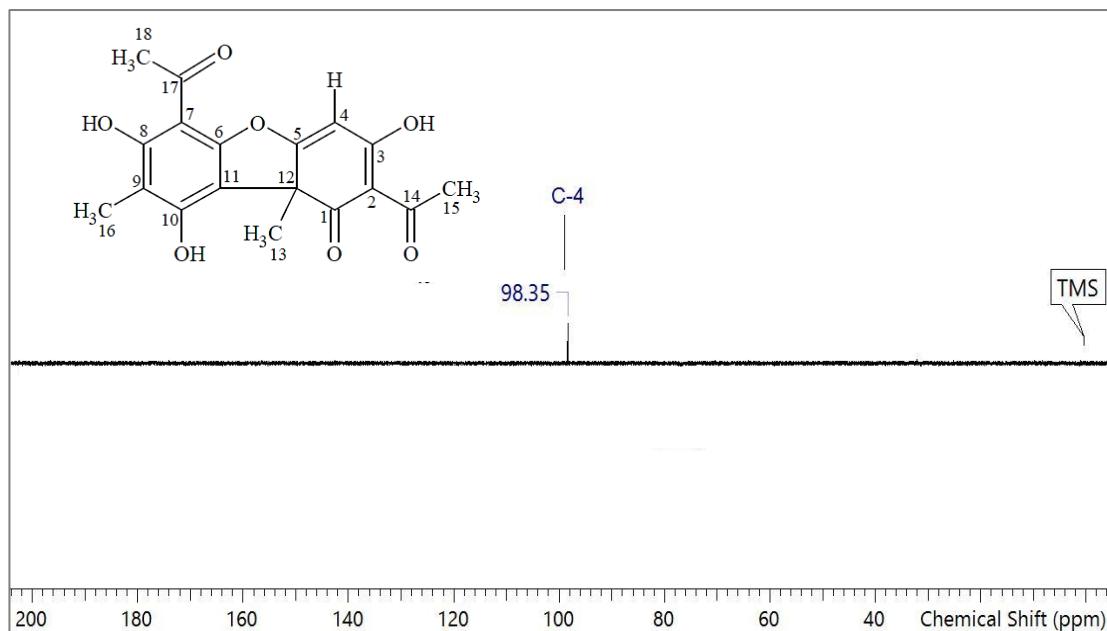
| Tipo de Carbono      | ( $\delta$ , ppm) | Tipo de Carbono                   | ( $\delta$ , ppm) |
|----------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|
| C-1 (C, cuaternario) | 198.07            | C-10 (C, cuaternario)             | 163.91            |
| C-2 (C, cuaternario) | 179.40            | C-11 (C, cuaternario)             | 105.25            |
| C-3 (C, cuaternario) | 155.22            | C-12 (C, cuaternario)             | 59.09             |
| C-4 (CH, terciario)  | 98.35             | C-13 (CH <sub>3</sub> , primario) | 27.91             |
| C-5 (C, cuaternario) | 101.55            | C-14 (C, cuaternario)             | 200.34            |
| C-6 (C, cuaternario) | 191.73            | C-15 (CH <sub>3</sub> , primario) | 32.13             |
| C-7 (C, cuaternario) | 109.35            | C-16 (CH <sub>3</sub> , primario) | 7.55              |
| C-8 (C, cuaternario) | 157.52            | C-17 (C, cuaternario)             | 201.79            |
| C-9 (C, cuaternario) | 103.96            | C-18 (CH <sub>3</sub> , primario) | 31.29             |

#### c.4. Conclusión

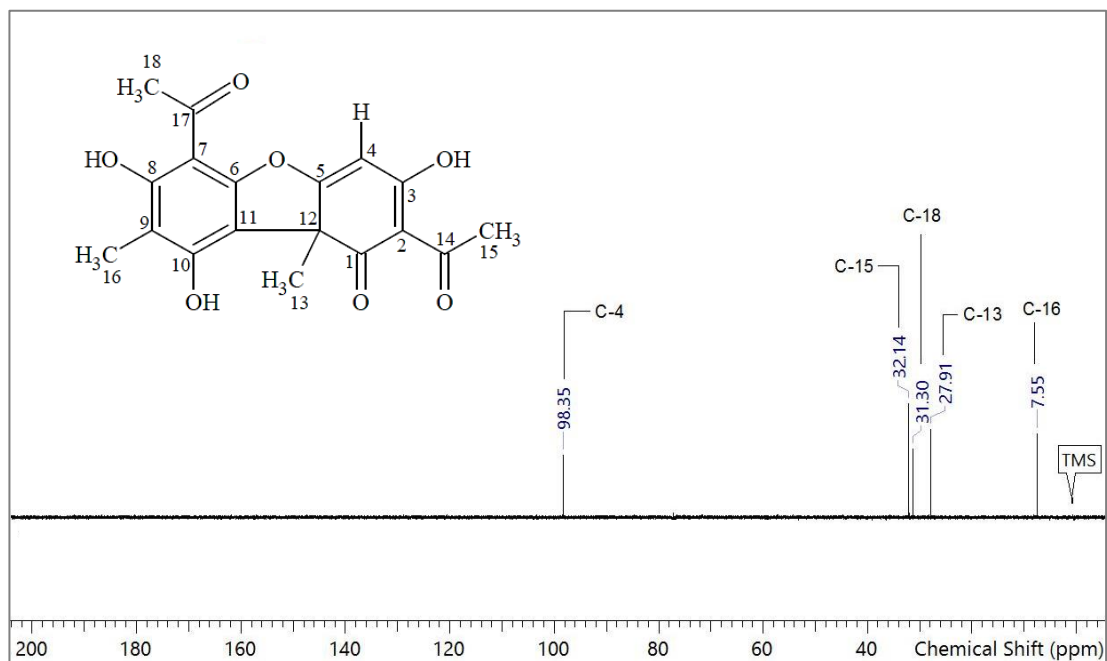
Los espectros de RMN<sup>13</sup>C de protones desacoplado, RMN<sup>13</sup>C DEPT-90 y RMN<sup>13</sup>C DEPT-135 presentados corresponden a lo esperado para la estructura del ácido único. Además, existe correspondencia para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía.



**Figura 28.** Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del Compuesto U aislado del líquen *U. calvescens*.



**Figura 29.** Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  DEPT-90 del Compuesto U aislado del líquen *U. calvescens*.



**Figura 30.** Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  DEPT-135 del Compuesto U aislado del líquen *U. calvescens*.

---

#### **d. Espectro Infrarrojo, IR (Figura 31)**

##### **d.1. Condiciones de trabajo**

**i. Equipo:** Espectrofotómetro de IR, IRPrestige-21 SHIMADZU

**ii. Laboratorio:** Laboratorio de Investigación de Síntesis de Materiales Avanzados, Facultad de Ciencias, UNI

**iii. Operador:** Judith Ramos Chávez

**iv. Concentración de la muestra:** 1 mg del compuesto U

**v. Fecha:** 12 de Enero del 2017

##### **d.2. Características del espectro**

En el rango de 700 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  se obtuvieron bandas a valores de 3086.2  $\text{cm}^{-1}$ , 2913.4  $\text{cm}^{-1}$ , 1691.6  $\text{cm}^{-1}$ , 1629.8  $\text{cm}^{-1}$ , 1535.3  $\text{cm}^{-1}$ , 1440.8  $\text{cm}^{-1}$ , 1354.3  $\text{cm}^{-1}$ , 1284  $\text{cm}^{-1}$ , 1197.8  $\text{cm}^{-1}$ , 1188.2  $\text{cm}^{-1}$ , 1141  $\text{cm}^{-1}$ , 1116.2  $\text{cm}^{-1}$ , 1068.6  $\text{cm}^{-1}$ , 1037.7  $\text{cm}^{-1}$ , 1022.3  $\text{cm}^{-1}$ , 991.4  $\text{cm}^{-1}$ , 929  $\text{cm}^{-1}$ , 839.5  $\text{cm}^{-1}$  y 817.8  $\text{cm}^{-1}$ .

##### **d.3. Análisis del espectro**

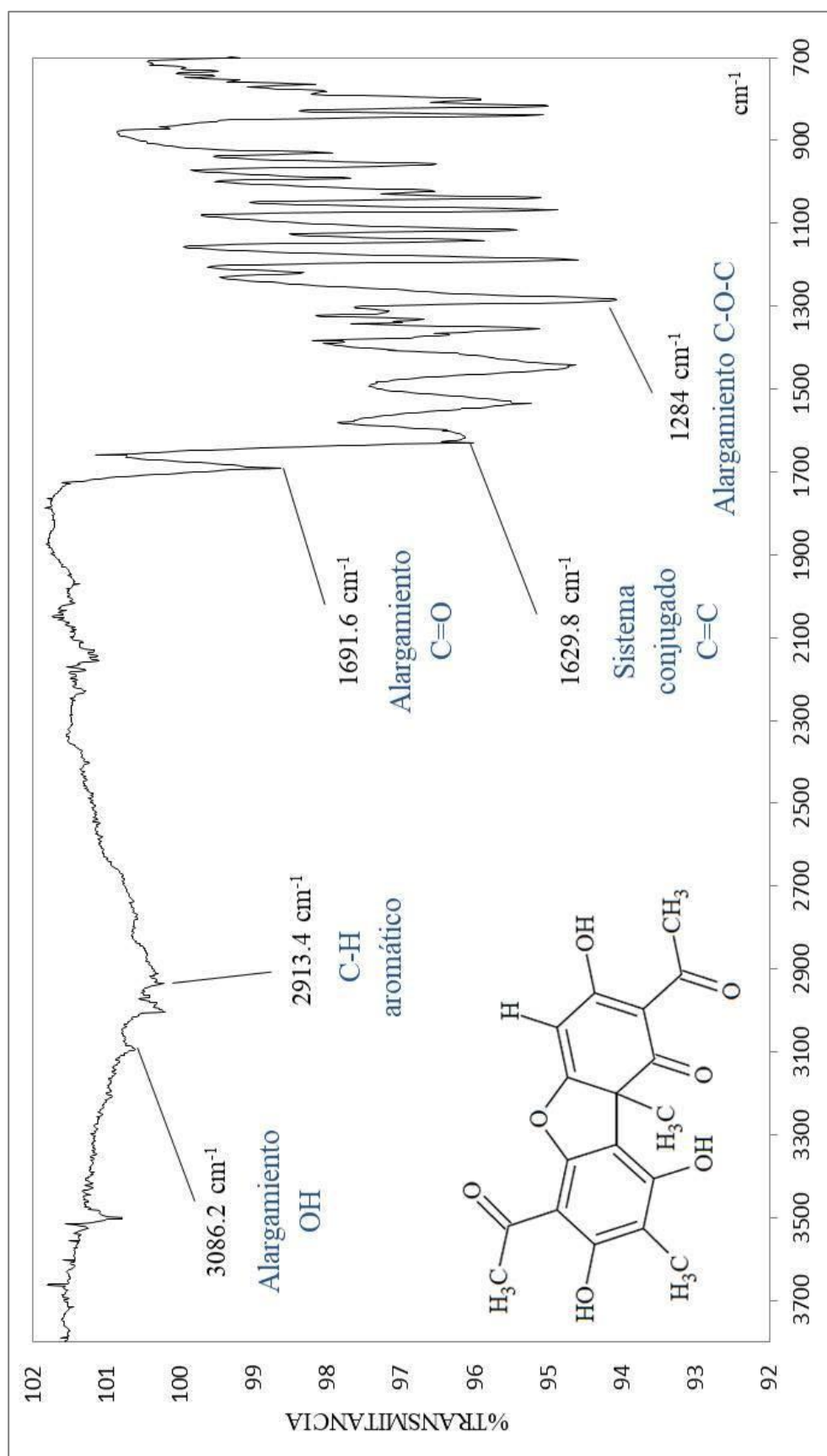
Entre los valores obtenidos en el espectro se puede evidenciar que a 3086.2  $\text{cm}^{-1}$  se indica la presencia del OH; a 2913.4  $\text{cm}^{-1}$  la flexión del C-H del aromático; a 1691.6  $\text{cm}^{-1}$  el alargamiento del C=O, a 1629.8  $\text{cm}^{-1}$  la presencia de C=C conjugado, y a 1284  $\text{cm}^{-1}$  el alargamiento del sistema C-O-C.

De las referencias de Córdor (2012), Martino (2015) y Viteri (2015), los valores de las principales bandas características para el ácido úsnico guardan relación con las obtenidas en el espectro IR del compuesto U (Ver Cap. II, Sec. B. 4.1., Pág. 32).

##### **d.4. Conclusión**

Las principales bandas obtenidas del espectro IR para el compuesto U corresponden a lo esperado para los grupos funcionales presentes en el ácido úsnico.





**Figura 31.** Espectro IR del Compuesto U aislado del líquen *U. calvescens*.

**e. Espectro Ultravioleta, UV (Figura 32)****e.1. Condiciones de trabajo**

- i. Equipo:** Espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800, celdas de cuarzo
- ii. Laboratorio:** Laboratorio de Investigación de Síntesis de Materiales Avanzados, Facultad de Ciencias, UNI
- iii. Operador:** Judith Ramos Chávez
- iv. Solvente:** Cloroformo
- v. Fecha:** 12 de Enero del 2017

**e.2. Características del espectro**

$\lambda_{\text{máx}}$ : 233.7 nm y 283.8 nm (200 a 400 nm).

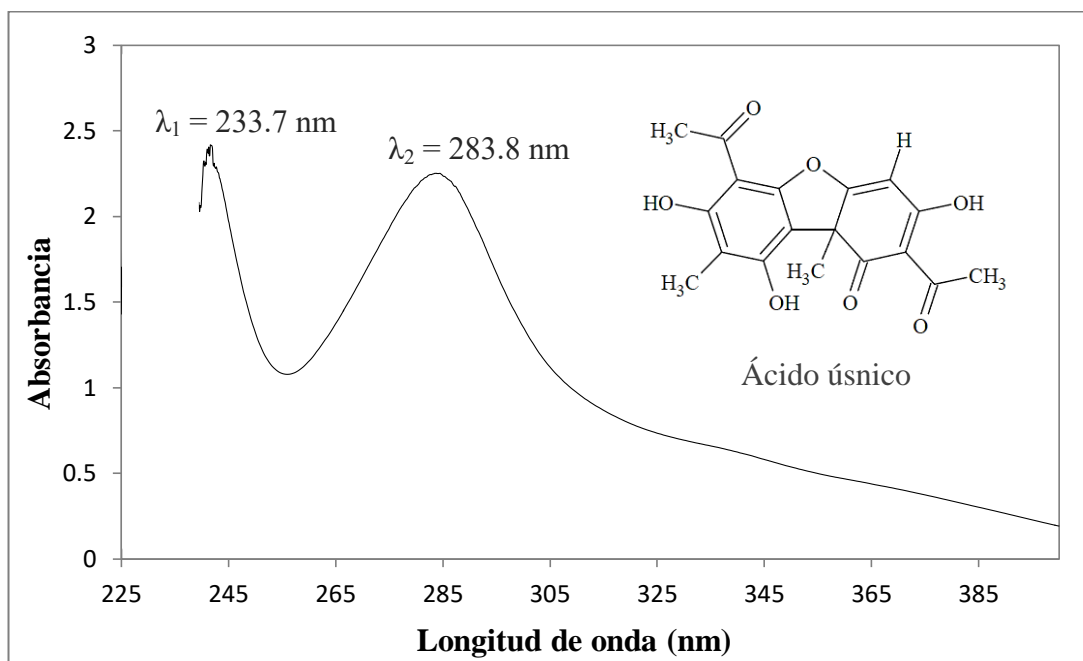
**e.3. Análisis del espectro**

En el espectro UV obtenido del compuesto U se aprecian dos bandas de máxima absorbancia que guardan relación con los reportados por Culberson (1968), Castro (2004) y Viteri (2015) para el compuesto liquénico del ácido úsnico (Ver Capítulo II, Sección B. 4.1., Pág. 35).

En el espectro UV y de acuerdo a la estructura del ácido úsnico, la banda 1 (233.7 nm) se debería a la absorción del grupo carbonilo, mientras la banda 2 (283.8 nm) se debería al sistema de electrones  $\pi$  conjugados del anillo.

**e.4. Conclusión**

Existe correspondencia entre el espectro UV obtenido para el compuesto U aislado del liquen *U. calvescens* y el espectro del ácido úsnico publicado en la bibliografía.



**Figura 32.** Espectro UV del Compuesto U aislado del líquen *U. calvescens*.

#### 8.4. Identificación Espectroscópica del Compuesto L

##### a. Espectro de Masas, EM (Figura 33)

##### a.1. Condiciones de trabajo

i. **Equipo:** Espectrómetro de masas MS ADVION COMPACT

ii. **Modo de Ionización:** APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)

iii. **Laboratorio:** Departamento de Investigación de Química, Universidad de Columbia, NY, EE.UU.

iv. **Operador:** M. Sc. Pedro A. Baldera Aguayo, ex-alumno de la EPQ-FC

v. **Concentración de la muestra:** 5.5 mg/ 1 mL de acetona

vi. **Fecha:** 15 de Marzo del 2017

##### a.2. Características del espectro

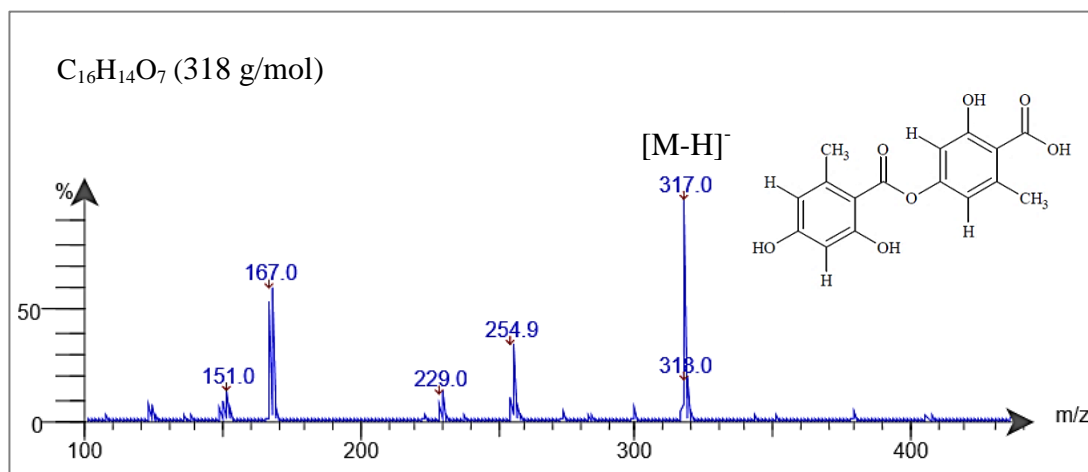
m/z 318, 317 (pico base, 100%), 255, 229, 167, 151

### a.3. Análisis del espectro

En el espectro de masas obtenido para el compuesto L se observó un ión molecular  $[M-H]^-$  a  $m/z$  317, el cual es concordante para la fórmula molecular  $C_{16}H_{14}O_7$  (318 g/mol); esto es debido a que el análisis es por medio de la técnica de APCI en modo negativo, donde la información que nos proporciona el pico base ( $m/z$  317) luego de restar (ión positivo) el portador de carga es la del peso molecular. En el Anexo 3 se describe el modo de trabajo de la técnica APCI, asimismo, se indica las reacciones en fase gaseosa que se presenta en esta técnica, las cuales involucran la ionización del gas reactivo y la formación de los picos en modo negativo.

### a.4. Conclusión

El espectro de masas (APCI) obtenido en modo negativo brinda información del peso molecular del compuesto L (318 g/mol) siendo este valor correspondiente para el ácido lecanórico.



**Figura 33.** EM (APCI) del Compuesto L aislado del líquen *U. calvescens*.

La secuencia de las fragmentaciones obtenidas para el ácido lecanórico se han descrito precedentemente (Ver Capítulo II, Sección B, 4.2., Pág. 38).

---

**b. Espectro de RMN<sup>1</sup>H - DMSO** (Figura 34)**b.1. Condiciones de trabajo**

- i. Equipo:** Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance
- ii. Laboratorio:** Departamento de Investigación de Química, Universidad de Columbia, NY, EE.UU.
- iii. Operador:** M. Sc. Pedro A. Baldera Aguayo, ex-alumno de la EPQ-FC
- iv. Solvente:** Dimetilsulfóxido, DMSO
- v. Fecha:** 26 de Agosto del 2017

**b.2. Características del espectro**

Desplazamientos químicos ( $\delta$ ): 2.36 (s, 3H, C-8), 2.37 (s, 3H, C-16), 6.23 (d, 2H, C-3,  $J = 2.19$  Hz), 6.24 (d, 2H, C-5,  $J = 2.19$  Hz), 6.62 (d, 1H, C-13,  $J = 2.20$  Hz), 6.67 (d, 1H, C-11,  $J = 2.20$  Hz), 10.01 (s, 1H, C-15), 10.31 (s, 1H, C-10) y 10.49 ppm (s, 1H, C-2).

**b.3. Análisis del espectro**

En la Tabla 23, se indica el número de señales diferentes, la integración o el número de hidrógeno de cada tipo de señal, sus desplazamientos correspondientes y el acoplamiento espín-espín o interacción de los hidrógenos vecinos obtenidos del espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto L.

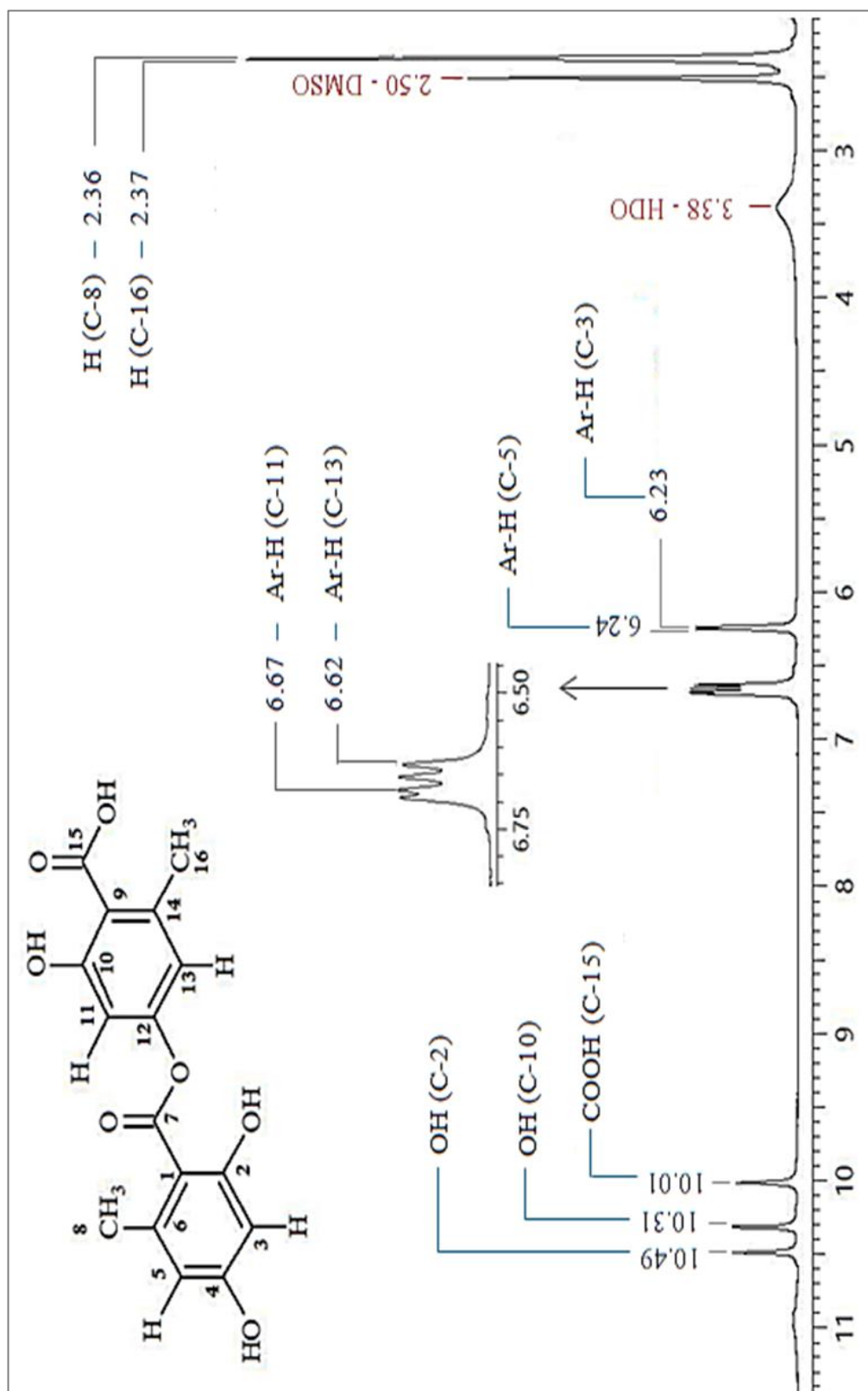
Estos valores coincidieron con lo reportado por Jayaprakasha (2000) y la ESM-RSC (2015), en dimetilsulfóxido (Ver Capítulo II, Sección B, 4.2., Pág. 40).

**Tabla 23.** Datos del espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO) del Compuesto L

| Tipo de Hidrógeno        | Integración | Desplazamiento ( $\delta$ , ppm) | Acoplamiento espín-espín |
|--------------------------|-------------|----------------------------------|--------------------------|
| C-8 (-CH <sub>3</sub> )  | 3H          | 2.36                             | Singulete                |
| C-16 (-CH <sub>3</sub> ) | 3H          | 2.37                             | Singulete                |
| C-3 (Ar-H)               | 1H          | 6.23                             | Doblete                  |
| C-5 (Ar-H)               | 1H          | 6.24                             | Doblete                  |
| C-13 (Ar-H)              | 1H          | 6.62                             | Doblete                  |
| C-11 (Ar-H)              | 1H          | 6.67                             | Doblete                  |
| C-15 (-COOH)             | 1H          | 10.01                            | Singulete                |
| C-10 (-OH)               | 1H          | 10.31                            | Singulete                |
| C-2 (-OH)                | 1H          | 10.49                            | Singulete                |

#### b.4. Conclusión

El espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto L corresponde a lo esperado para la estructura del ácido lecanórico. Además, existe correspondencia para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía.



**Figura 34.** Espectro de RMN<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO) del Compuesto L aislado del líquen *U. calvescens*.

---

### **c. Espectro de RMN<sup>13</sup>C - DMSO**

#### **c.1. Condiciones de trabajo**

- i. Equipo:** Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Avance
- ii. Laboratorio:** Departamento de Investigación de Química, Universidad de Columbia, NY, EE.UU.
- iii. Operador:** M. Sc. Pedro A. Baldera Aguayo, ex-alumno de la EPQ-FC
- iv. Solvente:** Dimetilsulfóxido, DMSO
- v. Fecha:** 26 de Agosto del 2017

#### **c.2. Características de los espectros**

- i. Espectro de RMN<sup>13</sup>C de protones desacoplado de banda ancha** (Figura 35)  
( $\delta$ ): 21.37, 21.75, 100.99, 107.67, 108.93, 110.31, 114.73, 117.70, 138.49, 140.01, 152.61, 159.22, 160.46, 161.57, 167.63 y 170.97 ppm.
- ii. Espectro de RMN<sup>13</sup>C DEPT-90** (Figura 36)  
( $\delta$ ): 100.99, 107.68, 110.30 y 114.72 ppm.
- iii. Espectro de RMN<sup>13</sup>C DEPT-135** (Figura 37)  
( $\delta$ ): 21.36, 21.75, 100.99, 107.68, 110.30 y 114.72 ppm.

#### **c.3. Análisis de los espectros**

##### **i. Carbono cuaternario (C)**

Las diez señales registradas en el espectro RMN<sup>13</sup>C de protones desacoplado de banda ancha corresponden a los 10 carbonos cuaternarios del ácido lecanórico.

( $\delta$ ): 108.93 (C-1), 117.70 (C-9), 138.49 (C-6), 140.01 (C-14), 152.61 (C-12), 159.22 (C-10), 160.46 (C-2), 161.57 (C-4), 167.63 (C-7) y 170.97 ppm (C-15).



**ii. Carbonos primarios (CH<sub>3</sub>)**

Las dos señales registradas en los espectros de RMN<sup>13</sup>C y DEPT-135 corresponden a los 2 carbonos primarios presentes en el ácido lecanórico.

( $\delta$ ): 21.37 (C-8) y 21.75 ppm (C-16).

**iii. Carbonos secundarios (CH<sub>2</sub>)**

De acuerdo al espectro de RMN<sup>13</sup>C DEPT-135, no se registra ninguna señal en la parte inferior que indique la presencia de algún carbono secundario.

**iv. Carbono terciarios (CH)**

Las cuatro señales registradas en los espectros de RMN<sup>13</sup>C, DEPT-90 y DEPT-135 corresponden a los 4 carbonos terciarios presentes en el ácido lecanórico.

( $\delta$ ): 100.99 (C-3), 107.67 (C-11), 110.31 (C-5) y 114.73 ppm (C-13).

La Tabla 24 indica los desplazamientos químicos y la disposición del tipo de carbono obtenido de los espectros RMN<sup>13</sup>C, DEPT-90 y DEPT-135.

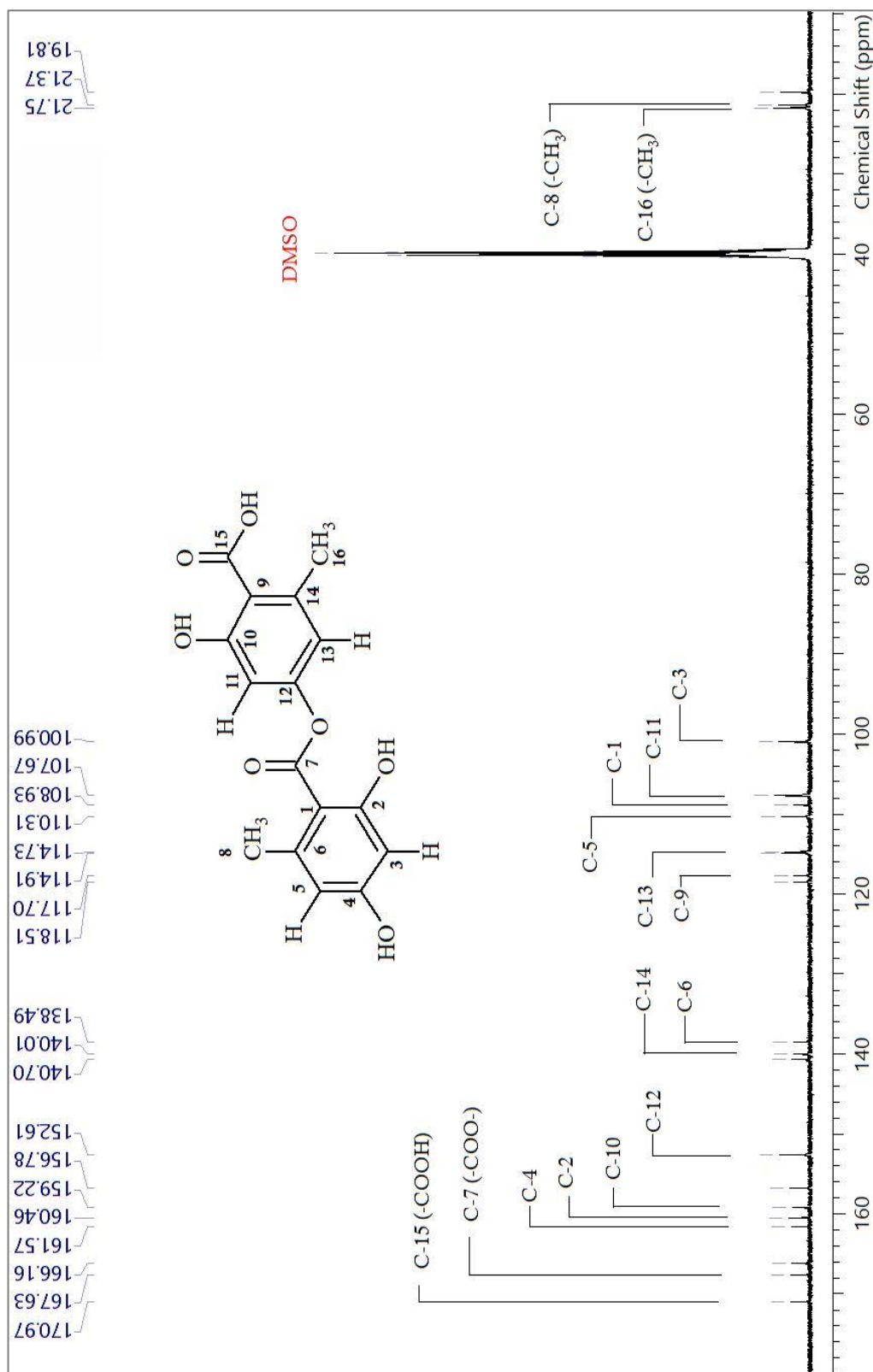
De acuerdo a las referencias, estos valores coinciden con lo reportado por Jayaprakasha (2000) y la ESM-RSC (2015) para el ácido lecanórico (Ver Capítulo II, Sección B, 4.2., Pág. 42).

**Tabla 24.** Datos del espectro de RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO) del Compuesto L

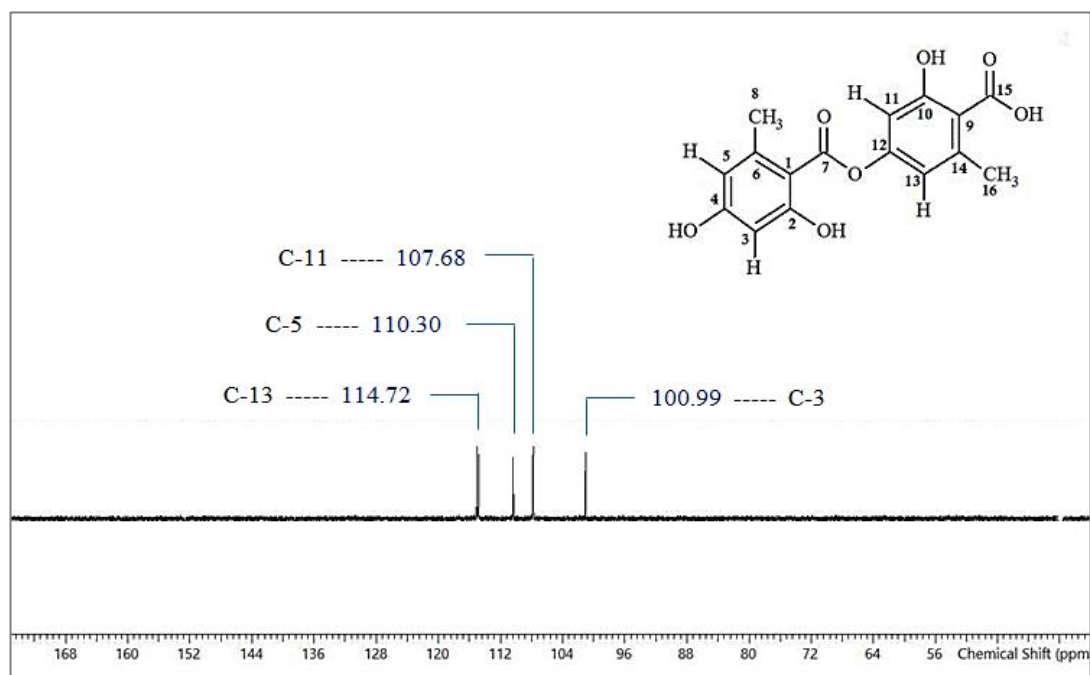
| Tipo de Carbono                  | ( $\delta$ , ppm) | Tipo de Carbono                   | ( $\delta$ , ppm) |
|----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|
| C-1 (C, cuaternario)             | 108.93            | C-9 (C, cuaternario)              | 117.70            |
| C-2 (C, cuaternario)             | 160.46            | C-10 (C, cuaternario)             | 159.22            |
| C-3 (CH, terciario)              | 100.99            | C-11 (CH, terciario)              | 107.67            |
| C-4 (C, cuaternario)             | 161.57            | C-12 (C, cuaternario)             | 152.61            |
| C-5 (CH, terciario)              | 110.31            | C-13 (CH, terciario)              | 114.73            |
| C-6 (C, cuaternario)             | 138.49            | C-14 (C, cuaternario)             | 140.01            |
| C-7 (C, cuaternario)             | 167.63            | C-15 (C, cuaternario)             | 170.97            |
| C-8 (CH <sub>3</sub> , primario) | 21.37             | C-16 (CH <sub>3</sub> , primario) | 21.75             |

#### c.4. Conclusión

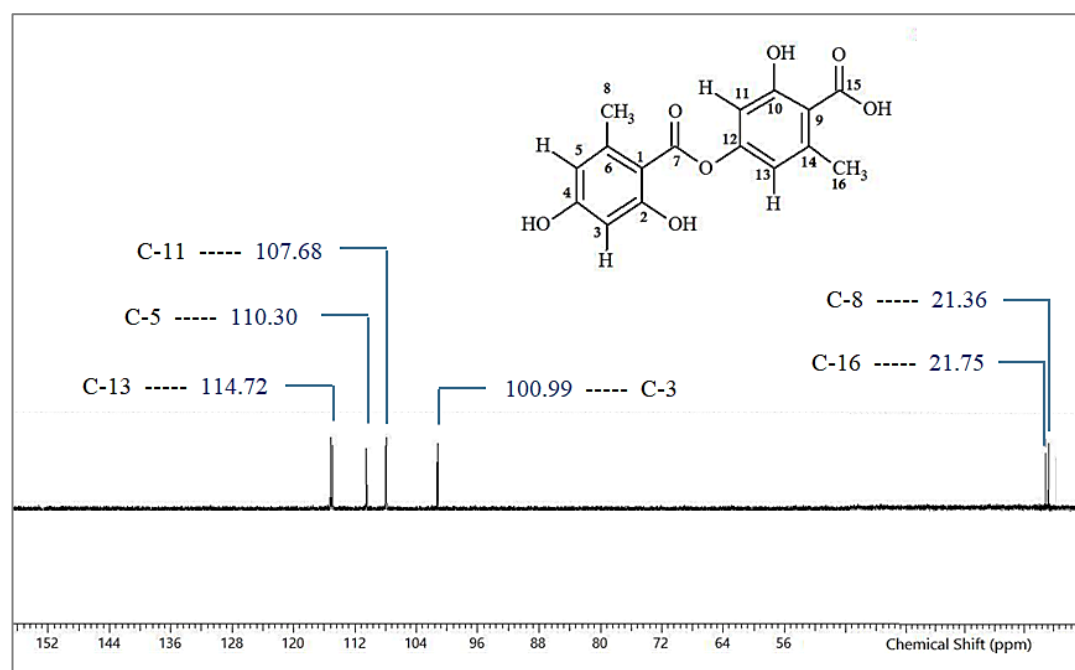
Los espectros de RMN<sup>13</sup>C de protones desacoplado, RMN<sup>13</sup>C DEPT-90 y RMN<sup>13</sup>C DEPT-135 presentados corresponden a lo esperado para la estructura del ácido lecanórico. Además, existe correspondencia para nuestro compuesto y aquellos publicados en la bibliografía.



**Figura 35.** Espectro de RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, DMSO) del Compuesto L aislado del líquen *U. calvescens*.



**Figura 36.** Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  DEPT-90 del Compuesto L aislado del líquen *U. calvescens*.



**Figura 37.** Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  DEPT-135 del Compuesto L aislado del líquen *U. calvescens*.

---

#### **d. Espectro Infrarrojo, IR (Figura 38)**

##### **d.1. Condiciones de trabajo**

**i. Equipo:** Espectrofotómetro de IR, IRPrestige-21 SHIMADZU

**ii. Laboratorio:** Laboratorio de Investigación de Síntesis de Materiales Avanzados, Facultad de Ciencias, UNI

**iii. Operador:** Judith Ramos Chávez

**iv. Concentración de la muestra:** 1 mg del compuesto L

**v. Fecha:** 12 de Enero del 2017

##### **d.2. Características del espectro**

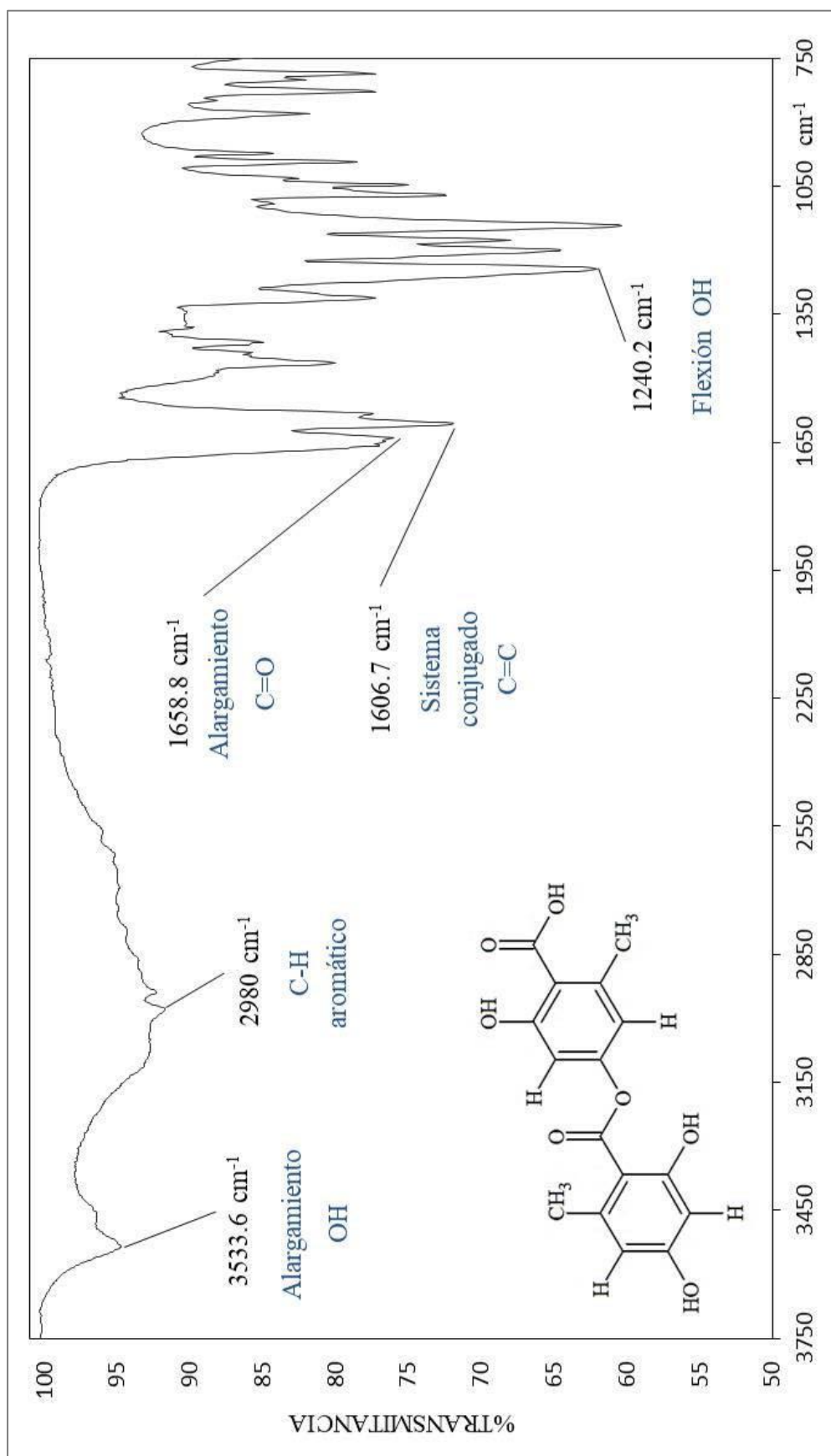
En el rango de 700 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  se obtuvieron bandas a valores de 3533.6  $\text{cm}^{-1}$ , 3419.8  $\text{cm}^{-1}$ , 2980  $\text{cm}^{-1}$ , 2939.5  $\text{cm}^{-1}$ , 1658.8  $\text{cm}^{-1}$ , 1643.4  $\text{cm}^{-1}$ , 1606.7  $\text{cm}^{-1}$ , 1583.6  $\text{cm}^{-1}$ , 1463.9  $\text{cm}^{-1}$ , 1438.9  $\text{cm}^{-1}$ , 1415.8  $\text{cm}^{-1}$ , 1311.6  $\text{cm}^{-1}$ , 1240.2  $\text{cm}^{-1}$ , 1199.7  $\text{cm}^{-1}$ , 1143.8  $\text{cm}^{-1}$ , 1091  $\text{cm}^{-1}$ , 1072.4  $\text{cm}^{-1}$ , 1047.3  $\text{cm}^{-1}$ , 1031.9  $\text{cm}^{-1}$ , 993.3  $\text{cm}^{-1}$ , 974  $\text{cm}^{-1}$ , 879.5  $\text{cm}^{-1}$ , 829.4  $\text{cm}^{-1}$ , 786.9  $\text{cm}^{-1}$

##### **d.3. Análisis del espectro**

Entre los valores obtenidos en el espectro se puede evidenciar que a 3533.6  $\text{cm}^{-1}$  se indica la presencia del OH; a 2980  $\text{cm}^{-1}$  el alargamiento del C-H del aromático; a 1658.8  $\text{cm}^{-1}$  indica el alargamiento de los distintos C=O, a 1606.7  $\text{cm}^{-1}$  la presencia de sistema C=C conjugado, a 1240.2  $\text{cm}^{-1}$  la flexión OH del carboxílico.

##### **d.4. Conclusión**

Las principales bandas obtenidas del espectro IR para el compuesto L aislado del líquen *U. calvescens* corresponden a lo esperado para los grupos funcionales presentes en el ácido lecanórico. (Ver Capítulo II, Sección B, 4.2., Pág. 44).



**Figura 38.** Espectro IR del Compuesto L aislado del líquen *U. calvescens*.

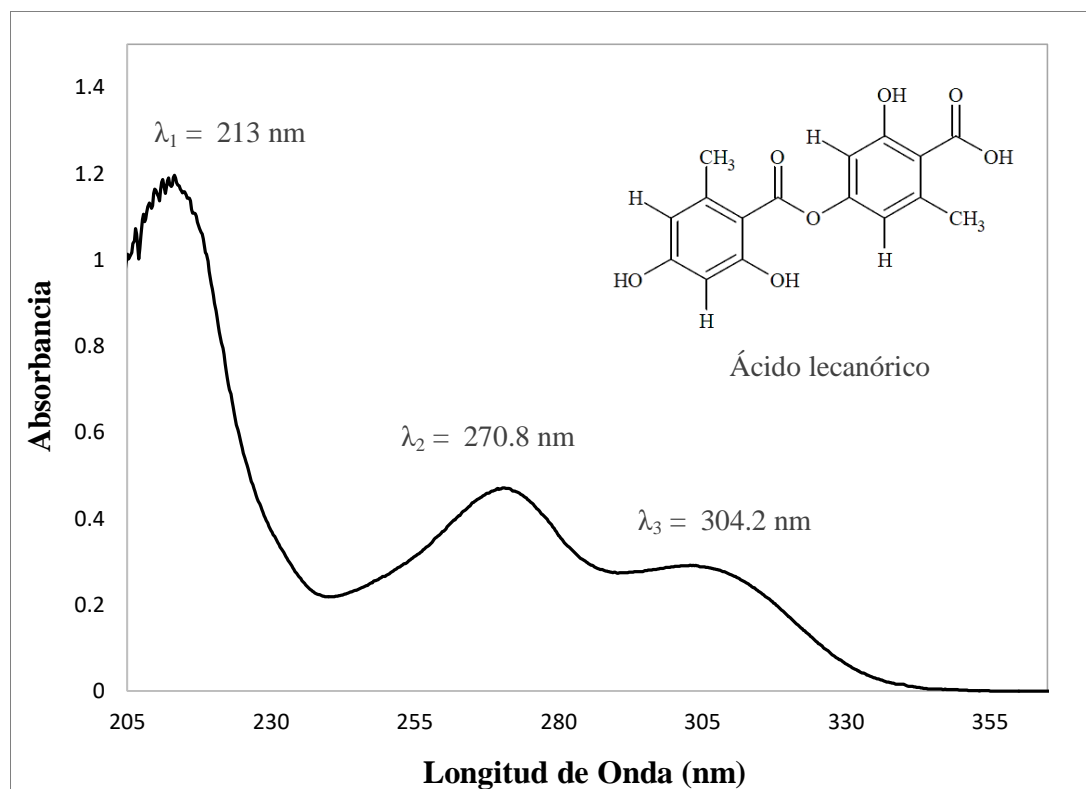
**e. Espectro Ultravioleta, UV (Figura 39)****e.1. Condiciones de trabajo****i. Equipo:** Espectrofotómetro SHIMADZU UV-1800**ii. Laboratorio:** Laboratorio de Investigación de Síntesis de Materiales Avanzados, Facultad de Ciencias, UNI**iii. Operador:** Judith Ramos Chávez**iv. Solvente:** Metanol**v. Fecha:** 12 de Enero del 2017**e.2. Características del espectro** $\lambda_{\text{máx}}$ : 213 nm, 270.8 nm y 304.2 nm (200 a 400 nm).**e.3. Análisis del espectro**

En el espectro UV obtenido del compuesto L se aprecian tres bandas de máxima absorbancia que guardan relación con los reportados por Heng Luo (2009), y Huneck & Yoshimura (1996) para el compuesto liquénico del ácido lecanórico (Ver Capítulo II, Sección B, 4.2., Pág. 46).

En el espectro UV y de acuerdo a la estructura del ácido lecanórico la banda 1 (213 nm) se debería a la absorción del grupo carbonilo, mientras la banda 2 (270.8 nm) y la banda 3 (304.2 nm) son dados por el sistema de electrones  $\pi$  conjugados de los 2 anillos.

**e.4. Conclusión**

Existe correspondencia entre el espectro UV obtenido para el compuesto L aislado del liquen *U. calvescens* y el espectro del ácido lecanórico publicados en la bibliografía.



**Figura 39.** Espectro UV del Compuesto L aislado del líquen *U. calvescens*.



---

## **CAPÍTULO IV**

---

# **RESULTADOS Y CONCLUSIONES**

---

---

## RESULTADOS

### 1. Aislamiento y caracterización de los compuestos liquénicos presentes en el liquen *Umbilicaria calvescens* Nyl.

A partir de 500 g del liquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. seco y molido, se obtuvo mediante extracción sólido-líquido por solventes los Extractos Brutos Orgánicos de los compuestos liquénicos, los cuales se separaron y purificaron por cromatografía en columna (sílica gel) obteniéndose 100 mg de ácido úsnico y 210 mg de ácido lecanórico. Su purificación final mediante recristalización proporcionó 86 mg de ácido úsnico (cristales amarillos) y 206 mg de ácido lecanórico (sólido blanco).

La caracterización del ácido úsnico se realizó mediante su punto de fusión (P.f. 204-205°C) y sus espectros de masas, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, IR y UV; correspondiendo todos ellos a los valores y características referidas en la bibliografía.

La caracterización del ácido lecanórico se realizó mediante su punto de fusión (P.f. 182-184°C) y sus espectros de masas, RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, IR y UV; correspondiendo todos ellos a los valores y características referidas en la bibliografía.

### 2. Análisis cualitativo de los metabolitos secundarios y compuestos liquénicos

El análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (“Marcha Fitoquímica”) presentes en el liquen *Umbilicaria calvescens* Nyl., por medio del procedimiento de Reyna (1999) (de acuerdo al procedimiento de Rondina & Coussio, 1969), nos infiere de la existencia de aminogrupos primarios y/o secundarios (+++), grupos fenólicos libres (++) , taninos (+) y triterpenos y/o esteroides (+).

En el test de coloración para compuestos liquénicos realizado en el liquen *Umbilicaria calvescens* Nyl., de acuerdo a la adaptación del procedimiento de Robles (1992), se indica la presencia del ácido úsnico y ácido lecanórico.

### 3. Análisis cuantitativo del ácido úsnico

La determinación cuantitativa del ácido úsnico en el liquen *Umbilicaria calvescens* Nyl., mediante el procedimiento de Castro (2004) proporciona 0.409 % del compuesto (a un nivel de confianza del 95%).

## CONCLUSIONES

1. A partir del líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl. se aisló el ácido úsnico y ácido lecanórico, los cuales han sido identificados mediante sus puntos de fusión, espectros de masas RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, IR y UV, y la comparación de éstos con lo publicado en la bibliografía.
2. Se realizó el análisis cualitativo de los metabolitos secundarios (“Marcha Fitoquímica”) presentes en el líquen, de acuerdo al procedimiento de Reyna (1999), habiéndose verificado la presencia de: aminogrupos primarios y/o secundarios (+++), grupos fenólicos libres (++) , taninos (+) y triterpenos y/o esteroides (+).
3. Se realizó el análisis cuantitativo del ácido úsnico en el líquen *Umbilicaria calvescens* Nyl., según el procedimiento de Castro (2004), por medio de la técnica de espectrometría UV y a un nivel de confianza del 95%, habiéndose obtenido  $0.409 \pm 0.007$  %.

---

## **CAPÍTULO V**

---

# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

---

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Burgaz A., De la Paz G. Líquenes epifíticos del Hayedo de Montejo de la Sierra. Madrid: Ed. Complutense; 2009. Págs. 6 – 13.
2. Chávez JL. Programa conjunto INBio-SINAC: Informes del Inventario Nacional de Biodiversidad. Costa Rica: Ed. INBio; 2005. Págs. 3- 4.
3. Chaparro, Martha y Aguirre, J. Hongos Liquenizados. Bogotá: Ed. UNC; 2002. Págs. 91, 109-111.
4. Baojun Xu, Changkeun Sung y Byunghee H. Crystal Structure Characterization of Natural Allantoin from Edible Lichen *Umbilicaria esculenta*. Crystals. 2011; 1: 128-135.
5. Barreno, Eva y Pérez, Sergio. Biología de los líquenes. España: Ed. KRK; 2003, Págs. 66 – 70, 77 - 82.
6. Castro O. Estudio fitoquímico del liquen *Psiloparmelia distincta* (Nyl.) Hale. [Tesis para optar el Grado de Magister en Ciencias]. Lima: Facultad de Química, PUCP; 2004. Págs. 1-9, 25-26.
7. Córdova V. Fisiología de las sustancias liquénicas. Madrid: Ed. Alhambra; 1975. Págs.1 - 4.
8. Marcano D. y Hasegawa M. Fitoquímica Orgánica. Venezuela: Ed Torino; 2002. Pág. 234.
9. Klages F. Tratado de Química Orgánica. Vol. 1. España: Ed. Reverté; 1968. Pág. 464.
10. Honda N. y Villegas W. A química dos liquens. Quim Nova. 1998; 21(6): 110 - 125.
11. Córdor E. Estudio Químico de los líquenes *Xanthoparmelia tasmanica* y *Xanthomendoza mendozae*. [Tesis de Maestría]. Lima: Facultad de Ciencias, Escuela Profesional de Química, UNI; 2012.
12. Robles J. Líquenes y Sustancias Liquénicas - Primera Parte. Rev Quim. PUCP. 1992; 7(1): 65 – 72.
13. Ingólfssdóttir K. Molecules of Interest: Usnic acid. Phytochemistry. 2002; 61: 729-736.

- 
14. Vijayakumar CS, Viswanathan S, Kannappa-Reddy M, Parvathavarthini S, Kundu SB, and Sukumar E. Anti-inflammatory activity of (+) usnic acid. *Fitoterapia*. 2000; 71: 564- 566.
  15. De Battisti F, Codolo R, and Nicolato A. Attivita di una associazione antibatterico-antimicotico sulla sintomatologia della *Tinea pedis* in un gruppo di sportive. *Chron Derm*. 1991; #: 375-380.
  16. Wu J, Zhang M, Ding D, Tan T, and Yan B. Effect of *Cladonia alpestris* on *Trichomonas in vitro*. *Chinese J. Parasit. Dis*. 1995; 13:126-129.
  17. Fournet A, Ferreira ME, Rojas De A, Torres de OS, Inchausti A, Yaluff G, Quilhot W, Fernandez E, and Hidalgo ME. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous Isihmaniasis. *Comp Biochem Physiol*. 1997; 111: 69-74.
  18. Yamamoto Y, Miura Y, Kinoshita Y, Higuchi M, Yamada Y, Murakami A, Ohigashi H, and Koshimizu K. Screening of tissue culture and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-Barr virus activation. *Chem. Pharm. Bull*. 1995; 43(8):1388-90.
  19. Perry NB, Benn MH, Brennan NJ, Burgess EJ, Ellis G, Galloway DJ, Lorimer SD, and Tangeny RS. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *Lichenologist*. 1999; 31:627-636.
  20. Takai M, Uehara Y, and Beisler JA. Usnic acid derivatives as potential neoplastic agents. *J. Med. Chem*. 1979; 22:1380-1384.
  21. Heng L., Yoshikazu Y., Jung A. et al. Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island). *Polar Biol*. 2009; (32): 1033-1040.
  22. Gomes AT, Honda NK, Roese FM. et al. Bioactive derivatives obtained from lecanoric acid, a constituent of the lichen *Parmotrema tinctorum* (Nyl.). Hale (*Parmeliaceae*). *Rev Bras Farm*. 2002; 12:74-75.
  23. Rankovic B, Misic M. The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspersa*. *Biotechnol Equip*. 2008; 22:1310-2818.

- 
24. Castro O. Aislamiento del ácido úsnico de *Flavoparmelia caperata* y su determinación cuantitativa por espectroscopia UV en diez líquenes. Bol Soc Quim Perú. 2010; 76(4): 389-399.
  25. Huneck Segfried and Yoshimura Isao. Identification of the lichen substances. Berlin: Ed. Springer; 1996. Págs. 228, 264
  26. Martino D. Estudio Químico *Flavopunctelia flaventior* (Stirt.) Hale. [Tesis de Licenciatura]. Lima: Facultad de Ciencias, Escuela Profesional de Química, UNI; 2015.
  27. Jayaprakasha GK, Rao LJ, Singh RP, Sakarian KK. Improve Chromatographic Method for the Purification of Phenolic Constituents of the Lichen *Parmotrema Tinctorum* (Nyl.) Hale. Journal of Chromatographic Science. 1998; 36: 8-10.
  28. Viteri R. Estudio Fitoquímico del extracto etanólico del liquen *Usnea antarctica*, procedente de la Antártida. [Tesis de Maestría]. Venezuela: Facultad de Química, IVIC; 2015. Págs. 50-58.
  29. Culberson, C.F. The Lichen substances of the genus Evernia. Pytochemistry. 1963; 2: 335-340.
  30. Jayaprakasha GK, Rao LJ. Phenolic constituents from the lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. Z Naturforsch C. 2000; 55(11-12): 1018-1022.
  31. Información espectroscópica del ácido lecanórico: Electronic Supplementary Material (ESM) for Analytical Methods. The Royal Society of Chemistry (2015) n/a. Disponible en :  
<http://www.rsc.org/suppdata/c5/ay/c5ay01091h/c5ay01091h1.pdf>
  32. Reyna V. Química de Productos Naturales / Guía de Práctica N°1: Marcha Fitoquímica Preliminar. Facultad de Ciencias. UNI. Lima: 1999. Págs. 1-4.
  33. Rondina R. & Coussio J. Estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales. Revista de Investigación Agropecuaria, INTA. 1969; 22(4): 351 - 366.
  34. Nedeljko T., Perica J. The isolation, analytical characterization by HPLC–UV and NMR spectroscopy, cytotoxic and antioxidant activities of baeomycesic acid from *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. Hem Ind. 2011; 65(5): 591-598.

- 
35. Proška B, Sturdiková M, Pronayová N, and Liptaj T. (-)-Usnic acid and its derivatives. Their inhibition of fungal growth and enzyme activity. *Pharmazie*. 1996; 51:195-196.
  36. Reyna V. Química Orgánica IV - CQ 442 (Separatas de Espectrometría de Masas, Espectroscopia UV, IR y RMN). Facultad de Ciencias. UNI. Lima: 2013. Págs. 1-8 (Cap. I), 1-10 (Cap. II), 1-8 (Cap. III) y 1-14 (Cap. IV)
  37. Durst H, Gokel G. Química Orgánica. España: Ed. Reverté; 2007. Págs. 129-160.
  38. Cocho de Juan, José A. Desarrollo por espectrometría de masas en tándem para la determinación de acilcarnitinas y la detección neonatal de alteraciones del metabolismo de ácidos orgánicos y ácidos grasos. España: Ed. USC; 2008. Págs. 30-32.
  39. McMurry J. Química Orgánica. 8°. México: Ed. CENGAGE learning; 2012. Págs. 424-484.
  40. Gutsche C, Pasto D. Fundamentos de Química Orgánica. España: Ed. Reverté; 1979. Págs. 145-164.
  41. Albella J, Cintas A, Miranda T, Serratosa J. Introducción a la Ciencia de Materiales. España: Ed. CSIC; 1993. Págs. 674-677.
  42. Skoog D, Holler F. Principios del Análisis Instrumental. 6°. México: Ed. CENGAGE learning; 2010. Págs. 336, 367, 816.
  43. Breña J, Neira E, Viza C. Química Orgánica II. 1°. Perú: Ed. EDUNI; 2009. Págs. 119-181.
  44. Ramis G. Quimiometría. Vol. 1. Madrid: Ed. SINTESIS S.A.; 2000. Págs. 35-40.



---

# CAPÍTULO VI

---

# ANEXOS

---

## ANEXO 1

## CONSTANCIA DE LA DETERMINACIÓN BOTÁNICA DEL LIQUEN

*Umbilicaria calvescens* Nyl.

Por la presente, dejo constancia que:

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

REINO: Fungi

PHYLUM: Ascomycota

CLASE: Lecanoromycetes


ORDEN: Lecanorales

FAMILIA: Umbilicariaceae

GÉNERO: *Umbilicaria*

ESPECIE: *Umbilicaria calvescens* Nyl.

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

  
Lima, 01 de febrero del 2014



ÁNGEL M. RAMÍREZ ORDAYA  
BIOLOGO  
COLBIOP N° 6632

**Blgo. Ángel Manuel Ramírez Ordaza**

N° de colegio de biólogos: 6632

## ANEXO 2

CARACTERÍSTICAS DEL LÍQUEN *Umbilicaria calvescens* Nyl.

Fotos tomadas por Judith Ramos Chávez (2013). (a) Muestra Liquélica, *Umbilicaria calvescens* Nyl., recolectada camino a Huaytapallana, Dpto. Huancayo, Prov. Junín; (b) Frontal del líquen, color crema con manchas circulares negras; (c) Reverso del líquen, color marrón oscuro; (d) Medida del líquen, largo 4.5cm y (e) ancho 3.5cm.

---

### ANEXO 3

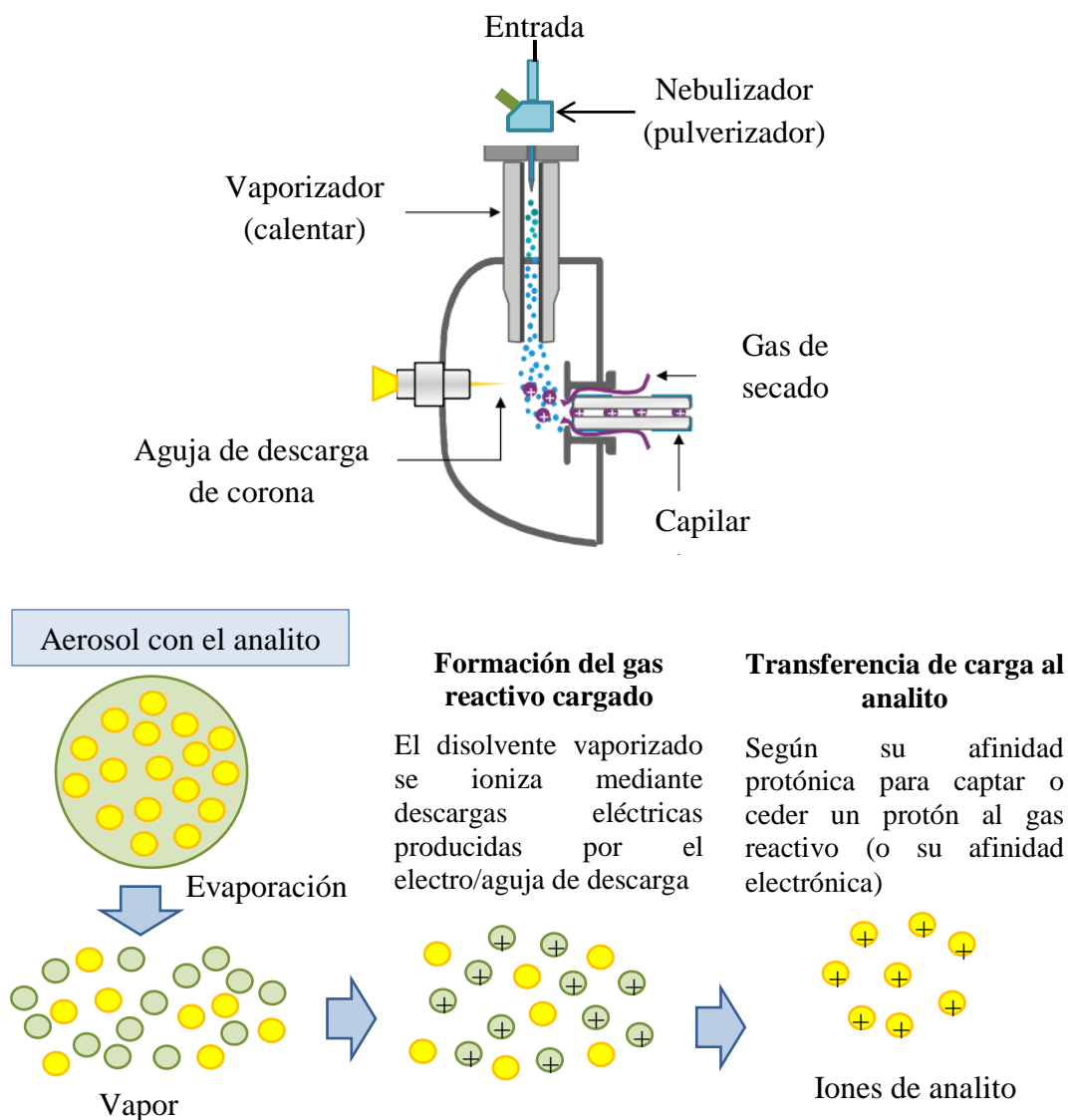
#### **Modo de Ionización: Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI)**

La ionización química a presión atmosférica (APCI) es una técnica de ionización suave a comparación de la fuente por EI (técnica dura que trabaja con un voltaje de 70 eV). Debido a que APCI es una técnica suave presentará menos fragmentaciones del compuesto, y adicionalmente se observarán iones  $[M+H]^+$  y  $[M-H]^-$  según se trabaje en modo positivo o negativo. Asimismo, esta técnica se utiliza para analizar compuestos polares y no polares térmicamente estables de menor masa (menos de 2000 Da), trabajando a altas temperaturas (350-550 °C).

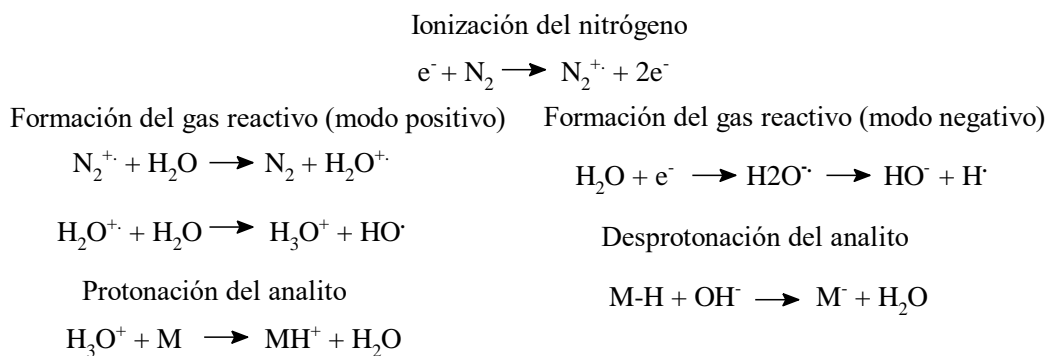
El proceso de ionización en APCI (ver Figura a) es iniciado a partir de las descargas eléctricas producidas por el electrodo de descarga de corona en la fuente, los electrones producidos ionizan al nitrógeno (gas reactivo), el cual reacciona con las moléculas del disolvente de manera que quedan cargadas. Las especies cargadas se forman a través de una serie de reacciones en fase gaseosa (ver Figura b), luego se transfiere la carga al analito según sea su afinidad protónica; es decir, el analito protonado se formará en el modo positivo si la afinidad de protones del analito excede a la del gas reactivo, mientras la desprotonación del analito se observará en el modo negativo si la acidez en fase gaseosa del gas reactivo excede la del analito.

Entre las ventajas de esta técnica es que presenta una mayor selectividad y sensibilidad, la cual depende de la cantidad del analito; no presenta aductos con Na y K, pero si los puede formar con el  $NH_4^+$ .

Su principal limitación es que presenta menor información estructural debido a la cantidad de fragmentaciones, por lo que el pico principal que se obtiene nos indica el peso molecular del compuesto.



**Figura a.** Proceso de ionización APCI.



**Figura b.** Posibles reacciones en fase gaseosa en la fuente APCI.

## ANEXO 4

## ESPECIFICACIONES DEL REACTIVO DE ÁCIDO ÚSNICO

**SIGMA-ALDRICH**

sigmaaldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

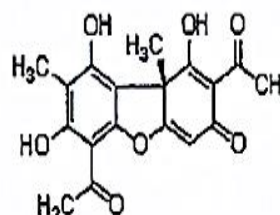
Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

## Certificate of Analysis

Product Name:  
(+)-Usnic acid - 98%

Product Number: 329967  
 Batch Number: MKBP1746V  
 Brand: ALDRICH  
 CAS Number: 7552-61-0  
 MDL Number: MFCD00016878  
 Formula: C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>  
 Formula Weight: 344.32 g/mol  
 Quality Release Date: 16 APR 2013



| Test   | Specification            | Result       |
|--|--------------------------|--------------|
| Appearance (Color)<br>Yellow to Yellow-Green or Gold | Conforms to Requirements | Light Yellow |
| Appearance (Form)                                    | Powder                   | Powder       |
| Infrared spectrum                                    | Conforms to Structure    | Conforms     |
| Optical Rotation<br>c = 0.7%; Chloroform             | 475.0 - 495.0 deg        | 478.2 deg    |
| Purity (HPLC)  | ≥ 97.5 %                 | 99.8 %       |

Jamie Gleason, Manager  
 Quality Control  
 Milwaukee, Wisconsin US

---

## ANEXO 5

### MARCHA FITOQUÍMICA

#### Procedimiento adaptado del Dr. Victor M. Reyna Pinedo (1999)

(De acuerdo a Rondina & Coussio, 1969)

#### A. OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES

##### 1. Fracción (a)

- i. En un balón de 100 mL se maceró 5 g de muestra seca y pulverizada con 50 mL de metanol, durante 20 horas a temperatura ambiente.
- ii. Luego, la mezcla se sometió a reflujo durante 4 horas; se filtró en caliente, a través de un papel de filtro “rápido”, lavando el residuo sobre el papel de filtro con metanol. El extracto metanólico se colocó en una fiola de 50 mL y se completó la marca.
- iii. Se separó 5 mL de extracto metanólico obtenido, el cual se rotuló como la fracción (a). Se descartó el residuo sólido del filtrado.

##### 2. Fracción (b)

- i. El resto (45 mL) de la solución anterior, se colocó en un balón de 100 mL y se llevó a sequedad en el rotavapor.
- ii. El residuo obtenido se extrajo con 10 mL de ácido clorhídrico,  $\text{HCl}_{(\text{ac})}$  al 1%, calentando ligeramente ( $50^{\circ}\text{C}$ ), y se filtró sobre papel de filtro “lento”. Esta operación se repitió en las mismas condiciones con 5 mL de ácido clorhídrico,  $\text{HCl}_{(\text{ac})}$  al 1%, a  $50^{\circ}\text{C}$ . Las soluciones ácidas se recibieron en un Erlenmeyer de 50 mL y se guardaron para realizar otro tratamiento. (Sección 3.i.).
- iii. El residuo sólido obtenido del filtrado, se disolvió con 5 mL de cloroformo, calentando a  $50^{\circ}\text{C}$  y agitando fuertemente, luego se filtró en un embudo pequeño utilizando papel de filtro “lento”. El líquido filtrado se secó con sulfato de sodio anhidro, obteniéndose la fracción (b). El residuo sólido se descartó.

### 3. Fracción (c)

- i. La solución ácida obtenida en sección 2.ii., se basificó con amoníaco  $\text{NH}_{3(\text{ac})}$  7.5N hasta pH 9-10.
- ii. Luego se realizó la extracción con cloroformo (2x25 mL). La parte acuosa se guardó para su posterior tratamiento (sección 4.i.).
- iii. La fase clorofórmica se lavó con 10 mL de agua destilada y se reunió el agua del lavado con la fase acuosa obtenida en la etapa anterior (ii).
- iv. La fase clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró con papel filtro “rápido”. El filtrado constituye la fracción (c).

### 4. Fracción (d)

- i. La fase acuosa básica obtenida en la sección 3.ii. y 3.iii., se semisaturó con sulfato de sodio (0,1g de sal anhidra por mL de solución) y se filtró. Luego, se realizó la extracción con cloroformo: etanol (3:2) (2x25mL). Se guardó la fase acuosa obtenida para su posterior tratamiento (sección 5.i.).
- ii. La fase orgánica (50 mL) se lavó con una solución semisaturada de sulfato de sodio (1g de sal anhidra en 10 mL de agua destilada). El lavado acuoso se guardó junto con la obtenida en la etapa anterior (i).
- iii. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró con papel de filtro “rápido”, obteniéndose la fracción (d).

### 5. Fracción (e)

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

### 6. Fracción (f)

- i. En un tubo de ensayo limpio y seco (18 x 160 mm), se colocó 1 g de muestra seca y pulverizada y 10 mL de agua destilada; se agitó la mezcla y se calentó a “baño maría” durante 15 minutos.
- ii. Se filtró en caliente a través de papel de filtro “rápido”, se completó el filtrado a 10 mL y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Esto constituye la fracción (f).



---

## **B. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIO**

### **1. Aminogrupos primarios o secundarios (Prueba de Ninhidrina)**

**Nota:** Se realizó sobre las fracciones (a) y (f).

- i. Teniendo cuidado de no tocar la parte central con los dedos, se preparó tres trozos de papel de filtro “lento” de 2x3 cm de longitud, y se les colocó sobre una luna reloj. Luego por medio de una pipeta pasteur se colocó en el centro de cada papel, una gota de la fracción (a), fracción (f) y agua destilada (sirve como referencia). Los tres papeles con las muestras respectivas se secaron a temperatura ambiente.
- ii. Luego se agregó 1 gota de la solución de Ninhidrina al 1% en etanol, sobre la parte central de cada uno de los tres papeles, donde se había añadido las muestras.
- iii. Los tres papeles se colocaron en una estufa entre 110°C - 120°C durante 30 minutos.

**Observación:** La presencia de un color violeta sobre el papel nos indica prueba positiva.

### **2. Grupos fenólicos libre (Prueba con reactivo Férrico)**

**Nota:** Se realizó sobre la fracción (a).

- i. El resto de la fracción (a) (aproximadamente 5 mL), se llevó a sequedad en el rotavapor en un tubo para rotavapor.
- ii. El residuo obtenido se disolvió en 0.5 mL de agua destilada y se filtró a través de un embudo pequeño utilizando papel de filtro “lento”; la solución filtrada (“solución a”) se recibió en un tubo de ensayo (13x100 mm).
- iii. Se colocó dos gotas de la “solución a” en una luna de reloj ( $\phi = 75$  mm); luego, se adicionó 1 gota de la solución de cloruro férrico al 1% y se mezcló.

**Observación:** Una coloración azul o verde nos indica prueba positiva.

### 3. Taninos (Prueba de la Gelatina)

**Nota:** Se realizó sobre la “solución a” obtenida en la sección precedente (2.ii.)

- i. Se colocaron 4 gotas de la “solución a” en una luna de reloj ( $\phi = 75$  mm); y se adicionó dos gotas de la solución de gelatina al 1%. Se realizó la misma operación con dos gotas de agua destilada como referencia. Conviene realizar esta prueba sobre un fondo negro para una mejor observación del resultado.

**Observación:** La presencia de un precipitado blanco nos indica que la prueba es positiva.

### 4. Flavonoides (Reacción de Shinoda) (excepto chalconas, dihidrochalconas, auronas, Catequinas e isoflavonas)

**Nota:** Se realizó sobre la fracción (d) y (e).

#### a) Tratamiento de la fracción (d)

- i. La fracción (d) se colocó en un balón de 100 mL y se llevó a sequedad.
- ii. Sobre el residuo se agregó 2.5 mL de etanol agitándose hasta disolución, dentro de un “baño maría” a 50°C. Luego se filtró a través de un embudo pequeño y papel de filtro “lento”, recibiendo el filtrado (“solución d”) en un tubo de ensayo (13x100 mm).
- iii. En un tubo de ensayo (13x100 mm) limpio y seco se colocaron 3 gotas de la “solución d”, 2 mL de agua destilada, 1 mL de  $\text{HCl}_{(\text{cc})}$  12N y limaduras de magnesio. Se agitó y luego se dejó en reposo durante 5 minutos.
- iv. Se adicionó 6 gotas de alcohol amílico y se agitó; luego, se dejó en reposo y se observó la coloración de la fase amílica.

#### b) Tratamiento de la fracción (e)

- v. Se tomó 2 mL de la fracción y se siguió lo indicado en las etapas iii. y iv. (4.a)

**Observación:** La presencia de un color rojo o rosado en la fase amílica nos indica prueba positiva.

## 5. Triterpenoides y esteroides (Reacción de Libermann-Burchard)

**Observación:** El color y su intensidad varían de acuerdo a la estructura del compuesto, y hay algunos compuestos que no desarrollan color.

**Nota:** Se realizó sobre las fracciones (b), (c), y la “solución d” (ver 4.a.ii.).

### a) Tratamiento de las fracciones (b) y (c)

- i. Se llevó a sequedad 4 mL de la fracción (c). Luego se disolvió con cloroformo (0.2 mL). La solución obtenida la denominamos “solución c”.
- ii. Se colocaron 2 gotas de la fracción (b) y de la “solución c”, por separados en tubos de ensayo de 7 x 60 mm. Luego, se agregó 2 gotas de anhídrido acético a cada tubo y se mezcló bien.
- iii. Seguidamente se adicionó 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado a cada tubo.

### b) Tratamiento de “solución d”

- iv. Se colocó 5 gotas de la “solución d” (ver sección 4.a.ii.) en un tubo de ensayo (7x60 mm) y se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo obtenido se disolvió en 5 gotas de cloroformo y se trasvasó en un tubo de ensayo de 7 x 60 mm. Luego se agregó 2 gotas de anhídrido acético y se mezcló bien.
- v. Seguidamente se adicionó 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

**Observación:** La presencia de anillos de color naranja, azul o verde nos indica prueba positiva.

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

**Nota:** Se realizó sobre la fracción (b).

- i. Se colocó el resto de la fracción (b) en un tubo de ensayo (13 x 100mm), se añadió 5 mL de hidróxido de sodio al 5% y se agitó.

**Observación:** La presencia de un color rosado nos indica prueba positiva.

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

### **a) Tratamiento de la fracción (c)**

- i. Se llevó a sequedad el resto de la fracción (c).
- ii. Luego se adicionó 2.5 mL de ácido clorhídrico, HCl (ac) al 1%, y se calentó ligeramente (50°C). Se filtró en un embudo pequeño y se recibió la solución ácida en un tubo de ensayo (13x100mm).
- iii. Tomando 3 tubos de ensayos de 7 x 60 mm, se colocó en cada tubo 5 gotas de la solución ácida obtenida. Al primer tubo se le añadió 2 gotas del reactivo de Dragendorff, al segundo tubo 2 gotas del reactivo de Wagner, y al tercero tubo 2 gotas del reactivo de Mayer.

### **b) Tratamiento de la “solución d”**

- iv. Se llevó a sequedad 10 gotas de la “solución d” en un tubo de ensayo (7x60mm). El residuo obtenido se disolvió en 5 gotas de ácido clorhídrico, HCl (ac) al 1% y se filtró con papel de filtro “lento”.
- v. La solución ácida obtenida se repartió en 3 tubos de ensayos (7x60 mm) y se añadió los reactivos de Dragendorff, Wagner y Mayer, respectivamente.

**Observación:** La formación de un precipitado naranja y crema nos indica prueba positiva.

## **8. Leucoantocianidinas y Catequinas (Reacción de Rosenbeim)**

### **a) Tratamiento de la “solución d”**

- i. En un tubo de ensayo (13x100mm) se colocó 3 gotas de la “solución d” y 2 mL de agua destilada.
- ii. Luego se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico concentrado HCl 12N.
- iii. Se agitó y se calentó en “baño maría” durante 10 minutos.
- iv. Se dejó enfriar la mezcla; luego se añadió 6 gotas de alcohol amílico y se agitó fuertemente.

v. Después de dejarlo reposar se observó la fase amílica.

**b) Tratamiento de la fracción (e)**

vi. Se colocó 2 mL de la fracción (e) en un tubo de ensayo (13x100 mm) y se adicionó 1 mL de ácido clorhídrico concentrado, HCl 12N.

vii. Se agitó y se calentó en “baño maría” durante 10 minutos. Se dejó enfriar la mezcla y se añadió 6 gotas de alcohol amílico. Se agitó fuerte y después se dejó reposar la mezcla (se observó la fase amílica).

**Observación:** La presencia de un color rojo (leucoantocianidinas) o marrón (catequinas) en la fase amílica nos indica prueba positiva.

**9. Saponinas (Prueba de la espuma)**

**Nota:** Se realizó sobre la fracción (f).

i. Se colocó 1 mL de la fracción (f) en un tubo de ensayo (13x100mm) y se agitó durante 15 segundos. Luego se dejó en reposo por 15 minutos, al cabo del cual se midió la altura de la espuma.

**Observación:** Si después de los 15 minutos de reposo la altura de la espuma es mayor o igual a 5 mm, nos indica prueba positiva.

**Nota:** Esta prueba es la más sencilla para la presunción de la existencia de saponinas.

## ANEXO 6

### TEST DE COLORACIÓN PARA COMPUESTOS LIQUÉNICOS

#### Adaptación del procedimiento de la Dra. Juana Robles Caycho (1992)

Este procedimiento es una adaptación del trabajo de la Dra. Juana Robles Caycho (1992), el cual se basa en reacciones de coloración, siendo algunas de estas muy rápidas de percibir por lo que es necesario seguir todos los cambios de coloración que se presenten.

#### 1. Cantidad de muestra

Un gramo de muestra seca, pulverizada y tamizada.

#### 2. Procedimiento Experimental

##### a) Obtención del extracto acetónico

- i. En un erlenmeyer de 50 mL se colocó la muestra seca y se extrajo con 10 mL de acetona en caliente (40°C) durante 5 minutos.
- ii. Luego se filtró con papel de filtro “lento” y se guardó el extracto acetónico para su posterior prueba.

##### b) Pruebas de Identificación de los Compuestos Liquénicos

###### i. Ensayo de Cloruro Férrico, $\text{FeCl}_3$ 1%

Se colocó 1mL del extracto acetónico en un tubo de ensayo (13x100 mm), luego se le adicionó 5 gotas de Cloruro Férrico al 1%.

**Observación:** Una coloración violácea o azul nos indica prueba positiva de compuestos líquénicos.

**ii. Ensayo de Hipoclorito de sodio, NaClO**

En un tubo de ensayo (13x100 mm) se colocó 1 mL del extracto acetónico, luego se le añadió 5 gotas de Hipoclorito de sodio (También se puede usar lejía comercial sin diluir).

**Observación:** Una coloración fugaz de rosa, roja, naranja y verde, nos indica la presencia de compuestos liquénicos. Un color rojo sangre nos indica la presencia del ácido lecanórico o ácido girofórico.

**iii. Ensayo de Hidróxido de potasio, KOH al 10%**

En un tubo de ensayo (13x100 mm) se colocó 1 mL del extracto acetónico, luego se le añadió 5 gotas de Hidróxido de potasio al 10%.

**Observación:** Una coloración amarillo hasta el rojo o pardo, nos indica la presencia de compuestos liquénicos como el ácido norestíctico que forma cristales microscópicos rojos, y en el caso de la parietina se detecta por la intensa reacción rojo violácea.

**iv. Ensayo de Ácido nítrico, HNO<sub>3</sub> 50%**

En un tubo de ensayo (13x100 mm) se colocó 1 mL del extracto acetónico y se le adicionó 5 gotas de Ácido nítrico al 50%.

**Observación:** Una coloración rojo púrpura, verde esmeralda o verde azulado nos indica prueba positiva de compuestos liquénicos.

La Tabla A, indica algunas de las reacciones de coloración de acuerdo al reactivo empleado y su posible interpretación asociado al compuesto liquénico.

**Tabla A.** Reacciones de coloración para algunos compuestos liquénicos

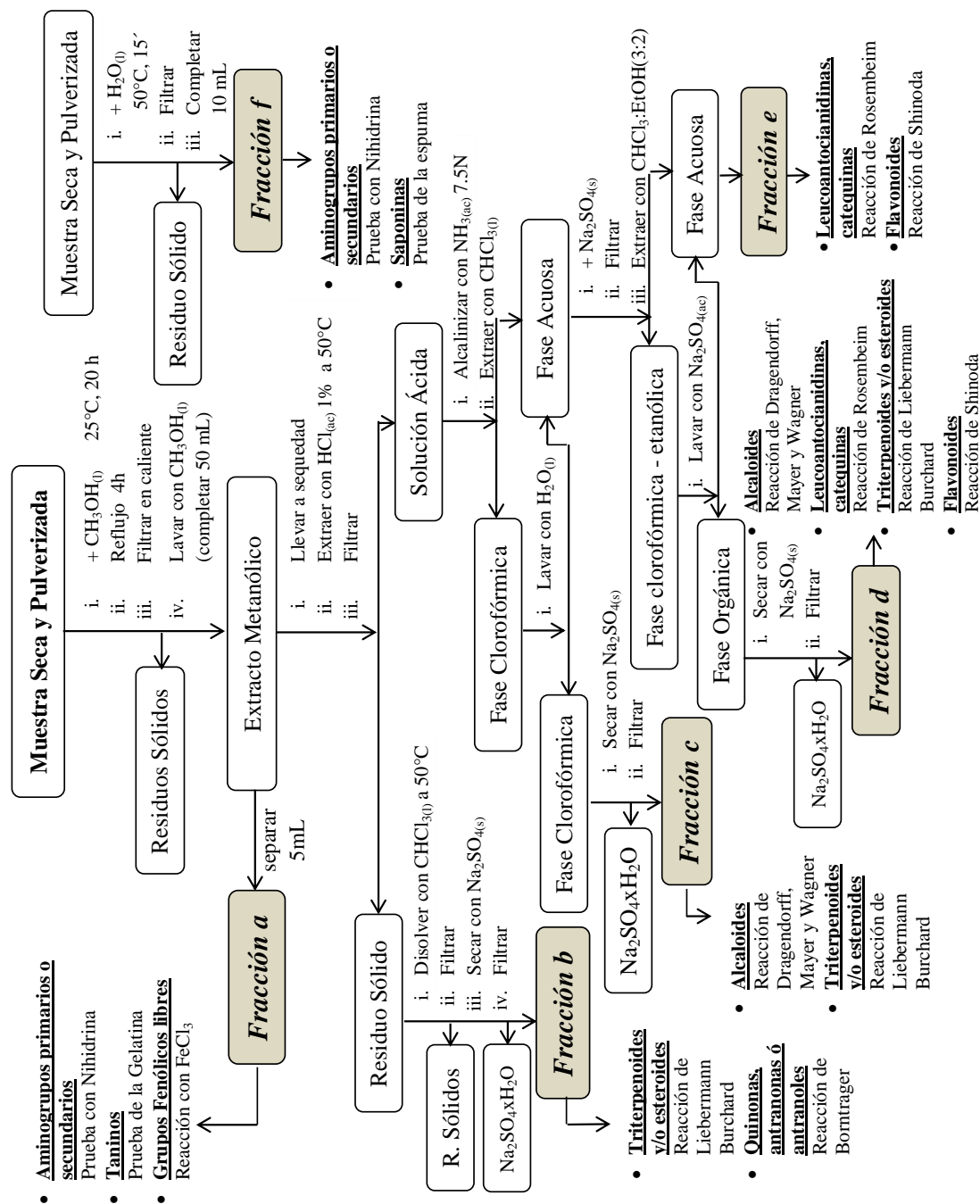
| <b>Reactivo</b>                 | <b>Coloración</b> | <b>Compuesto Liquéenico</b>  |
|---------------------------------|-------------------|--|
| <b>FeCl<sub>3</sub></b>         | Rojo – Pardo      | Pseudocifelarina A<br>Eriodermina<br>Compuestos “J” y “G”<br>Ácido Úsnico                        |
|                                 | Azul              | Estrepeilina<br>Escrobiculina  |
|                                 | Azul – violeta    | Ác. 4 – O- metilfisódico<br>Pseudocifelarina B   |
|                                 | Violeta           | Ác. Picroliquéenico  |
| <b>Ca(ClO)<sub>2</sub></b>      | Rojo Sangre       | Escrobiculina<br>Ác. Lecanórico  |
| <b>NaClO</b>                    | Rojo              | Ác. Lecanórico<br>Ác. Olivetónico  |
|                                 | Púrpura           | Ác. Meclorofaeico<br>Ác. Criptoclorofaeico   |
|                                 | Verde             | Ác. Porfirílico<br>Escrepcilina  |
| <b>KOH</b>                      | Amarillo          | Pseudocifelarina A<br>Ác. estético<br>Atranorina<br>Escrobiculina<br>Compuesto "J"<br>Ác. Úsnico |
|                                 | Rojo Vino         | Ác. Meclorofaeico<br>Ác. Criptoclorofaeico   |
|                                 | Rojo              | Ác. Norístico  |
| <b>KOH</b><br>+<br><b>NaClO</b> | Amarillo          | Ác. Úsnico   |
|                                 | Rojo              | Ác. fisódico<br>Ác. Lobárico   |
|                                 | Azul              | Estrepcilina   |



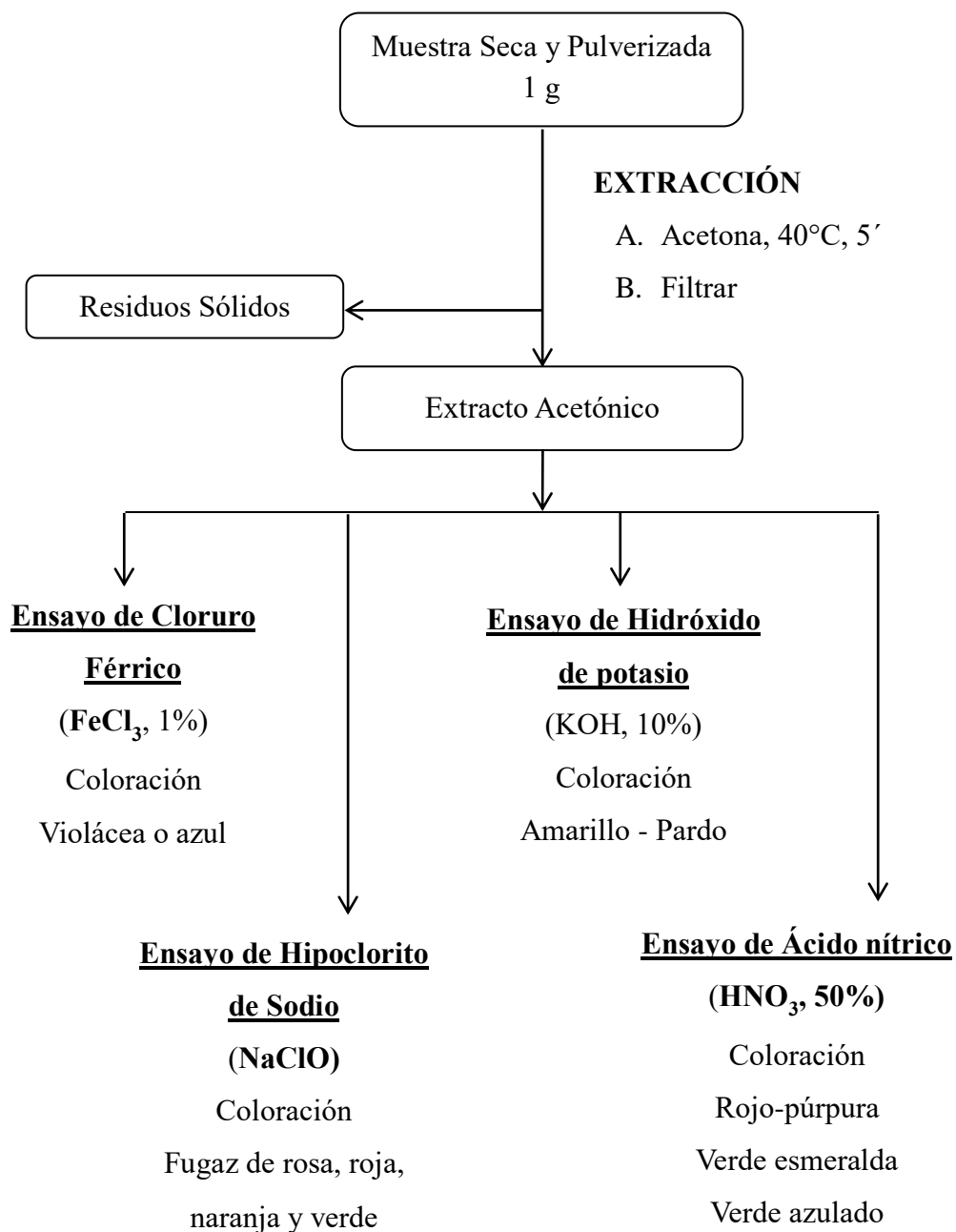
## ANEXO 7

## DIAGRAMAS DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

## A. Diagrama de Proceso de la Marcha Fitoquímica Reyna (1999)

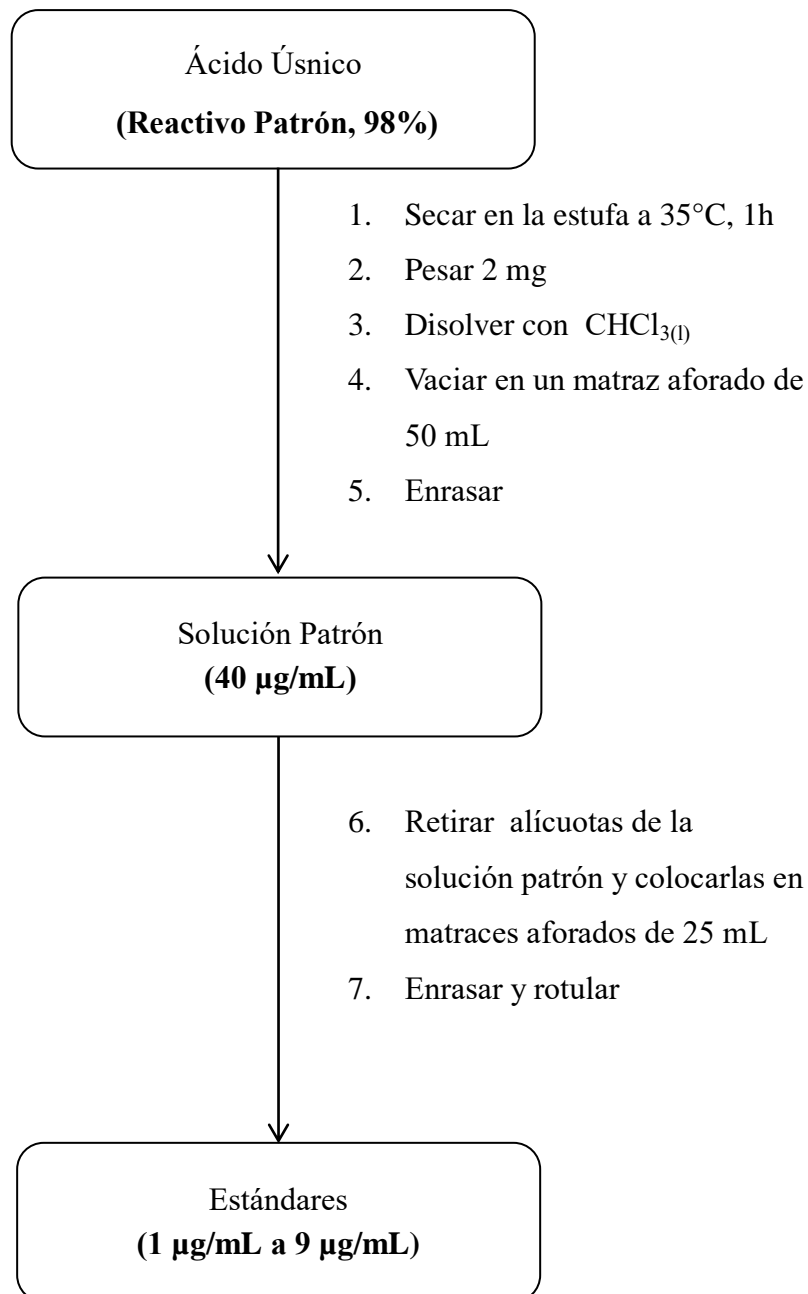


**B. Diagrama del procedimiento de las pruebas específicas para compuestos liquénicos (adaptación de Robles, 1992)**

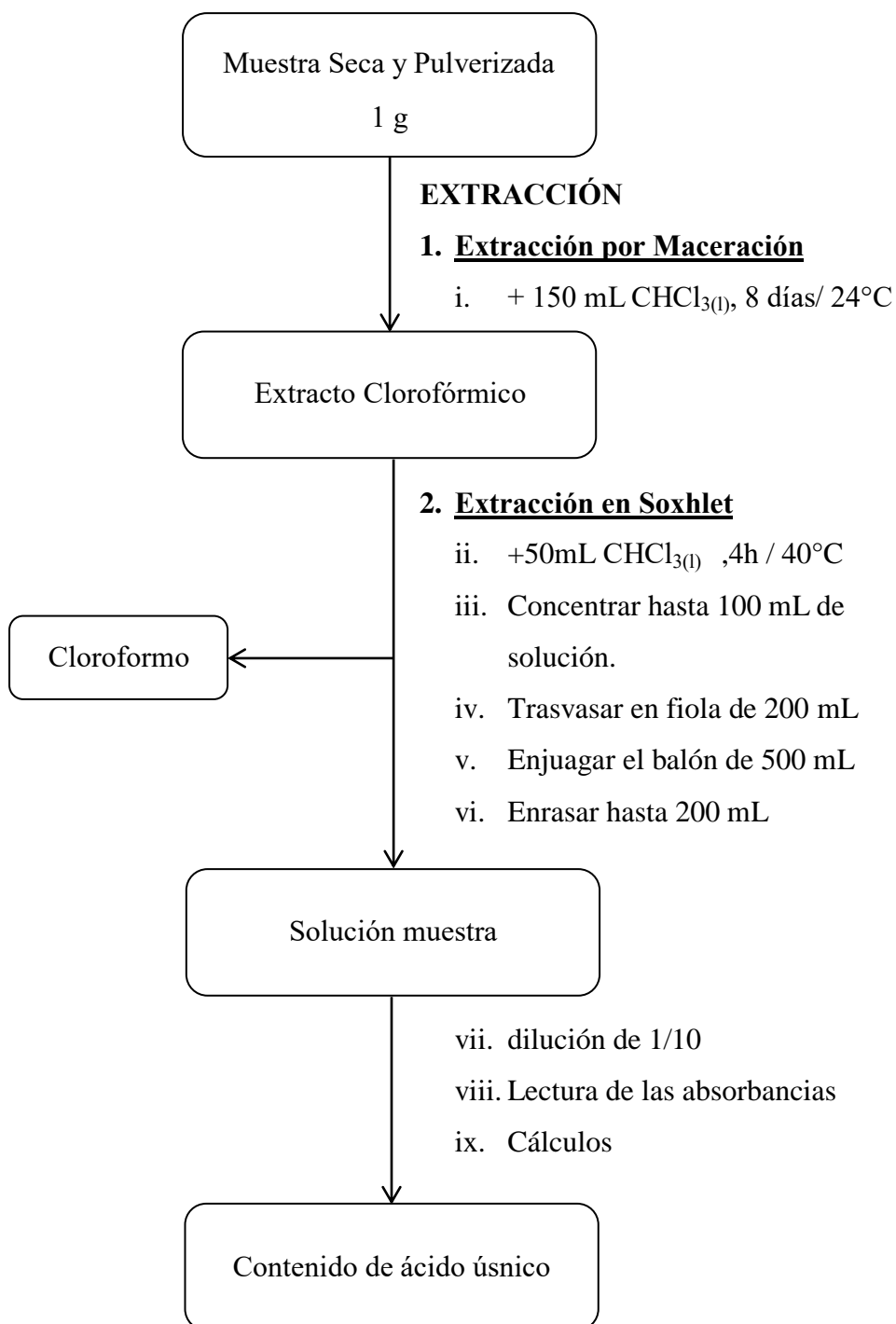


### C. Diagrama del proceso para la cuantificación del Ácido Úsnico

#### 1. Obtención de la solución patrón y estándares del ácido úsnico

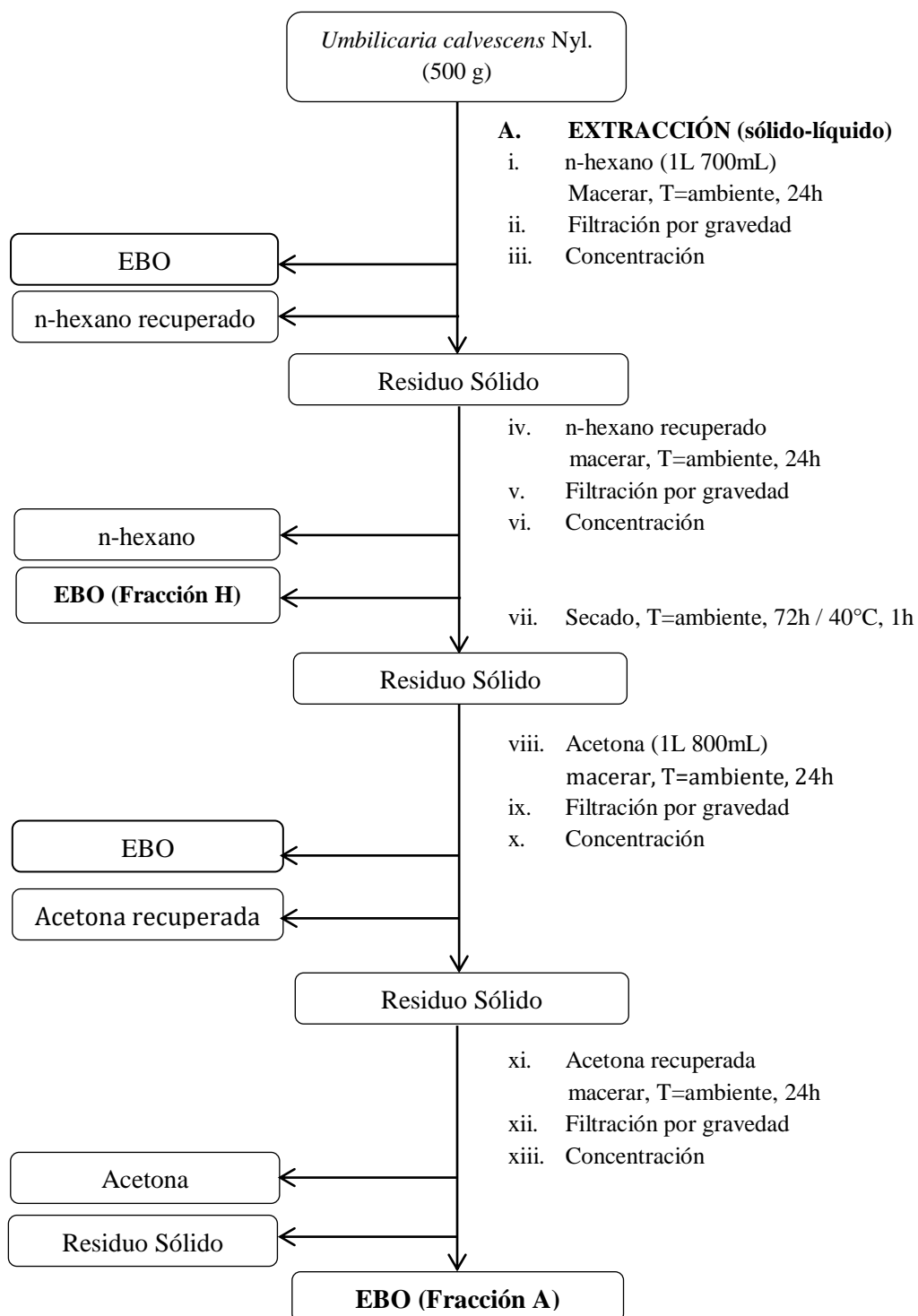


## 2. Tratamiento de la muestra líquénica

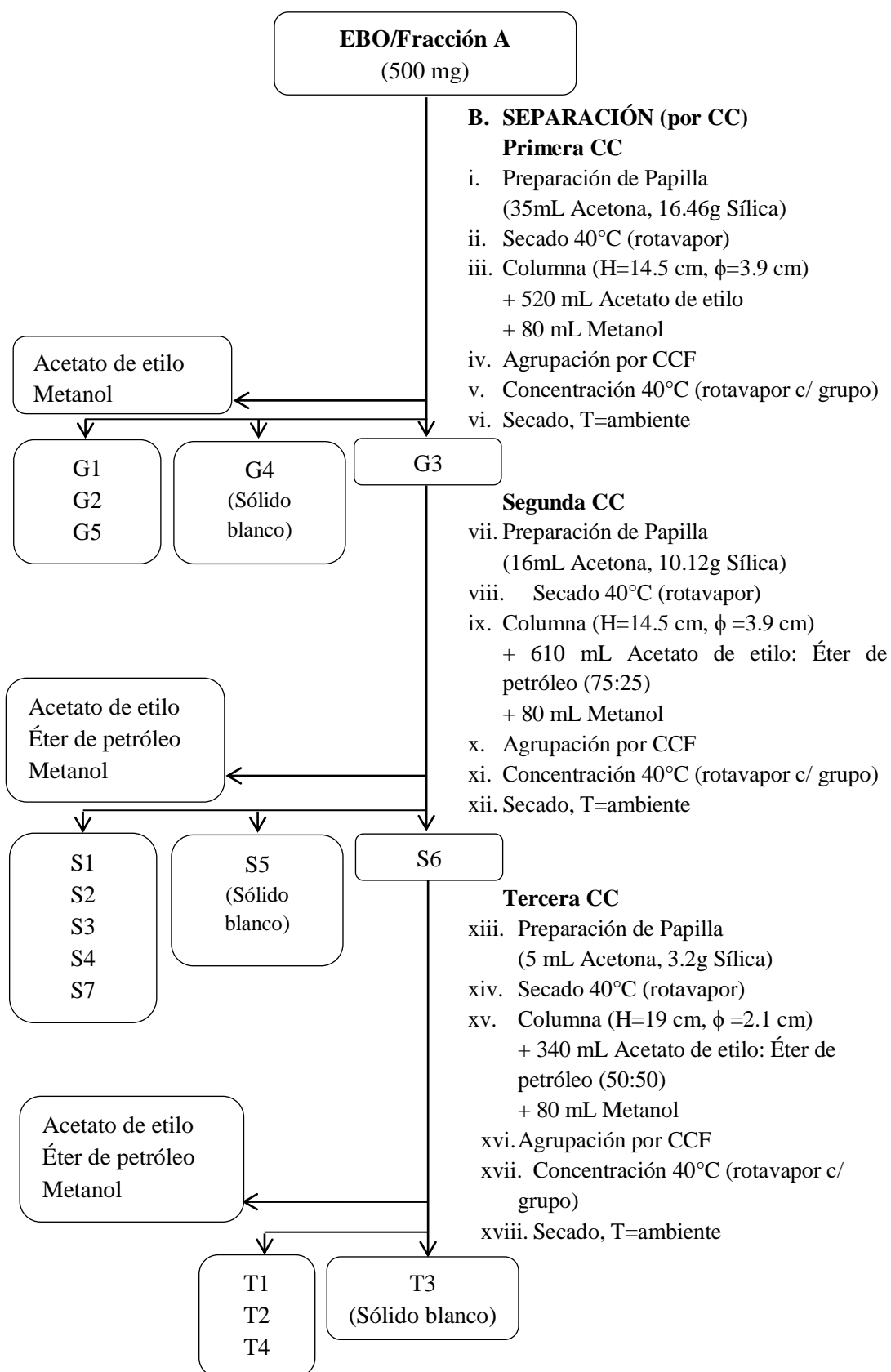


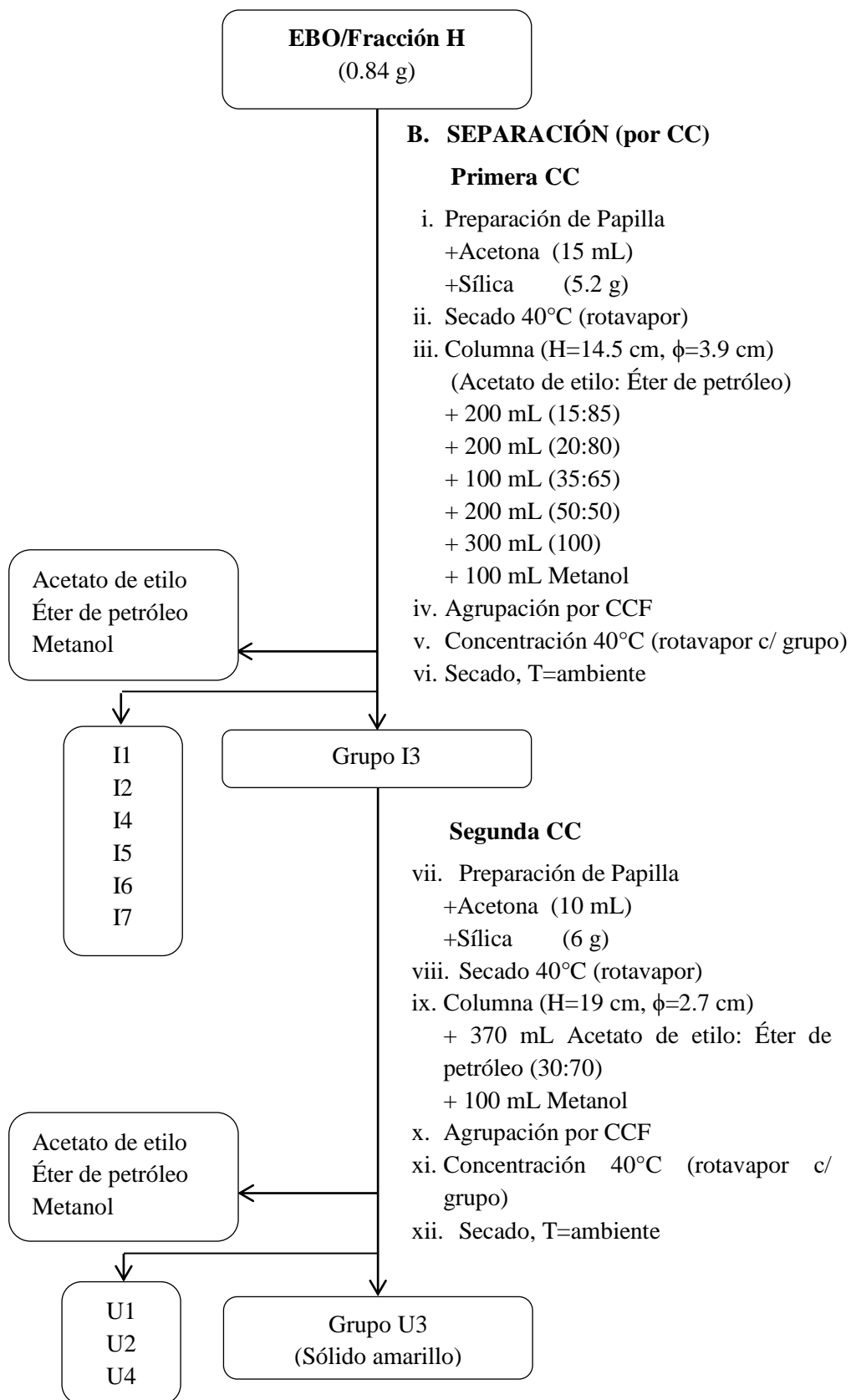
## D. Diagrama del proceso de Aislamiento de Compuestos Liquénicos

### a. Extracción Sólido - Líquido (Obtención del EBO)



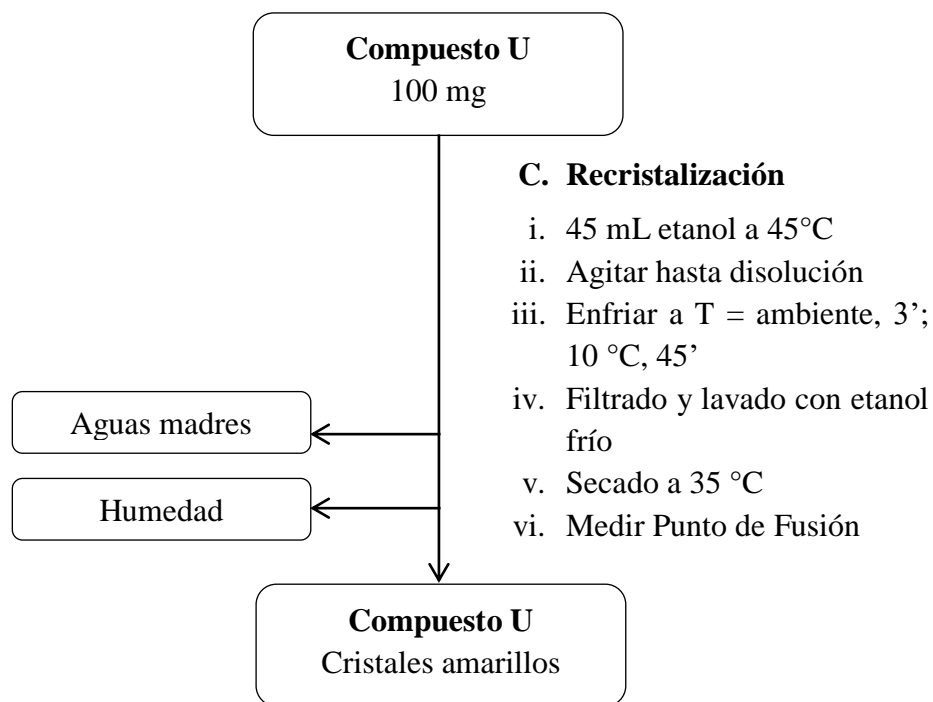
## b. Separación y Purificación por cromatografía



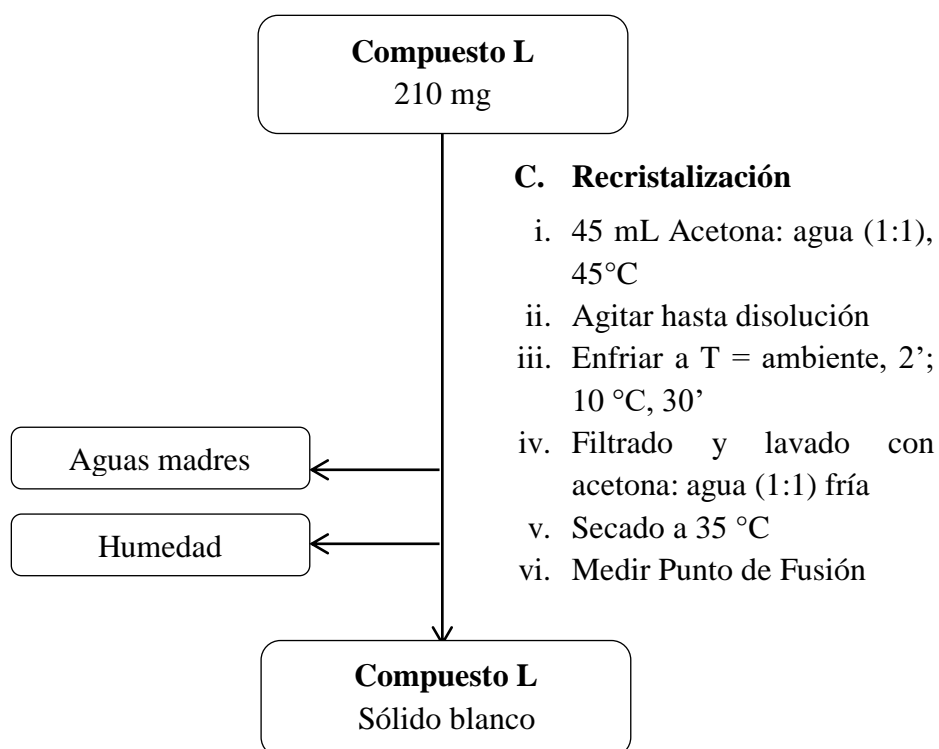


**c. Recristalización**

## i. Recristalización del Compuesto U



## ii. Recristalización del Compuesto L





## ANEXO 8

## RESULTADO DE LA MARCHA FITOQUIMICA PRELIMINAR

**Muestra** : *Umbilicaria calvescens* Nyl.  
**Procedencia** : Camino a Huaytapallana, Prov. Huancayo (Junín, 19 Oct. 13)  
**Cantidad de muestra:** 6 g  
**1° Fecha de análisis** : 16, 17 y 20 Enero del 2014  
**2° Fecha de análisis** : 26, 27 y 28 Febrero del 2014  
**Analista** : Judith Ramos Chávez

| Producto Natural  | Pruebas de coloración o precipitación | Fracción | Resultados (*) |     | OBSERVACIONES                   |
|---|---------------------------------------|----------|----------------|-----|---------------------------------|
|   |                                       |          | 1°             | 2°  |                                 |
| Aminogrupos primarios o secundarios                                 | Ninhidrina                            | a        | ++             | ++  | Mancha de color violeta         |
|   |                                       | f        | +              | +++ | Mancha de color violeta intensa |
| Grupos fenólicos libres   | Cloruro férrico                       | a        | ++             | ++  | Color azul – morado             |
| Taninos   | Gelatina                              | a        | +              | +   | ppdo. blanco                    |
| Flavonoides, excepto chalconas, auronas, Catequinas e isoflavononas | Reacción de Shinoda                   | d        | -              | -   | No se obs. Cambio               |
|   |                                       | e        | -              | -   | No se obs. Cambio               |
| Triterpenoides y/o esteroides                                       | Reacción de Libermann Burchard        | b        | +              | +   | Anillo color azul – verde       |
|   |                                       | c        | -              | -   | No se obs. cambio               |
|   |                                       | d        | +              | +   | Anillo anaranjado               |
| Quinonas, antronas o antranoles                                     | Reacción de Borntrager                | b        | -              | -   | Incoloro                        |
| Alcaloides  | Reactivo de Dragendorff               | c        | -              | -   | No hay precipitado              |
|   |                                       | d        | -              | -   | No hay precipitado              |
|   | Reactivo de Mayer                     | c        | -              | -   | No hay precipitado              |
|   |                                       | d        | -              | -   | No hay precipitado              |
|   | Reactivo de Wagner                    | c        | -              | -   | No hay precipitado              |
|   |                                       | d        | -              | -   | No hay precipitado              |
| Leucoantocianidinas (rojo), Catequinas (marrón)                     | Reacción de Rosenheim                 | d        | -              | -   | No se obs. Cambio               |
|   |                                       | e        | -              | -   | No se obs. cambio               |
| Saponinas   | Prueba de la espuma                   | f        | -              | -   | La espuma es menor a 1mm        |

(\*) Convención: (+++) abundante, (++) regular, (+) poco

**RESUMEN DE RESULTADOS:**

**CONTIENE:** Aminogrupos primarios y/o secundarios, Grupos fenólicos libres, Taninos y Triterpenos y/o esteroides.

**NO CONTIENE:** Flavonoides, Quinonas, Alcaloides, Leucoantocianidinas, Catequinas y Saponinas.

## ANEXO 9

## RESULTADO DE LA CUANTIFICACIÓN DEL ÁCIDO ÚSNICO

**Muestra** : *Umbilicaria calvescens* Nyl.

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

**Analista** : Judith Ramos Chávez

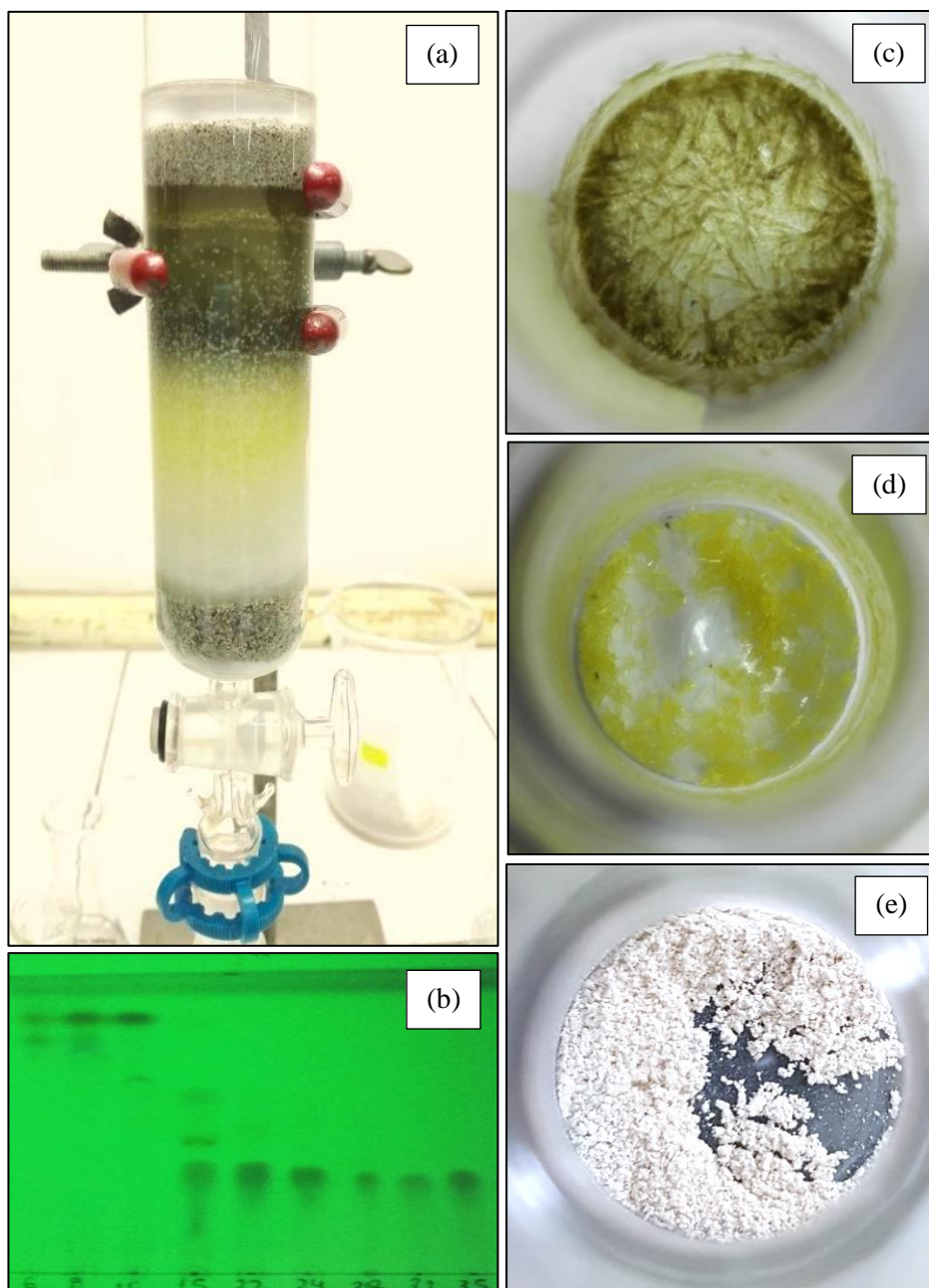
**1° Fecha de análisis:** 5, 7, 10, 12 y 14 de Febrero del 2014 (Muestra 1 y 2)

**2° Fecha de análisis:** 16, 18, 21, 23 y 25 de Julio del 2014 (Muestra 3 y 4)

| Muestra   | Cantidad (g) | Absorbancia | Concentración en la dilución (µg/mL) | % Ácido Úsnico | % Ácido Úsnico Promedio |
|-----------|--------------|-------------|--------------------------------------|----------------|-------------------------|
| Muestra 1 | 1.0006       | 0.179       | 2.063                                | 0.412          | 0.413<br>± 0.024        |
|           |              | 0.179       | 2.063                                | 0.412          |                         |
|           |              | 0.180       | 2.075                                | 0.415          |                         |
| Muestra 2 | 1.0009       | 0.181       | 2.089                                | 0.417          | 0.417<br>± 0.022        |
|           |              | 0.181       | 2.084                                | 0.416          |                         |
|           |              | 0.181       | 2.084                                | 0.416          |                         |
| Muestra 3 | 1.0007       | 0.175       | 2.016                                | 0.403          | 0.403<br>± 0.023        |
|           |              | 0.175       | 2.015                                | 0.403          |                         |
|           |              | 0.175       | 2.016                                | 0.403          |                         |
| Muestra 4 | 1.0005       | 0.175       | 2.018                                | 0.403          | 0.404<br>± 0.024        |
|           |              | 0.175       | 2.018                                | 0.403          |                         |
|           |              | 0.176       | 2.024                                | 0.405          |                         |

∴ El promedio del porcentaje de ácido úsnico total en el líquen *U. calvescens* es de 0.409 ± 0.007 %.

## ANEXO 10

AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS LIQUÉNICOS (U y L) A PARTIR  
DEL LIQUEN *Umbilicaria calvescens* Nyl.

(a) Columna Cromatográfica (CC-sílica gel) del EBO; (b) CCF de las sub-fracciones de la 3<sup>o</sup>CC-sílica gel; (c) Sólido del grupo I3; (d) Compuesto U recristalizado; (e) Compuesto L recristalizado. Foto tomada por Judith Ramos (2016).

## ANEXO 11

**TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN Y  
LA MUESTRA LIQUÉNICA *Umbilicaria calvescens* Nyl.**

**A. ANÁLISIS DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN**

**1. Obtención de la Curva de calibración**

Se realizó una lectura por triplicado para cada estándar los cuales se trabajó con los promedios para la construcción de la curva de calibración de acuerdo al modelo de los mínimos cuadrados, asimismo se realizó el ajuste de los datos de la absorbancia con la finalidad de mejorar la curva de calibración. La Tabla 1, muestra los datos obtenidos.

**Tabla 1.** Datos experimentales de la concentración y absorbancia

| <b>x = Concentración<br/>(<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b><math>y_{ab}</math> = Absorbancia</b> | <b>y = Absorbancia<br/>ajustada</b> |
|--|--|-------------------------------------|
| 0  | -0.002396                                | 0                                   |
| 1  | 0.081431                                 | 0.083827                            |
| 2  | 0.175425                                 | 0.177821                            |
| 3  | 0.258118                                 | 0.260514                            |
| 4  | 0.354365                                 | 0.356761                            |
| 5  | 0.430537                                 | 0.432933                            |
| 6  | 0.515895                                 | 0.518291                            |
| 7  | 0.583852                                 | 0.586248                            |
| 8  | 0.657476                                 | 0.659872                            |
| 9  | 0.756663                                 | 0.759059                            |
| 4.5  | 0.3811366                                | 0.3835326                           |

Empleando las siguientes fórmulas se realiza la construcción de la curva de calibración.

- **Medias de la concentración y de la Absorbancia:**

$$X_m = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad Y_m = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}$$

- **Desviación estándar de X:**

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - X_m)^2}{n-1}} = 3.027$$

Para todos los cálculos realizados se emplearon los valores de la Tabla 2 y 3.

Calculando los valores para la pendiente y la ordenada, por el método de los mínimos cuadrados:

$$b = \frac{\sum_i^n \{(x_i - X_m)(y_i - Y_m)\}}{\sum_i^n (x_i - X_m)^2} = 0.083367, \quad a = Y_m - bX_m = 0.008383$$

De esta forma la Curva de calibración del ácido úsnico:

$$y = 0.083367x + 0.008383$$

- **Cálculo del Coeficiente de correlación de Pearson (r)**

Evaluando el ajuste al modelo lineal propuesto.

$$r = \frac{\sum_i^n \{(x_i - X_m)(y_i - Y_m)\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n (x_i - X_m)^2][\sum_{i=1}^n (y_i - Y_m)^2]}}$$

Resultado:  $r = 0.9993$

(Criterio de aceptación, como mínimo 0.995, para referirse a una posible linealidad)

- **Coeficiente de determinación  $R^2$  (Mínimo 0.99)**

Siendo el valor obtenido:  $R^2 = 0.999821$

Ese valor me indica que el 99.98% de las variaciones es dado por la influencia de la concentración (variable x). Sin embargo para un mejor análisis se realiza un **Test Estadístico para el coeficiente de correlación r**.

Sean los planteamientos:

**Ho:** No existe correlación entre “x” y “y”

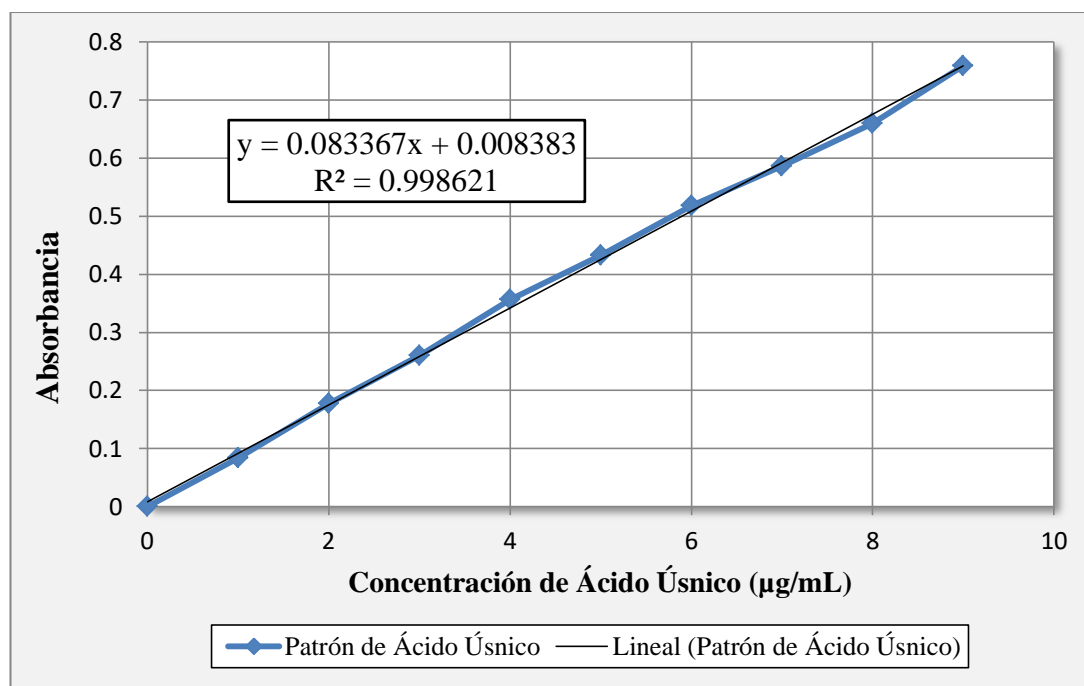
**Ha:** “r” no debe ser significativamente diferente a uno ( $r \neq 0$ )

De acuerdo a la siguiente fórmula:

$$t_{regresión} = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} = 211.258$$

Para  $n - 2 = 8$  grados de libertad, 2 colas y  $\alpha=0.05$  se halla el  $t_{tabla}$ .

$t_{tabla} = 2.306$ , como  $t_{regresión} \gg t_{tabla}$  entonces si existe una correlación lineal entre la absorbancia y la concentración. La Figura 1, muestra la relación entre x y y.



**Figura 1.** Curva de Calibración del Ácido Úsnico con 10 datos

**Tabla 2.** Datos experimentales y calculados para el análisis estadístico

| <b>X</b><br><b>(Concentración)</b> | <b>y<sub>ab</sub></b><br><b>(Absorbancia)</b> | <b>y</b><br><b>(Ajustado o corregido)</b> | <b>Y'</b><br><b>(Valor esperado)</b> |
|------------------------------------|---|---|--------------------------------------|
| 0                                  | -0.002396                                     | 0   | 0.008383                             |
| 1                                  | 0.081431                                      | 0.083827                                  | 0.09175                              |
| 2                                  | 0.175425                                      | 0.177821                                  | 0.175117                             |
| 3                                  | 0.258118                                      | 0.260514                                  | 0.258484                             |
| 4                                  | 0.354365                                      | 0.356761                                  | 0.341851                             |
| 5                                  | 0.430537                                      | 0.432933                                  | 0.425218                             |
| 6                                  | 0.515895                                      | 0.518291                                  | 0.508585                             |
| 7                                  | 0.583852                                      | 0.586248                                  | 0.591952                             |
| 8                                  | 0.657476                                      | 0.659872                                  | 0.675319                             |
| 9                                  | 0.756663                                      | 0.759059                                  | 0.758686                             |
| 4.5                                | 0.3811366                                     | 0.3835326                                 | 0.3835345                            |

**Tabla 2.** Datos experimentales y calculados (Continuación)

| <b>e = y - Y'</b><br><b>(Residuo)</b> | <b>e<sup>2</sup></b> | <b>y - y<sub>m</sub></b><br><b>(y ajustado - y media)</b> | <b>(y - y<sub>m</sub>)<sup>2</sup></b> |
|---------------------------------------|----------------------|---|--|
| -0.008383                             | 7.02747E-05          | -0.3835326  | 0.147097255                            |
| -0.007923                             | 6.27739E-05          | -0.2997056  | 0.089823447                            |
| 0.002704                              | 7.31162E-06          | -0.2057116  | 0.042317262                            |
| 0.00203                               | 4.1209E-06           | -0.1230186  | 0.015133576                            |
| 0.01491                               | 0.000222308          | -0.0267716  | 0.000716719                            |
| 0.007715                              | 5.95212E-05          | 0.0494004   | 0.0024404                              |
| 0.009706                              | 9.42064E-05          | 0.1347584   | 0.018159826                            |
| -0.005704                             | 3.25356E-05          | 0.2027154   | 0.041093533                            |
| -0.015447                             | 0.00023861           | 0.2763394   | 0.076363464                            |
| 0.000373                              | 1.39129E-07          | 0.3755264   | 0.141020077                            |
| -1.9E-05                              | 0.000791801          | 0   | 0.574165559                            |

**Tabla 2.** Datos experimentales y calculados para el análisis estadístico  
(Continuación)

| $(x-x_m)(y-y_m)$ | $Y'-y_m$   | $(Y'-y_m)^2$ | $x-x_m$ | $(x-x_m)^2$ |
|------------------|------------|--------------|---------|-------------|
| 1.7258967        | -0.3751496 | 0.140737222  | -4.5    | 20.25       |
| 1.0489696        | -0.2917826 | 0.085137086  | -3.5    | 12.25       |
| 0.514279         | -0.2084156 | 0.043437062  | -2.5    | 6.25        |
| 0.1845279        | -0.1250486 | 0.015637152  | -1.5    | 2.25        |
| 0.0133858        | -0.0416816 | 0.001737356  | -0.5    | 0.25        |
| 0.0247002        | 0.0416854  | 0.001737673  | 0.5     | 0.25        |
| 0.2021376        | 0.1250524  | 0.015638103  | 1.5     | 2.25        |
| 0.5067885        | 0.2084194  | 0.043438646  | 2.5     | 6.25        |
| 0.9671879        | 0.2917864  | 0.085139303  | 3.5     | 12.25       |
| 1.6898688        | 0.3751534  | 0.140740074  | 4.5     | 20.25       |
| 6.877742         | -          | 0.573379677  | -       | 82.5        |

**Tabla 3.** Datos experimentales y calculados para el análisis estadístico corregido.  
(Eliminación de puntos anómalos)

| $x$ (Concentración) | $y_{ab}$<br>(Absorbancia) | $y$ (Ajustado o<br>corregido) | $Y'$<br>(Valor esperado) |
|---------------------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| 0                   | -0.002396                 | 0                             | 0.008383                 |
| 1                   | 0.081431                  | 0.083827                      | 0.09175                  |
| 2                   | 0.175425                  | 0.177821                      | 0.175117                 |
| 3                   | 0.258118                  | 0.260514                      | 0.258484                 |
| 5                   | 0.430537                  | 0.432933                      | 0.425218                 |
| 6                   | 0.515895                  | 0.518291                      | 0.508585                 |
| 9                   | 0.756663                  | 0.759059                      | 0.758686                 |
| 4.5                 | 0.3811366                 | 0.3835326                     | 0.3835345                |



**Tabla 3.** Datos experimentales y calculados para el análisis estadístico corregido.  
(Eliminación de puntos anómalos) (Continuación)

| $e = y - Y'$<br>(Residuo) | $e^2$       | $y - y_m$<br>( $y$ ajustado - $y$ media) | $(y - y_m)^2$ |
|---------------------------|-------------|--|---------------|
| -0.008383                 | 7.02747E-05 | -0.3835326                               | 0.147097255   |
| -0.007923                 | 6.27739E-05 | -0.2997056                               | 0.089823447   |
| 0.002704                  | 7.31162E-06 | -0.2057116                               | 0.042317262   |
| 0.00203                   | 4.1209E-06  | -0.1230186                               | 0.015133576   |
| 0.007715                  | 5.95212E-05 | 0.0494004                                | 0.0024404     |
| 0.009706                  | 9.42064E-05 | 0.1347584                                | 0.018159826   |
| 0.000373                  | 1.39129E-07 | 0.3755264                                | 0.141020077   |
| -1.9E-05                  | 0.000791801 | 0  | 0.574165559   |

**Tabla 3.** Datos experimentales y calculados para el análisis estadístico corregido.  
(Eliminación de puntos anómalos) (Continuación)

| $(x-x_m)(y-y_m)$ | $Y'-y_m$   | $(Y'-y_m)^2$ | $x-x_m$ | $(x-x_m)^2$ |
|------------------|------------|--------------|---------|-------------|
| 1.7258967        | -0.3751496 | 0.140737222  | -4.5    | 20.25       |
| 1.0489696        | -0.2917826 | 0.085137086  | -3.5    | 12.25       |
| 0.514279         | -0.2084156 | 0.043437062  | -2.5    | 6.25        |
| 0.1845279        | -0.1250486 | 0.015637152  | -1.5    | 2.25        |
| 0.0247002        | 0.0416854  | 0.001737673  | 0.5     | 0.25        |
| 0.2021376        | 0.1250524  | 0.015638103  | 1.5     | 2.25        |
| 1.6898688        | 0.3751534  | 0.140740074  | 4.5     | 20.25       |
| 6.877742         | -          | 0.573379677  | -       | 82.5        |

## 2. Condiciones de validez de un modelo de regresión de mínimos cuadrados

### a) Análisis Gráfico de los residuos

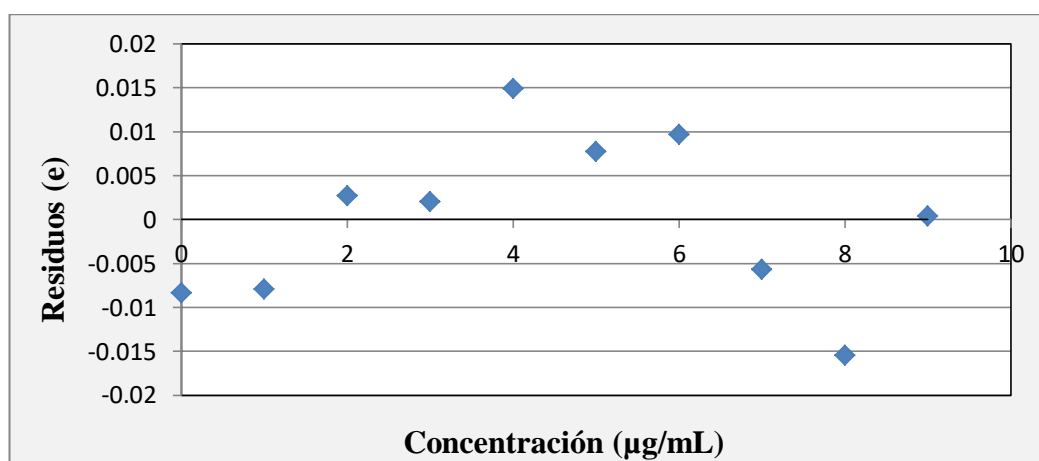
Se realiza una gráfica de residuos (e) versus la concentración del ácido úsnico.

Siendo:  $e = y_i - Y'$ ,  $Y' = a + bx$

Donde:  $y_i$ : valor obtenido por el equipo.

$Y$ : valor de la absorbancia predicha.

De la Tabla 2, se tomó los valores de X (concentración) y e (residuo) para realizar la gráfica de residuos (Figura 2), que se muestra a continuación.



**Figura 2.** Gráfica de Residuos ( n = 10).

Como se aprecia los valores del eje y (varianza del error o residuos), se muestra cierta alternación equivalente a lo largo del eje x (concentración), sin embargo algunos puntos están más alejados que otros del eje x, por lo que decimos que se tiene una heterocedasticidad (cuando la varianza del error no es constante) de la regresión lineal. Sin embargo, de acuerdo a la Figura 2 se puede eliminar puntos anómalos los cuales influirían en una mejora en el coeficiente de correlación, pero se debe tener en cuenta que existe puntos que pueden ser anómalos y a la vez niveladores (tienen influencia en la curva de calibración) los cuales se recomienda no eliminar pues afectaría mucho a la curva de calibración y a los datos que se requieran analizar.

Para validar la curva de calibración no solo se verá la parte gráfica sino la estadística, la cual me indicara si es necesaria la eliminación de puntos o si la curva de calibración obtenida es conforme. De esta manera después se podrá trabajar con los datos de la muestra liquénica.

#### **b) Ensayo de homocedasticidad de los residuos**

Además del ensayo gráfico, la homocedasticidad (cuando la varianza de los errores es constante) de los residuos puede ensayarse de acuerdo a la realización del Ensayo F para N réplicas de “y” y a dos valores de los extremos de “x”, uno bajo y otro alto. Se calculó las varianzas correspondientes y se compararon mediante un ensayo F.

La lectura de la absorbancia de los estándares preparados fue medida por triplicado para 10 datos. La Tabla 4, muestra los valores obtenidos de las absorbancias de los estándares.

**Tabla 4.** Datos de la lectura de los estándares (Por triplicado)

| <b>X</b> | <b>Y</b>  | <b>X</b> | <b>Y</b> |
|----------|-----------|----------|----------|
| 0        | -0.002441 | 5        | 0.430573 |
| 0        | -0.002502 | 5        | 0.430511 |
| 0        | -0.002243 | 5        | 0.430527 |
| 1        | 0.081451  | 6        | 0.515732 |
| 1        | 0.081406  | 6        | 0.515915 |
| 1        | 0.081436  | 6        | 0.516037 |
| 2        | 0.175507  | 7        | 0.583771 |
| 2        | 0.175415  | 7        | 0.583893 |
| 2        | 0.175354  | 7        | 0.583893 |
| 3        | 0.258072  | 8        | 0.657486 |
| 3        | 0.258026  | 8        | 0.65741  |
| 3        | 0.258255  | 8        | 0.657532 |
| 4        | 0.354416  | 9        | 0.756973 |
| 4        | 0.354248  | 9        | 0.756546 |
| 4        | 0.354431  | 9        | 0.75647  |

Realizando el **Ensayo F** para las varianzas de 1 ppm y 9 ppm.

$$H_0: S_1^2 = S_2^2,$$

$$H_a: S_1^2 \neq S_2^2$$

$$\text{Sea } S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - X_m)^2}{n-1}, \quad F_0 = \frac{S_2^2}{S_1^2} = 11.83$$

$$S_1^2 = 0.000022912878$$

$$S_2^2 = 0.000271143873$$

F crítico = 4.026, para n -1 grados de libertad,  $\alpha = 0.05$  y 2 colas.

$F_0 > F_{\text{crítico}}$ , Se rechaza la hipótesis nula, por lo que el modelo es heterocedástico.

Con estos resultados lo que se busca es tener homocedasticidad para lo cual se tendrá que eliminar puntos anómalos mejorando la linealidad de la curva de calibración.

De acuerdo a las gráficas 1 y 2, procedemos a eliminar los valores alejados del eje x y los valores anómalos, siendo estos  $x=4$ ,  $x=7$  y  $x=8$ . Al retirar estos puntos se volvió a realizar una nueva curva de calibración y un nuevo valor del coeficiente de correlación lineal. Para lo cual se consideró los datos de la tabla 3, para nuevamente realizar el mismo análisis.

### c) Error aleatorio predominante en y

De acuerdo a la nueva curva de calibración:

$$y = 0.084724x + 0.004232 \quad (R^2 = 0.999570) \text{ para } n = 7$$

$$\text{Donde: } a = 0.004232 \quad b = 0.084724$$

Un modelo de regresión es Tipo I, cuando una de las dos variables (x, y) puede ser controlada siendo la otra variable asociada a la incertidumbre. De esta forma existe cierta dependencia de un valor con el otro, por lo tanto, se debe cumplir:

$$S_x^2 \times b^2 \ll S_y^2$$

$$\text{Donde: } S_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - X_m)^2}{n-1} = 3.375, \quad S_y^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_m)^2}{n-1} = 0.071128$$

Entonces:  $S_x^2 \times b^2 \ll S_y^2$

$$3.375 \times 0.084724^2 \ll 0.071128$$

$$0.0242262 \ll 0.071128$$

El error predominante en  $y$  es de **Tipo I**, es decir existe una relación de la señal con respecto a la concentración.

### 3. Intervalo de confianza de la pendiente y ordenada

Los errores de estos parámetros se calculan a partir de la varianza de regresión, que estima los errores aleatorios en la dirección  $y$ .

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y'_i)^2}{n-1}} = 0.007051571$$

Donde  $y'_i = a + bx_i = 0.004232 + 0.084724x$

A partir de esta ecuación se tiene la desviación estándar de la pendiente (b) y de la ordenada (a).

#### a) Límite de confianza del Intercepto "a"

Este valor se calcula a partir de su desviación:

$$S_a = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - X_m)^2}} = 0.011030827$$

De este valor obtenemos el intervalo o límite de confianza para "a".

Según:  $IC(a) = a \pm tS_a$

Donde  $t$  para  $n-2=5$  grados de libertad, 2 colas y  $\alpha=0.05$  es de: 2.571

$$IC(a) = a \pm tS_a = 0.004232 \pm 2.571 \times 0.011030827$$

$$IC(a) = a \pm tS_a = 0.004232 \pm 0.028360$$

**Límite máximo:** 0.032592

**Límite mínimo:** - 0.024128

- **Test estadístico de “a”**

$$t_{exp} = \frac{|a|}{S_a} = 0.3836$$

Siendo el  $t_{tabla}$ , para  $n-2=5$  grados de libertad, 2 colas y  $\alpha=0.05$ .  $t_{tabla} = 2.571$ .

Como  $t_{exp}$  es menor que el  $t_{tabla}$  el valor de “a” es aceptable.

**b) Límite de confianza del Intercepto “b”**

Este valor se calcula a partir de su desviación:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - X_m)^2}} = 0.000883173$$

De este valor obtenemos el intervalo o límite de confianza para “a”.

Según: **IC (b) = b ± tS<sub>b</sub>**

Donde t para  $n-2=5$  grados de libertad, 2 colas y  $\alpha=0.05$  es de: 2.571

**IC(b) = b ± tS<sub>b</sub> = 0.084724 ± 2.571x 0.000883173**

**IC(b) = b ± tS<sub>b</sub> = 0.084724 ± 0.002271**

**Límite máximo: 0.086995**

**Límite mínimo: 0.082453**

- **Test estadístico de “b”**

$$t_{exp} = \frac{|b|}{S_b} = 95.93$$

Siendo el  $t_{tabla}$ , para  $n-2=5$  grados de libertad, 2 colas y  $\alpha=0.05$ .  $t_{tabla} = 2.571$

Realizando el Test de hipótesis para la pendiente “b”, se plantean la hipótesis:

**H<sub>0</sub>: b = 0**

**H<sub>a</sub>: b ≠ 0**

Como  $t_{exp}$  es mayor que el  $t_{tabla}$  entonces la hipótesis nula se rechaza, por lo que sí existe una correlación lineal significativa.

## **B. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA LIQUÉNICA**

Se realizó la medida de la absorbancia por triplicado de las muestras. Siendo la repetitividad del método de cuatro muestras (Tabla 5), en distintas fechas y para una dilución de 1/10.

**Tabla 5.** Datos experimentales de la muestra.

| <b>Muestra</b>   | <b>Cantidad de muestra (g)</b> | <b>Dilución</b> | <b>Absorbancia</b> |
|------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------|
| <b>Muestra 1</b> | 1.0006                         | 1/10            | 0.1790             |
|                  |                                | 1/10            | 0.1790             |
|                  |                                | 1/10            | 0.1800             |
| <b>Muestra 2</b> | 1.0009                         | 1/10            | 0.181229           |
|                  |                                | 1/10            | 0.180756           |
|                  |                                | 1/10            | 0.180756           |
| <b>Muestra 3</b> | 1.0007                         | 1/10            | 0.175064           |
|                  |                                | 1/10            | 0.174988           |
|                  |                                | 1/10            | 0.175049           |
| <b>Muestra 4</b> | 1.0005                         | 1/10            | 0.175171           |
|                  |                                | 1/10            | 0.175247           |
|                  |                                | 1/10            | 0.175751           |

### **a) Detección de datos anómalos ( Ensayo de Grubbs)**

De los datos obtenidos se realizó el Ensayo de Grubbs (Tabla 6), para ver si hay algún dato anómalo, para lo cual se sigue la siguiente ecuación:

$$G_o = \frac{(X_{min/max} - X_{promedio})}{S}$$

Donde:  $X_{min/max}$ : valor mínimo o máximo del valor sospechoso.

$X_{promedio}$ : promedio de los datos (se realizó por triplicado)

S: desviación

Sean los planteamientos de la hipótesis nula y alternativa:

**H<sub>o</sub>**: El dato no es anómalo

**H<sub>a</sub>**: El dato es anómalo

**Tabla 6.** Ensayo de Grubbs (Go) para la muestra líquénica.

| Muestra          | Absorbancia promedio | Desviación estándar | Grubbs (Go) |        |
|------------------|----------------------|---------------------|-------------|--------|
|                  |                      |                     | Mínimo      | Máximo |
| <b>Muestra 1</b> | 0.179333             | 0.000577            | 0.5773      | 1.154  |
| <b>Muestra 2</b> | 0.18091367           | 0.000273            | 0.577       | 1.154  |
| <b>Muestra 3</b> | 0.17503367           | 0.000040            | 0.753       | 1.134  |
| <b>Muestra 4</b> | 0.17538967           | 0.000315            | 0.693       | 1.146  |

Donde  $G_{\text{tabla}} = 1.155$  para  $n=3$  grados de libertad, 2 colas y  $\alpha$  de 0.05.

Siendo para todos los casos  $G_o < G_{\text{tabla}}$  Aceptamos  $H_o$

Confirmado que los datos no son anómalos entonces se determina la concentración y el porcentaje de ácido úsnico en la muestra líquénica.

Sea la curva de calibración obtenida:  $y = 0.084724x + 0.004232$

La concentración se obtiene mediante:  $x_0 = \frac{y_0 - a}{b}$

Y el error de esta concentración viene dado:

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - Y_m)^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - X_m)^2}}$$

$$\text{Siendo: } S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y'_i)^2}{n-1}} = 0.007051571$$

Asimismo,  $m = 3$  (triplicado) para  $n = 7$  (estándares), siendo  $b$  la pendiente de la curva de calibración,  $y_0$  el valor correspondiente al promedio de la absorbancia producida por la medida por triplicado.



Para el caso del porcentaje de ácido úsnico se sigue de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Ácido Úsnico} = \text{Concentración} \times \frac{\text{Volumen fiola}_{\text{dilución}}(\text{mL})}{\text{Alicuota retirada}(\text{mL})} \times \frac{\text{Vol. fiola inicial}(\text{mL})}{\text{Masa del Liquen}(\text{g})} \times 10^{-6} \times 100\%$$

Asimismo el error correspondiente al porcentaje de ácido úsnico es dado por la siguiente fórmula:

$$P^2 = a^2 + b^2 + c^2 + d^2 + e^2$$

Donde:  $P = \frac{\sigma_{\% \text{ Ácido Úsnico}}}{\% \text{ Ácido Úsnico}}$ ,  $a = \frac{\sigma_{\text{Concentración}}}{\text{Concentración}}$ ,  $b = \frac{\sigma_{\text{Volumen fiola}_{\text{dilución}}}}{\text{Volumen fiola}_{\text{dilución}}}$ ,

$$c = \frac{\sigma_{\text{Alicuota retirada}}}{\text{Alicuota retirada}}$$
,  $d = \frac{\sigma_{\text{Vol. fiola inicial}}}{\text{Vol. fiola inicial}}$ ,  $e = \frac{\sigma_{\text{Masa del Liquen}}}{\text{Masa del Liquen}}$

Siendo  $\sigma$  el error o incertidumbre de los equipos utilizados, los cuales se indican en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Materiales empleados con sus respectivos errores

| <b>Materiales</b>                         | <b>Cantidad empleada</b> | <b>Error</b> | <b>Características</b>                             |
|---|--------------------------|--------------|--|
| Matraz aforado o fiola (Solución muestra) | 200 mL                   | ± 0.10 mL    | Clase A<br>Material de vidrio con tapa de plástico |
| Matraz aforado o fiola (Dilución)         | 10 mL                    | ± 0.02 mL    | Clase A<br>Material de vidrio con tapa de plástico |
| Pipeta milimétrica (alícuota retirada)    | 1 mL                     | ± 0.05 mL    | Accumax<br>100 – 1000 µL                           |
| Balanza analítica                         | Aproximado 1g            | ± 0.00005 g  | Denver Instrument                                  |

El resumen de los resultados obtenidos para la cuantificación del ácido úsnico en base al tratamiento estadístico realizado, se observa en el Anexo 9 (Pág. 155).

Por lo tanto, existe evidencia suficiente a un nivel de confianza del 95% para indicar que el promedio del % Ácido Úsnico es de  $0.409 \pm 0.007 \%$ .