



## ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS Y ESTEROLES DEL LÍQUEN *EVERNIOPSIS TRULLA*

Received 02 02 2021  
Accepted 08 24 2021  
Published 08 30 2021

Vol. 38, No.3, pp. 104-112, Jul./Ago.2021  
Revista Boliviana de Química

38(3), 104-112, Jul./Aug. 2021  
Bolivian Journal of Chemistry  
DOI: 10.34098/2078-3949.38.3.1



Full original article

Peer-reviewed

Olivio N. Castro Mandujano<sup>1</sup>, Jenny L. Álvarez Bautista<sup>2</sup>

1. Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM. Av. Germán Amezaga 375, Cercado de Lima, Lima, Perú. ocastrom@unmsm.edu.pe
2. Departamento de Química Analítica, Facultad de Química e Ingeniería Química, UNMSM. Av. Germán Amezaga 375, Cercado de Lima, Lima, Perú. jenny.alvarez73@yahoo.com

**Keywords:** *Fatty acids, Sterols, Everniopsis trulla, Gas chromatographic.*

**Palabras clave:** *Ácidos grasos, Esteroles, Everniopsis trulla, Cromatografía de gases.*

### ABSTRACT

In the present work a chromatographic analysis of lichen *Everniopsis trulla* was carried out, which was collected in the department of Ancash, province of Asunción. A gaseous chromatographic analysis was carried out, which allowed us to identify the fatty acids and sterols, for which an organic extract was made, applying a classical method. A rapid method was applied to identify other compounds. These two methods, 19 fatty acids, 4 sterols, 15 lipid compounds (esters, alcohols, alkanes, etc.) were identified.

\*Correspondent author: [ocastrom@unmsm.edu.pe](mailto:ocastrom@unmsm.edu.pe)

### RESUMEN

En el presente trabajo se realizó un análisis cromatográfico del líquen *Everniopsis trulla*, que fue recolectado en el departamento de Ancash, provincia de Asunción; por un lado, se realizó un análisis cromatográfico gaseoso el cual nos permitió identificar los ácidos grasos y esteroides, para ello, se realizó un extracto orgánico, aplicando un método



clásico. Por otro lado, se aplicó un método rápido para identificar a otros compuestos. De estos dos métodos se identificó a 19 ácidos grasos, 4 esteroides, y 15 compuestos lipídicos (ésteres, alcoholes, alcanos, etc.).

## INTRODUCCIÓN

Los lípidos se definen como sustancias derivadas de tejidos vivos que pueden extraerse o solubilizarse en disolventes orgánicos de baja polaridad. Esta definición bastante flexible abarca una amplia gama de compuestos que van desde moléculas de bajo peso molecular como los ácidos grasos, esteroides hasta complejos como los glicolípidos de alto peso molecular [1].

Por otro lado, Hostettmann 2008 [2], comenta que el progreso de la fitoquímica de los productos naturales esta siempre ligado a las innovaciones de la tecnología analítica [2]. La identificación de metabolitos lipídicos de extractos orgánicos de los líquenes junto con las técnicas sofisticadas como las que se disponen actualmente en los laboratorios, como la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS). Con la cual, ahora es posible producir directamente una fase gaseosa de iones moleculares para la mayoría de los lípidos, tanto si son ácidos grasos simples o sustancias lipídicas más complejas, todo esto da como resultado una información estructural más completa sobre los constituyentes lipídicos del líquen [2, 3].

Según la búsqueda bibliográfica realizada, no hay estudios lipídicos del líquen *Everniopsis trulla*, pero cabe resaltar la investigación de Ramaut [4], 1978, realizó solo cromatografía de capa delgada CCD, del extracto etanólico. Elix [5], 1993, hace una revisión de la familia *Parmeliaceae* e investigó a la *E. trulla* pero no menciona ningún componente lipídico, la publicación de Castro [6] en 2017, hizo un análisis metabolómica del líquen *E. trulla*, empleando el UHPLC-DAD-MS, el cual le permitió identificar la presencia de dos compuestos aromáticos simples, seis derivados lipídicos, ocho depsidonas, trece dépsidos, un cromona, dos difeniléteres y un dibenzofurano identificado. En este sentido, nuestro objetivo de la presente investigación es identificar los componentes lipídicos por análisis CG-MS.

## EXPERIMENTAL

### *Material Biológico*

El líquen en estudio ha sido recolectado en el departamento de Ancash, provincia de Asunción, distrito de Chacas, pueblo de Canchas; a una altitud 3427 msnm. La fecha de la primera recolección fue el día 5 de mayo de 2015; las coordenadas del lugar de recolección son: 9° 09' 56.59" S; 77° 22' 08.40" O. El nombre científico, fue identificado por la Dra. Magda Chanco (Museo de Historia Natural de la UNMSM).

### *Marcha Fitoquímica y Reacciones de Coloración*

Para un análisis preliminar se pueden realizar diferentes ensayos directos a los extractos disponibles, esto es bueno usarlo cuando nos interesa conocer los tipos de compuestos que contiene el líquen, así de esta forma dirigir mejor los objetivos y/o definir las estrategias a realizar y aislar los compuestos. Por ello, se realizó la marcha fitoquímica como indica la referencia [7]. También se realizó diferentes reacciones de coloración específicos para compuestos liquénicos [7].

### *Análisis de Ácidos Grasos por CG*

Se aplicó el método clásico, el cual consta de varias etapas (aproximadamente 8 etapas). Se pesó 200 mg de la muestra (extracto con  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 1:1), luego, se saponificó con KOH 0,5 N, en baño de agua, a 55° C, por 20 min; la saponificación liberó los ácidos grasos de la muestra, las que se neutralizó por adición de 5 mL de HCl diluido (1:1), los ácidos se extraen con 10 mL de éter de petróleo. Este primer extracto, se lavó por agitación con 10 mL de agua, el extracto etéreo se seca con sulfato de sodio anhidro, se evaporó a sequedad con corriente de  $\text{N}_2$ . El residuo se disolvió en 10 mL de éter de petróleo; se tomó una alícuota de 1 mL, la que se evaporó a sequedad en presencia de nitrógeno, se agregó 10 mL de  $\text{HClO}_4$  al 5% en metanol y se calentó a 55°C por 5 min. Los ésteres se extrajeron con éter, se lavaron y secaron como en el primer



extracto, quedando listos para el análisis en el CG [8]. Luego, se tomó una alícuota de 1  $\mu$ L, se inyectó en el cromatógrafo, de igual forma en paralelo se inyectaron los estándares, bajo las siguientes condiciones: Equipo: cromatógrafo Hewlett Packard-HP-5890, serie II; detector FID; columna HP – 5 (5% Fenil metil Silicona) 25 m x 0,32 mm x 0,52 mm; con temperatura de la columna 1' / 160° / 10' / 300° / 10'; temperatura del inyector 280° C; temperatura del detector 300° C; gas carrier He; Flujo del H<sub>2</sub> a 1 mL / min; volumen inyectado es 1  $\mu$ L y Split: 1:100.

### Análisis de Esteroles por CG

El método para el análisis de esteroides se inició saponificando 100 mg del extracto CHCl<sub>3</sub>-Etanol, con 2 mL de KOH 50% y 8 mL de etanol 95%, se agitó 10 minutos con magneto en plancha sin calentamiento. Se llevó a un baño maría a 90°C durante 1 hora, se agita 10 minutos con magneto en plancha sin calentamiento, luego, se enfrió. Luego, se agregó 5 mL de agua destilada, transfirió a una pera de decantación de 100 mL, se extrajo con 5 mL de hexano 4 veces. Se agregó un poco de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para secar el extracto hexánico, se filtró y el filtrado se secó bajo atmósfera de nitrógeno. A esta muestra se agregó 1000  $\mu$ L de hexano, de esta solución se inyectó 1  $\mu$ L al cromatógrafo de gases [8].

### Análisis de componentes lipídicos por un método directo

El método aplicado es un método rápido, donde se trabaja con un extracto de diclorometano. Se pesó 5 gramos, se añadió 15 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se colocó en el ultrasonido por 10 minutos a temperatura ambiente, luego, este extracto lipídico se concentró hasta sequedad, luego al residuo se añadió hexano 5 ml y se llevó al ultrasonido por 2 minutos; a esta solución hexánica, se analizó en el equipo, se inyectó al cromatógrafo (Agilent GC-MS 5973), pero, ahora este equipo este acoplado a un espectrómetro de masas y tiene una base de datos NIST. [9]. Las condiciones cromatográficas son las siguientes: tipo de columna: capilar; clase de columna: estándar no polar; gas carrier: H<sub>2</sub>; fase activa: DB-1; longitud de la columna: 30 m; diámetro de la columna: 0,2 mm; temperatura de inicio: 50 °C; temperatura final: 300 °C y velocidad de calentamiento: 5 K/min [10-12].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resultados de la marcha fitoquímica y reacciones de coloración del liquen

La marcha fitoquímica realizada en forma general según referencia (con la única modificación de que se empleó 100 gramos de muestra seca y molida, en vez de 50 gramos), dio como resultado que el liquen, la *Everniopsis trulla*, contiene compuestos liquénicos ácidos fenólicos, dépsidos, depsidonas, ácidos úsnico y además contiene otros metabolitos secundarios como esteroides, triterpenos, y otros que se indican en la tabla 1, y no contiene alcaloides.

Tabla 1. Resultados de la marcha fitoquímica y de las reacciones de coloración.

COMPUESTOS	REACTIVOS	COMPUESTO	RESULTADO
Metabolitos secundarios	FeCl <sub>3</sub>	Fenoles y taninos	+++
	Ninhidrina	Aminoácidos	+
	Shinoda	Flavonoides	-
	Borntrager	Antraquinonas	-
	Dragendorff	Alcaloides	-
	Mayer	Alcaloides	-
	Liebermann-Burchard	Esteroides y triterpenos	++
Compuestos liquénicos	FeCl <sub>3</sub>	Ácidos fenólicos	+
	KOH	Depsidonas	+
	Ca ( ClO ) <sub>2</sub>	Dépsidos	++
	KOH + Ca ( ClO ) <sub>2</sub>	Ácido úsnico	+++



Estos resultados, en parte concuerda con las dos únicas investigaciones de la misma especie de Ramaut (1978) [4] y Elix (1993) [5], en donde por un lado Ramaut (1978), realizó sólo CCD del extracto etanólico del líquen *Everniopsis trulla* (Apurímac-Perú), y determinaron que la *Everniopsis trulla* contiene ácido úsnico, atranorina, cloroatranorina y dos componentes no identificados. Además, Elix (1993) [5] hizo un estudio botánico y menciona que la composición química de la *Everniopsis trulla* es: atranorina y ácido úsnico en la parte superficial del talo; en las paredes celulares hay polisacáridos no determinados; además, contiene triterpenos y  $\beta$ -orcínol depsidonas, en la parte medular del líquen.

### Resultados del análisis de ácidos grasos por CG (Método Clásico)

Este es un método usado frecuentemente, pero tiene la desventaja que se emplean patrones cuando no se tiene el equipo acoplado al espectrómetro de masas, son muchas etapas (alrededor de 8), genera bastante residuos orgánicos, etc. para este método empleamos el equipo HP 5890 y tuvimos que pasar también los estándares a las mismas condiciones de trabajo.

El procedimiento experimental nos garantiza tener a los ácidos grasos libres por saponificación (cuando se añadió el KOH), previamente fue derivatizado para obtener un extracto bruto de ácidos grasos; luego, se inyecta al equipo y así se logra identificar a los ácidos grasos comparándolos con los patrones que se tiene a disposición. En la figura 1, se observa el cromatograma de los estándares y en la figura 2, se observa el cromatograma del líquen en estudio, en donde se identifica a los ácidos grasos presente en la planta líquénica según su tiempo de retención, esta información se resume en la tabla 2; los valores y el nombre del ácido graso concuerda con la referencia bibliográfica [8, 9]. Con ayuda de estándares se detectaron 17 ácidos grasos (figura 2), de los cuales en mayor proporción se encuentran el ácido palmítico, ácido cis-oleico y ácido linoleico. De los resultados obtenidos por CG vemos que la *E. trulla* contiene los ácidos grasos saturados como el palmítico (16:0) y esteárico (18:0), además, contiene los ácidos grasos insaturados linoleico (18:2) y cis-oleico (18:1) ver tabla 2.

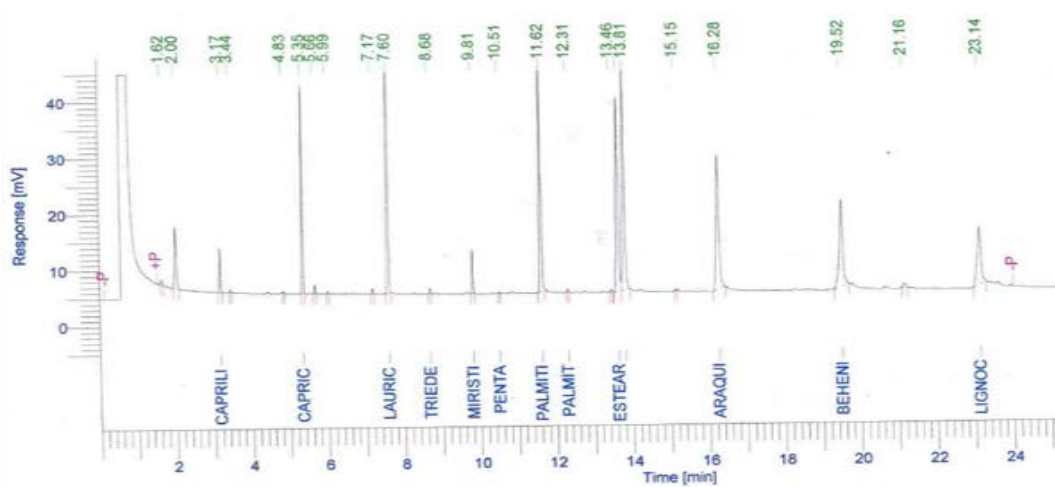


Figura 1. Cromatograma de los estándares de ácidos grasos

En la presente investigación, también, se encontraron ácidos grasos minoritarios como el ácido caprílico (8:0), cáprico (10:0), láurico (12:0), tridecanoico (C13:0), mirístico (14:0), pentadecanoico (15:0), palmitoleico (16:1), heptadecanoico (C17:0), linoléico (18:2), nonadecanoico, araquídico (20:0), eicosenoato, heneicosanoico (C21:0), behénico (22:0) y lignocérico, todos estos componentes van de acuerdo a los reportados en la bibliografía [9].

### Resultados del análisis de esteroides por CG

El procedimiento experimental nos garantiza inyectar un extracto orgánico bruto en esteroides casi en su totalidad. Así cuando analizamos los cromatogramas, ver figura 3 y 4, tenemos al cromatograma de los cuatro estándares (brassicasterol, campesterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol) y de la muestra respectivamente, corridos a las mismas condiciones. En la tabla 3, se muestran las cantidades relativas encontradas de esteroides analizados; además, en la



figura 4, se observa que aparte de estos esteroides estándares existen otras señales donde falta identificar a estos esteroides, pero que con una análisis cromatográfico CG-SM, si se podría identificar y cuantificar a todos los esteroides contenidos en el líquen (ver tabla 3), estos componentes y su valores concuerda con la bibliografía [10,11].

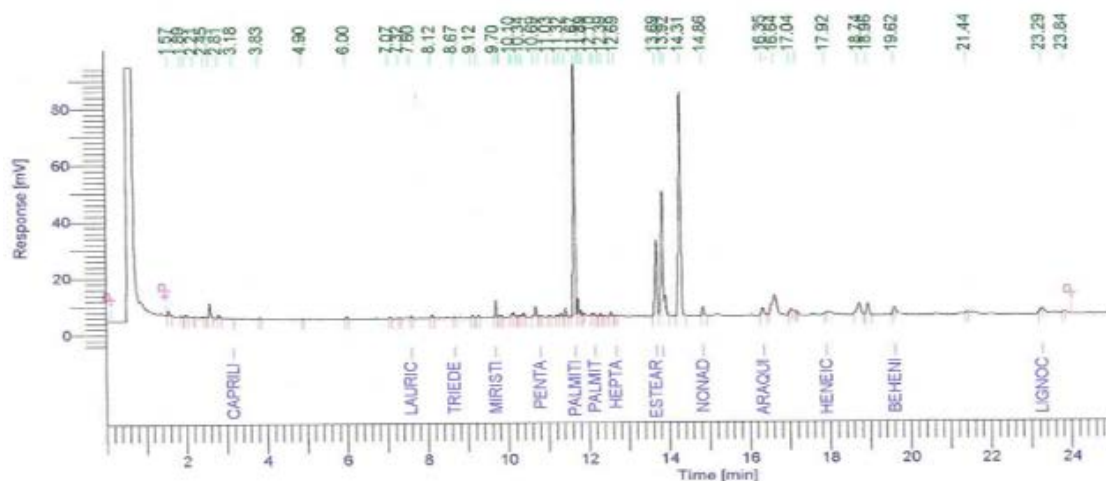


Figura 2. Cromatograma de los ácidos grasos del líquen *Everniopsis trulla*

Tabla 2. Contenido de ácidos grasos en el líquen *Everniopsis trulla*

Nombre del ácido graso	Cantidad relativa en el líquen %	Nombre del ácido graso	Cantidad relativa en el líquen %
Ác. lignocérico	0,14	Ac. esteárico	8,71
Ác. behémico	0,21	Ác.heptadecanoico	0,42
Ác.heneicosanoico	0,04	Ác. palmitoleico	0,20
Ác. araquídico	0,08	Ác. palmitico	26,68
Ác. linolénico	1,19	Ác.pentadecanoico	0,65
Ac. linoleico	23,32	Ác. miristico	0,70
Ac. cis-oleico	15,31	Ác. tridecanoico	0,02
Ac. esteárico	8,71	Ác. láurico	0,11
Ác.heptadecanoico	0,42	Ác. cáprico	0,95
		Ác. caprílico	0,05

Tabla 3. Cantidad relativa de esteroides que contiene el líquen

Esteroides	Tiempo de retención en minutos	%
Brassicasterol	21.501	5.91
Campesterol	22.361	3.31
Estigmasterol	22.892	4.91
β-sitosterol	23.826	4.94

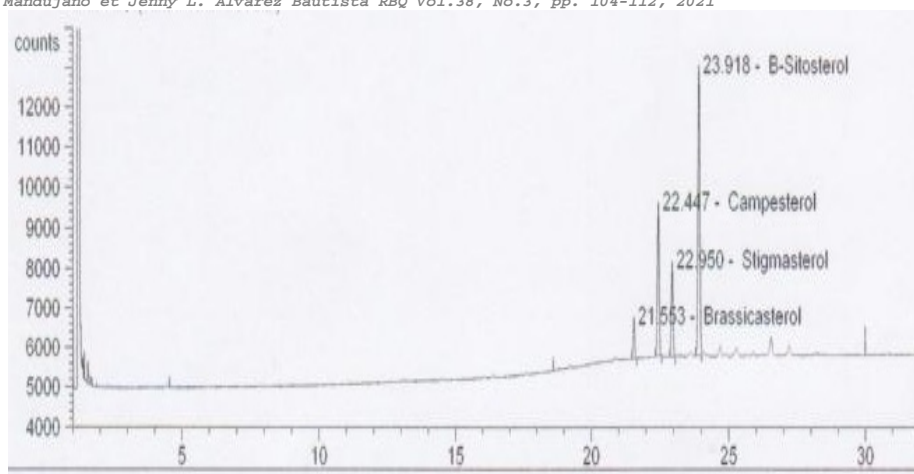


Figura 3. Cromatograma de CG de esteroides estándares

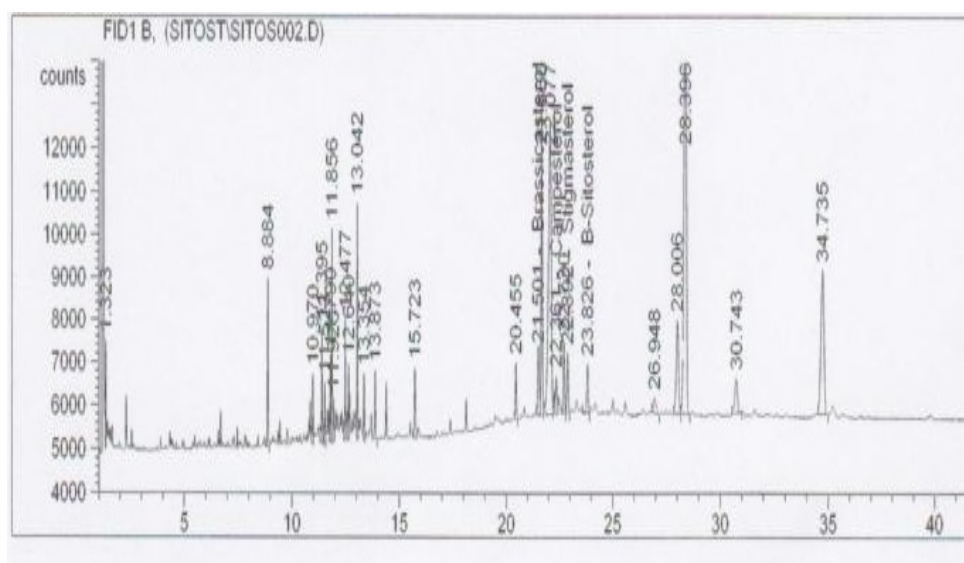


Figura 4. Cromatograma de esteroides de CG de la Everniopsis trulla

### Resultados del análisis lipídico del líquen mediante el método directo

El método aplicado es un método rápido en el cual se realizó un extracto diclorometano y luego de concentrar otro extracto con hexano, finalmente, de este último extracto se inyecta el equipo; todo aquello permitió analizar los componentes lípidos, componentes apolares (13-metil, (8 $\beta$ , 13 $\beta$ ) 17-norkau-15-eno) y sustancias de baja polaridad como el ácido metil éster, (z)-9-hexadecenoico. En la figura 5, se observa el perfil lípidos y allí hay varias señales que todavía falta identificar. Si bien es un método sencillo, pero no es específico, es decir, es una extracción de todos los tipos de componentes de baja polaridad y/o que son solubles en diclorometano [10-12].

El cromatograma de gases del extracto de diclorometano de la *E. trulla* se presenta en la Figura 5. A manera de ejemplo de los compuestos obtenidos, sus estructuras químicas de algunos de ellos se muestran en la figura 6 y 7, en donde se identifican solo a 15 picos, los más altos, pero como se observa el cromatograma hay otros picos de baja intensidad y que estos faltan identificar. Recordemos que al hacer el procedimiento clásico de análisis para ácidos grasos y esteroides es posible que se haya formado algunos derivados propios de la reacción de derivatización. En cambio, en este análisis con hexano o diclorometano solo se hizo una extracción orgánica y a temperatura ambiente, entonces en este caso no se ha formado ningún derivado. En la figura 6, se encuentran los espectros de masas y sus



estructuras químicas de algunas sustancias de los 15 compuestos lipídicos identificados. Por otro lado, en la tabla 4 se muestran los compuestos lipídicos identificados con algunas características [10-12].

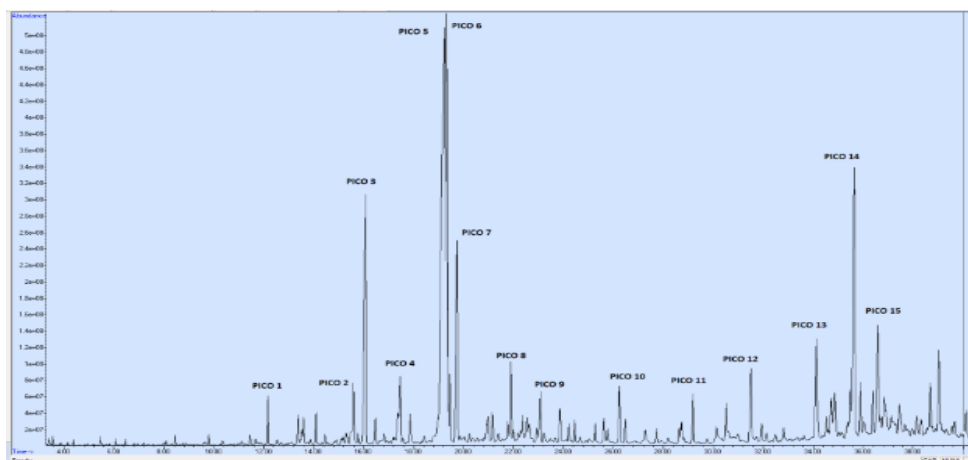
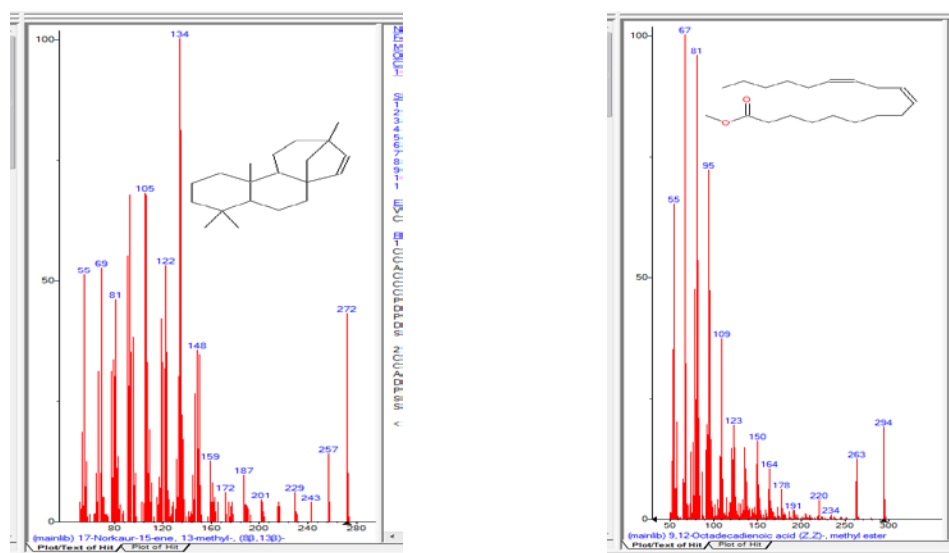


Figura 5. Cromatograma del análisis lipídico del líquen *E. trulla*



pico 4: 13-metil, (8 $\beta$ , 13 $\beta$ ) 17-norkau-15-eno

pico 5: ácido metil éster (z, z)-9,12-octadecadienoico

Figura 6. Espectros de masas de los picos 1-6 del líquen *E. trulla*

Finalmente cabe mencionar que debido a sus componentes identificados de ácidos grasos y esteroides esta especie líquénica aporta una composición para la dieta de los humanos, esta sería la razón porque muchos de estos líquenes son consumidos en Japón y China [12].

## CONCLUSIÓN

Se realizó el análisis lipídico con dos diferentes métodos y se logró identificar a los componentes lipídicos del líquen *E. trulla*, estos son: 19 ácidos grasos, 4 esteroides, 15 compuestos lipídicos (ésteres, alcoholes, alcanos, etc.).



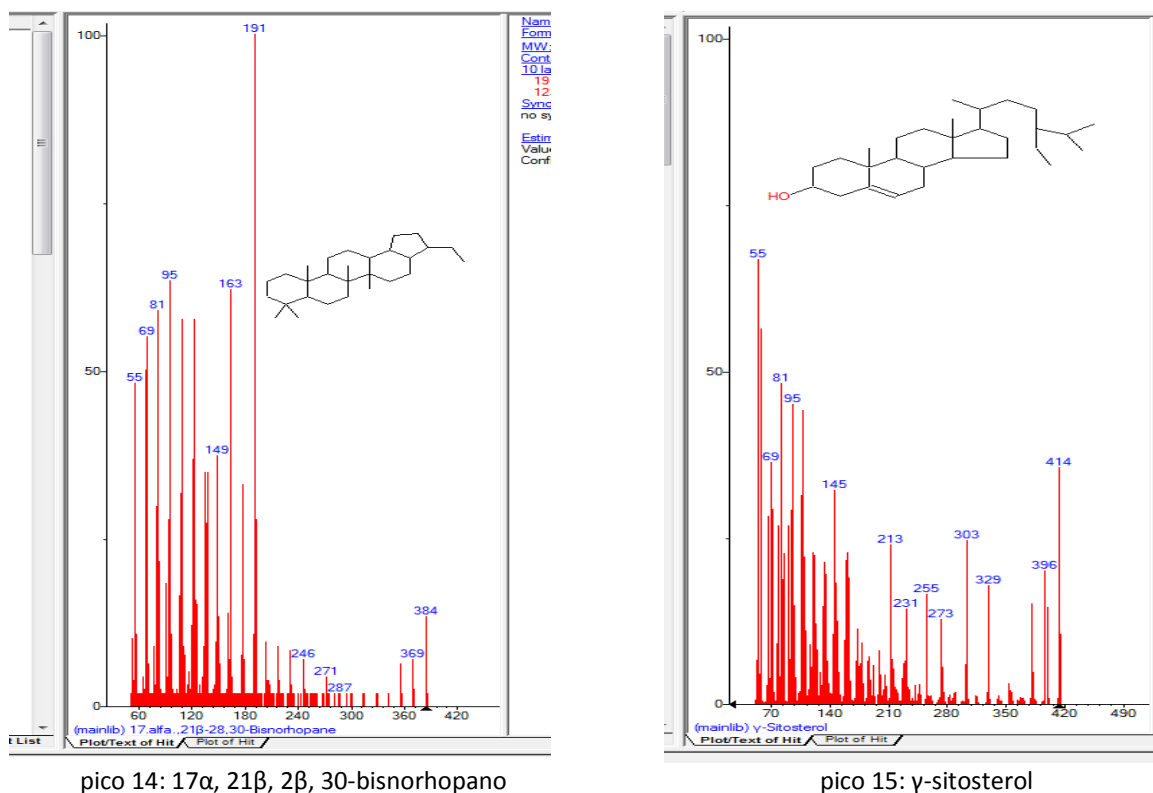


Figura 7. Espectros de masas de los picos 13-15 del liquen *E. trulla*

Tabla 4. Componentes lipídicos del liquen *Everniopsis trulla*

PICO	Tiempo de retención tr en min	COMPUESTO	FM	PM
1	12,143	metil tetradecanoato	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	342,22
2	15,818	acido metil ester (z)-9-hexadecenoico	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	268,24
3	16,082	acido metil ester, (z)-9-hexadecenoico	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	268,24
4	17,225	acido metil ester hexadecanoico	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270,26
5	19,117	13-metil, (8β, 13β) 17-norkau-15-eno	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	272,25
6	19,206	acido metil ester (z, z)-9,12-octadecenoico	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	294,26
7	20,188	acido metil ester (z)-9-octadecenoico	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	296,27
8	21,872	metil estearato	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	298,29
9	22,852	acido metil ester araquidonico	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	318,25





PICO	Tiempo de retención tr en min	COMPUESTO	FM	PM
10	26,225	acido metil ester eicosanoico	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	326,32
11	29,078	acido metil ester docosanoico	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	354,35
12	31,428	acido metil ester tetracosanoico	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	382,38
13	34,105	17 $\alpha$ , 21 $\beta$ , 2 $\beta$ , 30-bisnorhopano	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub>	384,38
14	35,411	tritetracontano	C <sub>43</sub> H <sub>88</sub>	604,69
15	36,709	$\gamma$ -sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	414,39

## RECONOCIMIENTOS

Se agradece a la Dra. Magda Chanco, por la identificación botánica; al Quím. César Poma Pando, Jefe del Laboratorio de Análisis Servicios Analíticos Generales SAC, Lima-Perú.

## REFERENCIAS

- Murphy, R., Fiedler, J., Hevko, J. **2001**, Analysis of Nonvolatile Lipids by Mass Spectrometry, *Chem. Rev.*, *101*(2), 479-526. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr9900883>
- Hostertmann, K., Gupta, M., Marston, A., Ferreira, E. **2008**, Handbook of strategies for the isolation of bioactive natural products, SECAD y CYTED, Serie Ciencia y Tecnología No. 160, Bogotá.
- Rankovic, B. Lichen secondary metabolites, Springer, Cham, **2014**, Germany. DOI: 10.1007/978-3-319-13374-4
- Ramaut J L, Brouers M, Serusiaux E, Corvisier M. 1978, Separation of mixtures of atranorina and chloroatranorin by thin layer chromatograph, *Journal Chromatography*, *155*, 450-453.
- Elix, J. **1993**, Progress in the generic delimitation of *Parmelia* sensu lato lichens (Ascomycotina: Parmeliaceae) and a Synoptic key to the Parmeliaceae, *The Bryologist*, *96*(3), 359-383. DOI: <https://doi.org/10.2307/3243867>
- Castro, O., Benites, B., Rodilla, J., **2017**, Metabolomic Analysis of the Lichen *Everniopsis trulla* using Ultra High Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry (UHPLC-Q-OT-MS), *Chromatographia*, *80*, 967-973. DOI: 10.1007/s10337-017-3304-4
- Castro, O. Investigación fitoquímica de los líquenes. editorial académica española, **2016**, Riga-Letonia, Unión Europea.
- Molina, M. C., Crespo, A., Vicente, C., Elix, J. A. **2003**, Differences in the composition of phenolics and fatty acids of cultured mycobiont and thallus of *Physconia distorta*, *Plant Physiology and Biochem*, *41*(2), 175-180. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)00017-7](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)00017-7)
- Sassaki, G., et al. **1999**, Glycosyldiacylglycerolipids from the Lichen *Dictyonema glabratum*. *J. Nat. Prod.* *62*(6), 844-847, DOI: <https://doi.org/10.1021/np980547f>
- Safe, St., Safe, L., Maass, W. **1975**, Sterols of three lichen species: *Lobaria pulmonaria*, *Lobaria scrobiculata* and *Usnea longissima*, *Phytochemistry*, *14*(8), 1821 – 1823. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(75\)85302-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(75)85302-7)
- Wojciechowski, Z., Goad, J., Goodwin, T. **1973**, Sterols of the lichens, *Prog. Phytochem.*, *12*(6), 1433 – 1436, DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(73\)80579-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(73)80579-5)
- Jiao, J., Zhang, Y. **2013**, Transgenic Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids: A Sustainable Biochemical Engineering Approach for Making Essential Fatty Acids in Plants and Animals, *Chem. Rev.*, *113*(5), 3799–3814. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr300007p>