

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Usnea durietzii* MOT. (USNEACEAE)

B. Ruth Zelada^{1*}, Ana Pastor de Abram²

RESUMEN

En el Perú existen escasos estudios fitoquímicos de especies liquénicas, requiriendo por ello una mayor atención. Las sustancias liquénicas reportan diversas actividades, entre ellas: antibacteriana, antitumoral, herbicida e insecticida. El género *Usnea* presenta gran variedad de especies, *Usnea durietzii*, especie de esta investigación, no reporta estudios fitoquímicos a nivel nacional e internacional. El objetivo de esta investigación fue aislar y determinar estructuras de compuestos liquénicos presentes en *U. durietzii*. A través de la marcha fitoquímica se determinó la presencia de quinonas, triterpenos y esteroides; en menor cantidad, fenoles, taninos, grasas, lactonas y cumarinas, azúcares y flavonoides. La extracción de metabolitos liquénicos se realizó a partir de extractos en solventes de polaridad creciente. Se logró aislar y caracterizar espectroscópicamente al compuesto $C_{18}H_{16}O_7$ como ácido úsnico y al compuesto $C_{18}H_{12}O_{10}$, ácido salazínico.

Palabras clave: fitoquímica, liquen, *Usnea durietzii*, ácido úsnico, ácido salazínico, técnicas espectroscópicas.

PHYTOCHEMISTRY STUDY FROM *Usnea durietzii* MOT. (USNEACEAE)

ABSTRACT

In Peru, there are few lichen phytochemical studies as they require much greater attention. Lichen substances have different purposes, such as antibacterial, antitumor, herbicide and insecticide. The genus *Usnea* has a wide variety of species, *Usnea durietzii* the specie used in this study doesn't report any phytochemical studies on national or international level to date. The objective of this research was to isolate and identifying lichenic components from *Usnea durietzii*. Through the screening of its phytochemistry we were able to determine quinones, triterpens and steroids, and to a lesser degree phenols, tannins, fats, lactones and coumarins, sugar and flavonoids. The extraction of secondary metabolites was made from extracts with solvents of increasing polarity, and permitted us to isolate and characterize the spectroscopic compound $C_{18}H_{16}O_7$ usnic acid and the compound $C_{18}H_{12}O_{10}$ salazinic acid.

Key words: phytochemical, lichen, *Usnea durietzii*, usnic acid, salazinic acid, spectroscopic technics.

^{1*} Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias - Sección Química; Av. Universitaria 1801, San Miguel, Lima 32, Perú. ruthzeladam@gmail.com

² Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias - Sección Química; Av. Universitaria 1801, San Miguel, Lima 32, Perú

INTRODUCCIÓN

Los líquenes son organismos simbióticos a partir de un alga o cianobacteria y un hongo, con características propias y diferentes a los que les dieron origen. Son organismos inferiores de distribución global, encontrándose desde el nivel del mar hasta las cimas de las altas montañas, y desde regiones tropicales a la zona ártica.

Estudios fitoquímicos previos en líquenes, reportan la presencia de ácido úsnico en especies del género *Usnea* como sustancia química mayoritaria y en menor presencia de depsidonas y dépsidos¹. Por otro lado, los escasos estudios fitoquímicos existentes sobre líquenes peruanos en publicaciones académicas y científicas, dan una idea de que hasta el momento no es un tema muy explorado en nuestro medio. Se sabe que muchas de las sustancias líquénicas aisladas en diferentes partes del mundo, han reportado actividades antibacterial, antitumoral, antipirético, citotóxico, así como también, efectos ecológicos, siendo por ello de interés investigarlos^{2,3}. A nivel industrial, los líquenes son empleados como fuentes de colorantes⁴.

A través del estudio fitoquímico nos permitirá reconocer y aislar diferentes metabolitos en esta especie; posteriormente se caracterizarán espectroscópicamente. Los resultados permitirán asignar un reconocido valor a este recurso natural.

PARTE EXPERIMENTAL

Material biológico

Usnea durietzii fue colectada en la localidad de Carhuamayo-Junín, a 4146 msnm y coordenadas geográficas 10°54'55,75"S 76°03'34,51"O. El material biológico, voucher N° 242694-USM, se encuentra depositado en el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural - UNMSM.

Para el estudio fitoquímico la parte aérea fue secada en estufa a 40 °C por una semana, luego molida. Este material fue rotulado y guardado en oscuridad y ambiente seco, para su posterior determinación de humedad⁵.

Marcha fitoquímica

Se usó el método de Ciulei⁶, para el reconocimiento de los metabolitos secundarios; en el extracto etéreo se evaluó la presencia de grasas y aceites, alcaloides, lactonas y cumarinas, triterpenos y/o esteroides. En el extracto etanólico, se determinó la presencia de: catequinas, azúcares, saponinas, fenoles y taninos, aminoácidos libres o aminoras, quinonas, flavonoides y antocianidina.

Determinación de ácidos grasos y esteroides

A partir de 10 g de líquen^{7,8} se aislaron ácidos grasos, los cuales se saponificaron y se analizaron por CG en una columna DB-225 (50 %-cianopropilfenil)-metil polisiloxano. 30 m x 0,32 mm x 0,25. Empleando la metodología de Kovacs⁹ se aislaron esteroides, se saponificaron y evaluaron por CG, columna DB-5 (5 % fenilmetilpolisiloxano) 30 m x 0,32 mm x 0,25, comparando la muestra con patrones estándares.

Fraccionamiento de extractos y aislamiento de metabolitos

500 g de líquen seco y molido fueron sometidos a extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo y acetona. El tiempo de extracción a temperatura ambiente, en cada caso, varió entre 4 a 7 días. Se obtuvo extractos: hexánico (Hx) con 2,05g (0,41%); clorofórmico (Cl) con 15,67g (3,13%) y acetónico (Ac) con 8,84g (1,77%).

El extracto hexánico se lavó con etanol al 95%; proporcionó 0,34 g de cristales aciculares pequeños, amarillo verdosos. Esta fracción se recrystalizó por cuatro veces sucesivas con ácido acético glacial en caliente, dando 0,13 g de cristales aciculares amarillos, que llamamos el compuesto 1.

El extracto clorofórmico se lavó con etanol al 95% y recrystalizó en CHCl_3 :EtOH (1:1). Esta recrystalización proporcionó una fase sólida, la cual se recrystalizó tres veces con ácido acético glacial y dio el compuesto 1; la fase líquida se concentró a sequedad; fue lavada sucesivamente con EtOH 95% dando un sólido morado denominado fracción 1, la cual analizada por HPLC indicó la presencia de ácido úsnico, norstictico y tres sustancias desconocidas. Debido a la baja solubilidad de estas últimas en metanol (solvente empleado para HPLC) se presume que serían pigmentos poliméricos¹⁰.

La identificación y purificación de los compuestos aislados fueron realizadas por CCD en el sistema por Tol:AcOH (17:3).

El extracto acetónico se concentró a temperatura ambiente. El sólido obtenido se lavó con 10 mL de CHCl_3 , proporcionando una fase líquida que fue concentrada a sequedad; se lavó y recrystalizó sucesivamente con ácido acético glacial obteniéndose el compuesto 1; de la fase sólida, corrida por CCD en el sistema Tol:AcOEt:AcOH (6:4:1) se aisló un compuesto mayoritario, compuesto 2, el cual se obtuvo del lavado con éter dietílico y purificado por CCDP.

La visualización y localización de las bandas por CCD se llevó a cabo mediante reveladores físicos, como luz visible (Vis), ultravioleta (UV): 254 y 366 nm. y con el revelador químico ácido sulfúrico al 10%, 100 °C, 5 minutos.

Caracterización de los metabolitos aislados

Se usó técnicas espectroscópicas como UV, IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, experimentos homo y heteronucleares, mono y bidimensional. Se efectuaron experimentos especiales como: DEPT, COSY, HSQC y HMBC. Asimismo, se usó la espectrometría de masas con ionización por electronebulización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Usnea durietzii (figura 1) no presenta usos etnobotánicos en la zona de estudio. La literatura reporta para este líquen propiedades abortivas y tóxicas¹¹.



Figura 1. *Usnea durietzii* líquen saxícola, localidad de Carhuamayo-Junín, 4 146 msnm

Usnea durietzii, seca y molida, tenía $12,0 \pm 1,0$ % de humedad. La marcha fitoquímica permitió identificar cualitativamente: quinonas, triterpenoides y esteroides y en menor cantidad fenoles, taninos, grasas y aceites, lactonas y cumarinas, azúcares reductores y flavonoides.

Se reconoció en el líquen la presencia de ácidos grasos saturados e insaturados mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Ácidos grasos reconocidos en *Usnea durietzii*

N° pico	Ácidos grasos	Fórmula molecular	Tiempo de retención (min)	Área normalizada (%)
1	Palmitico	16 : 0	11,88	40,15
2	Palmitoleico	16 : 1	12,12	1,20
3	Heptadecanoico	17 : 0	12,77	1,61
4	Esteárico	18 : 0	14,00	14,43
5	Cis-oleico	18 : 1	14,19	20,67
6	Linoleico	18 : 2	14,65	21,63

Mediante GC se identificó en *Usnea durietzii* los esteroides: brassicasterol, campesterol, estigmasterol y -sitosterol. La muestra contiene, además, otros esteroides no reconocidos por falta de estándares de bajo peso molecular (figura 2).

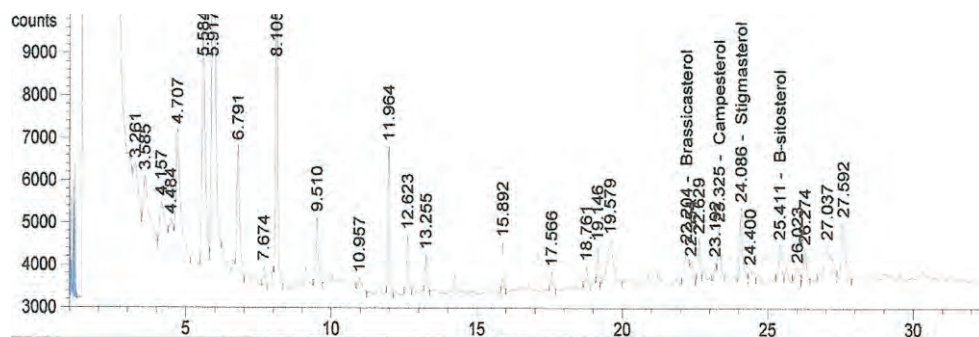


Figura 2. Cromatograma GC de esteroides en *Usnea*

Elucidación estructural del compuesto 1

El compuesto 1 se aisló como cristales aciculares amarillo azufre, con punto de fusión de 201 °C, rotación óptica $[\alpha]_D^{26} = +500^\circ$. En CCD sobre sílica gel eluida con Tol:AcOH (17:3) tiene $R_f=0,62$, es mancha de color amarilla a la luz visible, lila a 254 nm y roja oscura a 366 nm. Es soluble en cloroformo y acetona, poco soluble en etanol 95%. Se aislaron 12,11 g, peso que corresponde a un rendimiento de 2,42%.

En UV (MeOH 95%), presenta absorciones a 221 y 290 nm, sugiriendo la existencia de un grupo cromóforo conjugado.

En IR, presenta las siguientes absorciones principales: hidroxil con asociación intermolecular (3442 cm^{-1}), hidroxil intramolecular ($3091,17\text{ cm}^{-1}$), CH aromático (3007 cm^{-1}), carbonilo de cetona á, â-insaturada (1691 cm^{-1}), estiramiento C-O-C (1289 cm^{-1}) y estiramiento C-O (991 cm^{-1}).

^1H RMN (CDCl_3 , 300MHz), presenta señales a: 1,76 ppm (3H, s), 2,10 ppm (3H,s), 2,67 ppm (3H, s) y 2,68 ppm (3H, s); estos cuatro singuletes se asignan a metilos, a 5,98 ppm (1H,s) de tipo alquénico o aromático, a 11,03 (1H,s), 13,31 ppm (1H,s) y 18,85 ppm (1H,s); esta tres últimas se asignan a grupos hidroxilo, ya detectados en el IR.

^{13}C RMN (CDCl_3 , 75MHz), presenta 18 señales, las cuatro primeras entre 7,5 y 32,1 ppm de carbonos saturados; entre 98,3 y 109,2 ppm, señales de carbonos de tipo bencenoico. Las cinco señales que aparecen entre 155,7 y 191,7 ppm, corresponderían a carbonos sp^2 desplazados a campo bajo por efecto de heteroátomos. Finalmente, las señales de 198, 200,3 y 201,8 ppm, corresponden a carbonos de grupo carbonilo.

Los espectros DEPT 45° y 135° la ausencia de 13 señales confirman que estos son de tipo cuaternario, en ambos espectros se aprecian 5 señales, cuatro de ellas a campo alto, corresponden a carbonos sp^3 de metilos y, la quinta señal, a 98,3 ppm correspondería a un carbono sp^2 de tipo CH.

El espectro de masas (100 – 450 m/z) con ionización por electronebulización, dio un pico molecular relación m/z de 343,1 correspondiente al ion negativo por pérdida de un protón de la molécula neutra (figura 3).

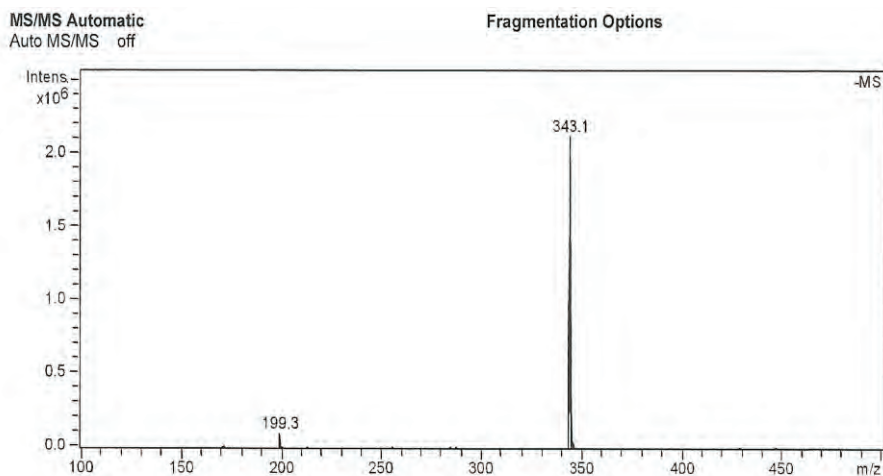
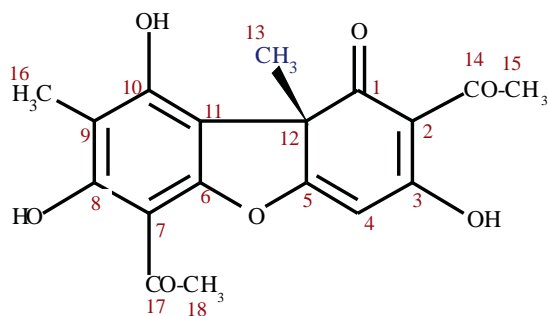


Figura. 3. Espectro de masa-ESI del ácido úsnico aislado de *Usnea durietzii*

El peso molecular del compuesto 1 es 344 Da. En base a la información espectroscópica mostrada y a las propiedades físicas y químicas evaluadas, se propone que el compuesto 1 de fórmula molecular de: $C_{18}H_{16}O_7$; es el (+)-ácido úsnico, al que corresponde la siguiente estructura:



(+)-ácido úsnico

El espectro COSY (0 - 8 ppm), en la diagonal contiene las señales de 4 diferentes hidrógenos; al no tener ninguna señal fuera de la diagonal, se confirma que en esta molécula no existe ningún sistema de acoplamiento protón-protón.

El espectro HSQC, de correlación heteronuclear, permitió reconocer correlaciones de cada hidrógeno con un solo carbono, confirmando en todos los casos su naturaleza geminal. La tabla 2, presenta los resultados del espectro HSQC:

Tabla 2. Resultados de HSQC de compuesto 1

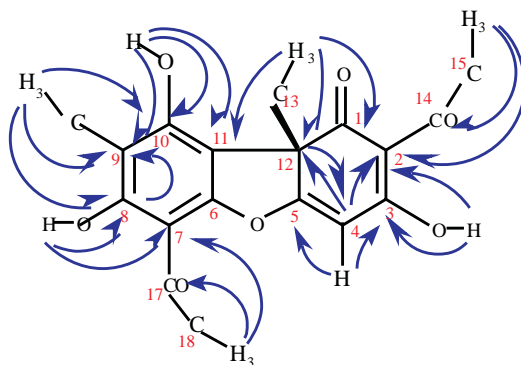
$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Grupo enlace
1,76	32,1	$C_{(13)}H_3$
2,10	7,5	$C_{(16)}H_3$
2,67	27,9	$C_{(15)}H_3$
2,68	31,2	$C_{(18)}H_3$
5,98	98,3	$= C_{(4)} - H$

En base a los resultados obtenidos, se propone las siguientes asignaciones a los diferentes carbonos e hidrógenos, tabla 3:

Tabla 3. Resultados de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto 1

N° de Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	$\delta^1\text{H}$ ppm
1	198,0	---
2	105,2	---
3	191,7	18,85, s
4	98,3	5,99, s
5	179,3	---
6	155,2	---
7	101,5	---
8	163,8	13,31, s
9	109,2	---
10	157,5	11,03, s
11	103,9	---
12	59,1	---
13	32,1	1,77, s
14	201,8	---
15	27,9	2,67, s
16	7,5	2,10, s
17	200,3	---
18	31,3	2,68, s
CDCl_3	77,0	7,27

El espectro HMBC de correlación heteronuclear reconoce acoplamientos C-H a larga distancia (figura 4). Se observa que el protón del 3-OH se correlaciona con C_3 , a dos enlaces y, con C_2 y C_4 a tres enlaces. El hidrógeno de 8-OH se correlaciona con C_8 a dos enlaces y con C_7 y C_9 a tres enlaces. De la misma manera, el hidrógeno 10-OH, se correlaciona con C_{10} a dos enlaces y con C_9 y C_{11} a tres enlaces. El protón H-4 se correlaciona con C_3 y C_5 a dos enlaces y, con C_2 y C_{12} a tres enlaces. Para el caso de los protones metílicos, H-13 se correlacionan con C_{12} a dos enlaces y, con C_1 , C_5 y C_{11} a tres enlaces. El H-18 se correlaciona con C_{17} a dos enlaces y con C_7 a tres enlaces, H-15 se correlacionan con C_{14} , a dos enlaces y con C_2 a tres enlaces. Los protones metílicos aromáticos H-16 se correlacionan con C_9 a dos enlaces y con los C_8 y C_{10} a tres enlaces. Estos resultados se resumen en la tabla 4.



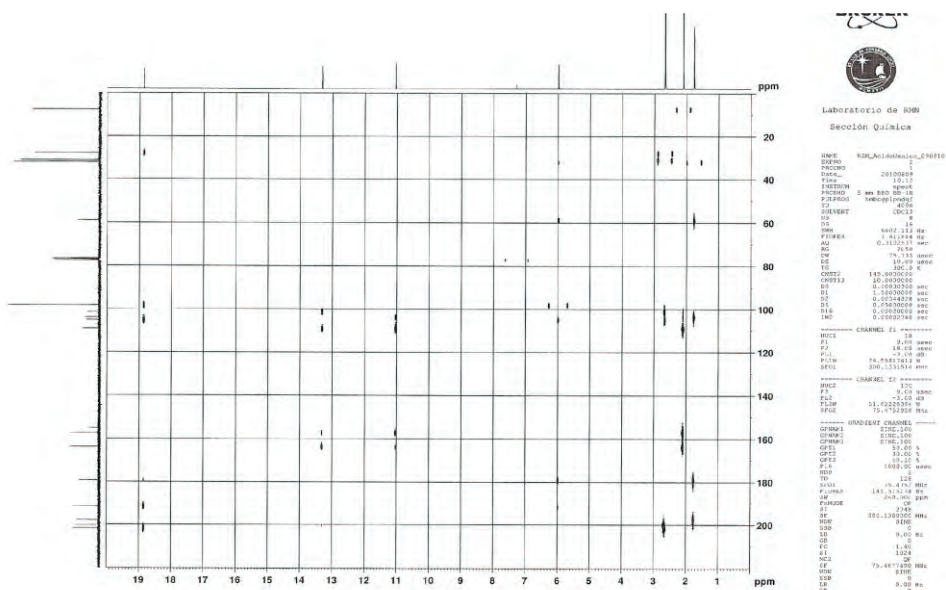


Figura 4. Espectro HMBC del ácido úsnico aislado de *Usnea durietzii*

Tabla 4. Resultados de HMBC del compuesto 1

Nº C	$\delta^1(\text{H})$, ppm	Número de enlaces	$\delta^{13}\text{C}$, ppm
4	(H ₄) 5,98	2, 2	191,7; 179,3
		3, 3	105,2; 59,1
13	(H ₁₃) 1,76	2, 3	198,0; 179,3
		3, 3	103,9; 59,1
15	(H ₁₅) 2,67	2	201,8
		3	105,2
16	(H ₁₆) 2,10	2	163,8
		3, 3	157,5; 109,2
18	(H ₁₈) 2,68	2	200,3
		3	101,5
3-OH	(H _{3OH}) 18,86	2	191,7
		3,3	105,3; 98,3
8-OH	(H _{8OH}) 13,32	2	163,8
		3,3	109,2; 101,5
10-OH	(H _{10OH}) 11,04	2	157,5
		3,3	109,2; 103,9

Los datos de los espectros UV, IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN y HMBC obtenidos se mantienen en coincidencia con los reportados por König¹², Rashid¹³, Takani¹⁴ para el ácido úsnico aislado de otras especies de líquenes.

Elucidación estructural del compuesto 2

Se presenta como cristales aciculares blancos, con punto de fusión 260°C. En CCD, usando como eluyente Tol:AcOEt:AcOH (6:4:1) tiene $R_f = 0,32$, no se observa frente a luz visible; frente a luz 254 nm y 366 nm se presenta de color lila y naranja, respectivamente. Es soluble en acetona y poco soluble en cloroformo.

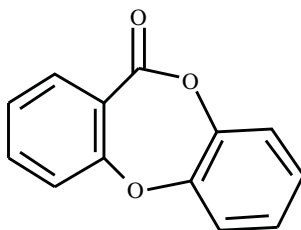
En UV (MeOH 95%), presenta tres absorciones a 205, 236 y 316 nm; estas absorciones son características de depsidonas tipo orcinol reportadas por Hunek¹⁵.

En IR, presenta absorciones: hidroxil tipo lactona en anillo de cinco miembros ($3\ 576\ \text{cm}^{-1}$); hidroxil fenólico y alcohólico ($3\ 311\ \text{cm}^{-1}$); C=O de anillo lactona de 6 miembros ($1\ 771\ \text{cm}^{-1}$); CO de anillo lactona de 5 miembros ($1\ 744\ \text{cm}^{-1}$); CO de aldehído ($1\ 661\ \text{cm}^{-1}$).

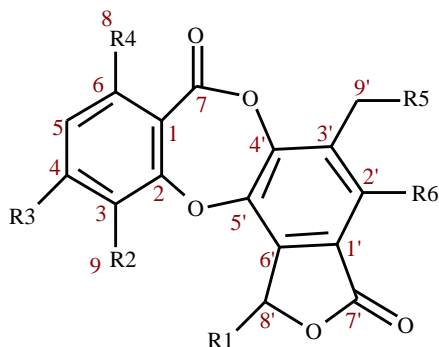
¹H RMN (DMSO-*d*₆, 300MHz), entre 0 y 13 ppm señales a: 2,45 ppm (3H, s), 4,65 ppm (2H, s), a 5,35 ppm (1H, s a), 6,81 ppm (1H, s), 6,88 ppm (1H, s), 8,31 ppm (1H, s, a), 10,46 ppm (2H, s a) y a 12,06 ppm (1H, s a). Se asignan las siguientes señales: 2,45 ppm a CH₃; 4,65 ppm a CH₂ influenciado por heteroátomos, 6,81 y 6,88 ppm C-H no acoplado, 10,46 ppm aldehído; este grupo funcional ya fue detectado en el IR. Las señales restantes se asignan a grupos hidroxilos, detectados en IR.

¹³C RMN (DMSO-*d*₆, 75MHz), presenta 18 señales, 3 debajo de 100 ppm correspondientes a carbonos saturados y 15 sobre 100 ppm de tipo insaturado.

Por literatura se sabe que las depsidonas presentan el siguiente esqueleto básico:



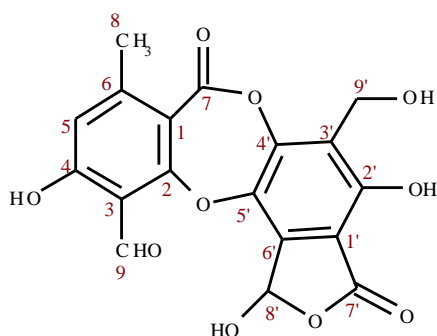
En este esqueleto aparece 12 carbonos bencenoicos y un carbono de tipo éster; estos trece carbonos aparecerán entre 110 y 170 ppm. Se sabe de la presencia de una lactona en anillo de cinco miembros¹⁵ que aportara 2 carbonos adicionales, uno de tipo cetona y el otro de tipo secundario, totalizando hasta el momento 15 carbonos.



Por el espectro ^1H -RMN sabemos que los tres carbonos faltantes corresponderían a carbonos de tipo CH_3 (21,9 ppm), CH_2 (53,2 ppm) y CHO (193,2 ppm).

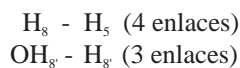
La señal a 95,3 ppm correspondería a C_8 ; justifica su desplazamiento por enlace directo a un oxígeno si R_1 es un OH. La señal a 53,2 ppm correspondería a C_9 ; su desplazamiento se justifica si R_5 es un OH. Hasta el momento quedan por sustituir 4 posiciones en los anillos aromáticos disponiendo hasta de dos OH, un CHO y un CH_3 . Quedando un H aromático residual unido a C_5 .

En base a la información espectroscópica mostrada y a las propiedades físicas y químicas evaluadas, se propone que el compuesto 2 sea el ácido salazínico de fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_{10}$.



Para reconocer las conectividades entre grupos funcionales que confirman esta propuesta, se realizó experimentos COSY, HSQC y HMBC.

El COSY ^1H - ^1H permite reconocer conectividades a larga distancia:



En el espectro HSQC, se correlaciona ^1H - ^{13}C a un enlace. Ello permitió reconocer 5 carbonos ligados a hidrógenos, a 21,9 ppm C_8 , a 53,1 ppm C_9 , a 95,3 ppm C_8 , a 117,9 ppm C_5 bencenoico, finalmente el carbono aldehído C_9HO a 193,2 ppm.

El espectro HMBC (figura 5) permitió reconocer correlaciones ^1H - ^{13}C , preferentemente a 2 y 3 enlaces. Las correlaciones encontradas se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de HMBC del compuesto 2

^1H	^{13}C	Número de enlaces
8	1, 5, 6	3, 3, 2
9'	2', 3', 4'	3, 2, 3
5	1, 4, 8	3, 2, 3

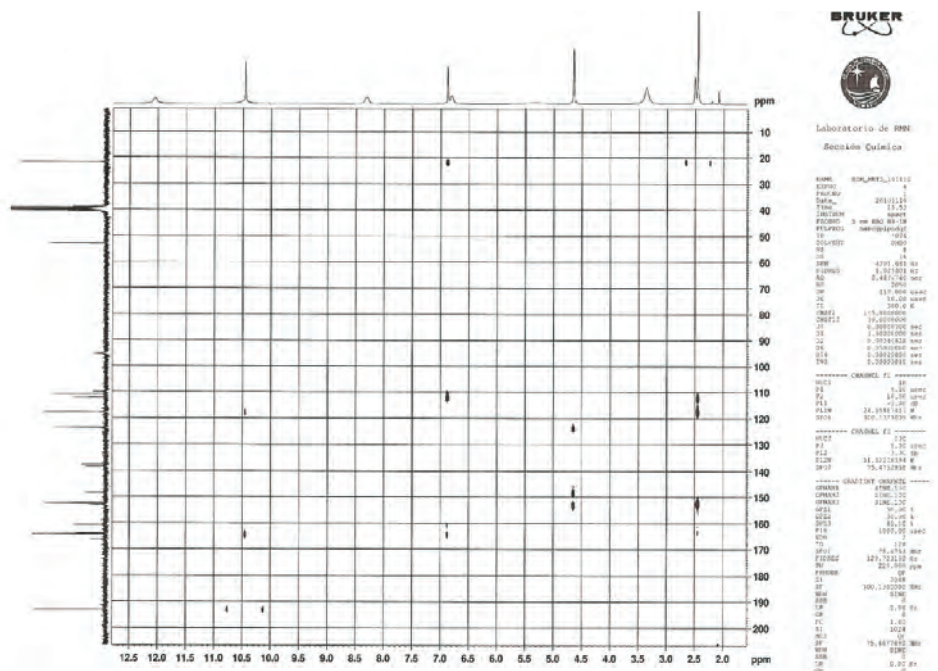
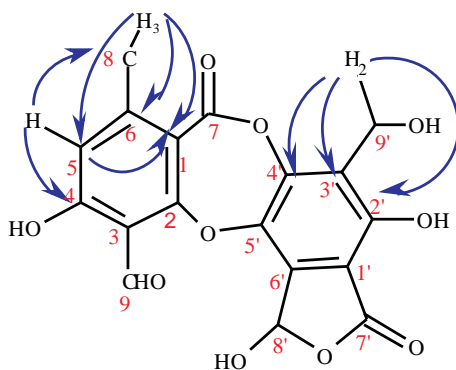


Figura 5. Espectro HMBC del compuesto 2 aislado de *Usnea durietzi*

En base a los resultados obtenidos, se propone las siguientes asignaciones de desplazamientos químicos de carbonos e hidrógenos del ácido salazínico, tabla 6:

Tabla 6. Desplazamientos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del ácido salazínico

N° de Posición	δ ^{13}C ppm	δ ^1H ppm
1	112,4	---
2	164,0	---
3	111,1	---
4	164,5	12,06
5	117,9	6,88
6	152,7	---
7	160,8	---
8	21,9	2,45
9	193,2	10,46
1'	110,1	---
2'	153,3	10,46
3'	123,9	---
4'	148,6	---
5'	138,6	---
6'	137,8	---
7'	166,4	---
8'	95,3	6,81 / 8,31
9'	53,1	4,65 / 5,34
DMSO- d_6	39,7	2,49

Los datos de los espectros del ácido salazínico aislado, así como el punto de fusión se mantienen en rangos de coincidencia con los reportados por Huneck¹⁵, O'Donovan¹⁶ y Eifler-Lima¹⁷ para ácido salazínico aislado de otras especies de líquenes.

CONCLUSIONES

- El líquen *Usnea durietzii*, contiene: quinonas, triterpenoides y esteroides y en menor cantidad fenoles, taninos, grasas y aceites, lactosas y cumarinas, azúcares reductores y flavonoides reconocidos en la marcha fitoquímica. Mediante GC se identificaron en *Usnea durietzii* los siguientes ácidos grasos saturados: palmítico y esteárico e insaturados: linoleico, cis-oleico y palmitoleato, así como la presencia de esteroides brassicasterol, campesterol, estigmasterol y β -sitosterol.
- Se aisló el ácido úsnico en forma de cristales aciculares amarillos-azufre, con punto de fusión de 201 °C, rotación óptica $[\alpha]_D^{26} +500^\circ$. El análisis espectroscópico UV, IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, DEPT, COSY, HSQC, HMBC y MS permitió reconocerlo como ácido úsnico, de fórmula molecular ($\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$) y peso molecular de 344 g/mol.
- Se obtuvo cristales aciculares blancos, con punto de fusión de 260 °C. Sus espectros UV, IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC y HMBC permitió reconocerlo como el ácido salazínico con fórmula molecular de $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_{10}$.

BIBLIOGRAFÍA

1. Culberson C. Supplement to "Chemical and botanical guide to lichen products. *The Bryologist* 1970; 73(2), 356-364.
2. Ingólfssdóttir K. Usnic acid. *Phytochemistry* 2002; 61 (7), 729–736.
3. Cocchiello M, Skert N, Luigi P, Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* 2002; 89, 137-146.
4. Cedano M, Villaseñor L. Colorantes orgánicos de hongos y líquenes. *Scientia-CUCBA* 2006; 8(2):141-161.
5. Farmacopéia Brasileira. 4ta. ed. Atheneu Editora Sao Paulo Ltda. Sao Paulo – Brasil. 1988.
6. Ciulei I. Methodology for Analysis of Vegetal Drugs. Ministry of Chemical Industry, Bucharest, Romania. 1982.
7. Dembitsky V, Rezanka T, Bychek I, Shustov M. Fatty acid composition of *Parmelia lichens*. *Phytochemistry* 1992; 31 (3), 841-843.
8. Massons L, Schmidt H. Los lípidos en los alimentos. En Schmidt, H. (editor). Avances en Ciencia y Tecnología de los alimentos. 2001. Biblioteca digital de la Universidad de Chile. [Acceso: 10 enero 2010]
Disponibile en: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmacuticas/schmidt
9. Kovacs M, Anderson W, Ackman R. A Simple method for the determination of cholesterol and some plant sterols in fishery-based food products. *Journal of Food Science* 1979; 44(5), 1299-1301.
10. Comunicación electrónica con el Dr. J.A. Elix, Departamento de Química, Universidad Nacional de Australia, Canberra, Australia. Fecha: 2 de marzo de 2008.
11. Ruíz A. Flora Popular Mendocina. *Deserta* 1972; 3, 36-38.
12. König G, Wright A. ¹H and ¹³C-NMR and biological activity investigations of four lichens-derived compounds. *Phytochem Anal* 1999; 10, 279-284.
13. Rashid M, Majid M, Quader M. Complete NMR assignment of (+)-usnic acid. *Fitoterapia* 1999; 79, 113-115.
14. Takani M, Yajima T, Masuda H, Yamauchi O. Spectroscopic and structural characterization of copper (II) and palladium (II) complexes of a lichen substance usnic acid and its derivatives. Possible forms of environmental metals retained in lichens. *Journal of Inorganic Biochemistry* 2002; 91, 139-150.
15. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Alemania. 1996.
16. O'Donovan D, Roberts G, Keogh M. Structure of the â-orscinol depsidones, connorstictic and consalazinic acids. *Phytochemistry* 1980; 49, 2497-2499.
17. Eifler-Lima V, Sperry A, Sinbandhit S, Boustie J, Tomasi S, Schenkel S. NMR spectral data of salazinic acid isolated from some species of Parmotrema. *Magn Reson Chem* 2000; 38, 472-474.