

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE GEOQUÍMICA



DETERMINACION DE LA ABSORBANCIA DE COMPUESTOS SUSCEPTIBLES  
A LA RADIACIÓN UV EN MUESTRAS DE LÍQUENES Y BRIÓFITOS DEL  
PÁRAMO MUCUBAJÍ – MÉRIDA

Trabajo Especial de Grado presentado ante  
la ilustre Universidad Central de Venezuela  
por la **Br. Madelein Escarlet Díaz Sánchez**  
como requisito para aprobar la asignatura  
Proyecto Geoquímico II y optar al Título de  
Licenciada en Geoquímica.

Caracas, Junio, 2012.

## ACTA

Aprobado en nombre de la Universidad Central de Venezuela por los Miembros del Jurado Examinador.

---

Prof. Raiza Fernández

Tutora

---

Prof. Yelitza León

Tutora

---

Prof. Andrés Escalona

Jurado

---

Prof. Federico Galarraga

Jurado

## **DEDICATORIA**

A todos los que contribuyeron con esta idea e hicieron posible este proyecto... A mis padres, por formar la persona que soy hoy... A los Profesores Raiza, Fernández, Federico Galarraga y Vicente Marcano, por orientarme, apoyarme y ayudarme a construir este TEG....

Para hacer ciencia es necesario contar con buenas ideas y perseverancia...

**Madelein Escarlet Diaz Sánchez**

## AGRADECIMIENTOS

Primero a Dios, por guiarme en el camino de la vida y poner en cada obstáculo una salida y un alma caritativa que me tendiera la mano. Por permitirme alcanzar esta meta, convertir en un Trabajo Especial de Grado un proyecto que nació de algunas ideas, investigación y mucha perseverancia.

A mis padres, Yoconda y Carlos, por apoyarme desde el principio y en cada una de las etapas de este camino, orientarme, tenerme un universo de paciencia y ayudarme en el camino a ser cada día una mejor persona, por decir en el momento correcto “tranquila que si se puede, sabes que cuentas conmigo para todo”.

A mi familia, por ayudarme cuando fue necesario, a mi tía Dayana por sugerirme elegir esta licenciatura, (creo que fue una excelente sugerencia tía), por estar allí desde el principio e impulsarme a seguir adelante cada vez que algo no salía como esperaba...gracias por estar allí.

A la facultad de la excelencia, Facultad de Ciencias de la ilustre Universidad Central de Venezuela, al CDCH por el financiamiento a través de del PG N° 03-7741-2009/1, a la Coordinación de investigación por la ayuda económica, al Instituto de Ciencias de la Tierra, a aquellos profesores que durante la formación académica me enseñaron que un verdadero docente, instruye en el área de la ciencia, de la vida y de la ética, sabe orientar, escuchar, ser amigo y entiende que tú también eres humano.

A la profesora Raiza Fernández, por confiar en mí, darme ánimos y darme la libertad de crear y empalmar ideas, guiarme pasito a pasito en el aprendizaje de cómo deben hacerse las cosas, por su infinita paciencia y cariño, por ser mi tutora, amiga y otra mamá durante todo este proceso. Al profesor Federico Galarraga, por darme ánimos y buenas ideas, por ayudarme a ponerle “coco” a lo que estaba haciendo, por estar pendiente siempre de cómo iba el proyecto, Al profesor Vicente Marcano por hacer lo posible y lo casi imposible para que todo se lograra, apoyarme al máximo y ser un segundo papá mientras estuve en Mérida, gracias infinitas.

A Claudia y Patty, por apoyarme y adoptarme durante parte de mi estadía en Mérida, muchísimas gracias por todo chicas.

A mis amigos, compañeros de clase y de trabajo, por vivir junto a mi cada momento bueno y malo, compartir risas, alegrías, ratos no tan buenos y muchos buenos recuerdos... se les quiere!!

A todos, muchas gracias...

## RESUMEN

El presente trabajo fue llevado a cabo en las orillas de la Laguna de Mucubají, Mérida, con el propósito de determinar la absorbancia de compuestos susceptibles a la radiación UV presentes en los extractos de muestras de líquenes y briófitos, crecidos bajo la incidencia directa o la penetración parcial de radiación solar.

Para esto fue planteada la implementación de una serie de extracciones, que nos permitieran desprender de los tejidos celulares estos compuestos presentes en las especies *H. integrifolium* (musgo), *F. brasiliensis* (hepática) y *U. laevis*, con la finalidad de evaluar su absorbancia en el rango de longitudes de onda correspondiente al UV, analizando la posible relación de esta absorbancia con la incidencia directa o parcial de la radiación solar y estableciendo comparaciones entre la tendencia de las señales apreciadas para los compuestos extraídos de cada una de las especies, además de realizar la separación mediante CCF de algunos de los compuestos presentes.

Los resultados indican que las especies presentan cierta absorbancia en el rango de longitudes de onda UVB (280-320nm.) y el máximo de absorbancia se encuentra en las longitudes de onda correspondientes al rango UVC (200-280nm.). Además de esto apreciamos que la tendencia de absorbancia de los compuestos extraídos varía y que en algunos casos no sigue la misma tendencia que la absorbancia detectada para los extractos totales. Los compuestos detectados y separados de las especies de briófitos absorben muy poco las longitudes de onda correspondientes a la radiación solar, por lo que presentarían una muy poca actividad fotoprotectora en la planta, mientras que el ácido úsnico presente en el líquen *Usnea laevis* presenta una mayor intensidad y rango de absorbancia en el intervalo UV que los compuestos separados para las especies *H. integrifolium* y *F. brasiliensis*.

## **INDICE GENERAL**

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS	16
General	16
Específicos	16
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
Marco teórico	17
Antecedentes	23
Zona de estudio	27
Áreas de muestreo	28
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	30
Identificación de las especies	30
Recolección y preparación de las muestras	31
Procesos de extracción de los compuestos	34
Análisis de espectrofotometría UV	38
Determinación del índice de esclerofilia para las especies de briófitos seleccionadas	38
RESULTADOS	39

<b>1. Determinación de la absorbancia de los compuestos presentes en extractos provenientes de la <u>pared celular</u> de briofitos recolectados en áreas soleadas y de sombra.</b>	39
1.1 Determinación de la absorbancia de los compuestos presentes en extractos provenientes de la <u>pared celular</u> de <i>H. integrifolium</i> que crecen bajo la incidencia directa o parcial de la radiación solar	40
1.2 Determinación de la absorbancia de los compuestos presentes en extractos provenientes de la <u>pared celular</u> de <i>F. brasiliensis</i> . que crecen bajo la incidencia directa o parcial de la radiación solar	41
<b>2. Separación de los compuestos extraídos de la <u>pared celular</u> de las especies <i>F. brasiliensis</i> y <i>H. integrifolium</i>, y separación del ácido úsnico extraído de la especie <i>U. laevis</i>, mediante cromatografía de capa fina (CCF) empleando una mezcla de solventes formada por tolueno, dioxano y ácido acético, en las siguientes proporciones, 90: 22,5: 2,5</b>	42
2.1 Análisis de la separación de compuestos extraídos de la pared celular de la especie <i>H. integrifolium</i> mediante cromatografía de capa fina (CCF) Comparación entre la tendencia de absorbancia del extracto E1 y el compuesto S.	44
2.2 Comparación de los resultados obtenidos en la separación de los compuestos diferenciados de las muestras E1, con los resultados de una muestra control de ácido úsnico	48
2.3 Análisis de la separación de compuestos extraídos de la pared celular de la especie <i>F. brasiliensis</i> mediante CCF. Comparación entre los valores y tendencia de la absorbancia en el extracto E1 antes y después de efectuar la separación	49

<b>3. Determinación de la absorbancia de los extractos provenientes de las vacuolas celulares de <i>H. integrifolium</i> y <i>F. brasiliensis</i>.</b>	53
3.1 Determinación de la absorbancia de los extractos provenientes de las vacuolas celulares de <i>H. integrifolium</i> recolectados en áreas que presentan incidencia directa o parcial de la radiación solar.	53
3.2 Comparación de los resultados obtenidos para las dos extracciones realizadas a <i>H. integrifolium</i> .	54
3.3 Determinación de la absorbancia de los extractos provenientes de las vacuolas celulares de <i>F. brasiliensis</i> recolectadas en áreas que presentan incidencia directa o parcial de la radiación solar. Comparación de los resultados de absorbancia obtenidos al analizar el producto de las extracciones realizadas a <i>F. brasiliensis</i> .	56
<b>4. Comparación entre los resultados obtenidos en la determinación de absorbancia en realizada al producto de la extracción 2 correspondiente a las vacuolas celulares de <i>F. brasiliensis</i> y <i>H. integrifolium</i>.</b>	57
<b>5. Determinación de la absorbancia de los extractos provenientes de la especie de liquen <i>U. laevis</i> recolectada en áreas que presentan incidencia directa o parcial de la radiación solar.</b>	59
5.1 Análisis de las señales obtenidas luego de efectuar la separación de compuestos extraídos de la especie <i>U. laevis</i> mediante CCF	62
5.2 Correlación entre la masa y absorbancia en al producto de la extracción realizada a la especie <i>U. laevis</i> .	62
5.3 Comparación entre la absorbancia de la totalidad de los compuestos extraídos de las vacuolas celulares de <i>F. brasiliensis</i> , <i>H. integrifolium</i> y de los tejidos de <i>U. laevis</i>	63



<b>6. Comparación de los resultados de absorbancia obtenidos en las extracciones realizadas para <i>H. integrifolium</i> y <i>F. brasiliensis</i> con resultados de absorbancia de compuestos extraídos de especies de líquenes diferentes a <i>U. laevis</i>.</b>	65
<b>7. Comparación de los resultados de absorbancia obtenidos en las extracciones realizadas para <i>H. integrifolium</i> y <i>F. brasiliensis</i> con resultados de absorbancia de compuestos extraídos de la especie <i>Jungermannia excertifolia</i>. recolectada y estudiada en La Rioja, España.</b>	68
<b>8. Análisis y comparación entre los valores de esclerofilia detectados para <i>H. integrifolium</i> y <i>F. brasiliensis</i>.</b>	70
CONCLUSIONES	72
RECOMENDACIONES	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

## INDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1: Estructuras de los ácidos cinámicos más sencillos	21
Figura 2: Estructura de un flavonoide	21
Figura 3: Estructura ácido úsnico.	22
Figura 4.1: Laguna de Mucubají. Tomado y modificado de Google maps. (consulta 20 de junio 2012).	27
Figura 4.2. Áreas de estudio. (a) área soleada. (b) área de sombra.	28
Figura 5: Muestras recolectadas.	29
Figura 6. Réplicas preparadas.	30
Figura 7. Recolección de muestras	31
Figura 8.1. Briófitos: <i>F. brasiliensis</i> (a), <i>H. integrifolium</i> (b).	32
Figura 8.2: Preparación de muestras de briófitos.	33
Figura 9.1 <i>U. laevis</i> (liquen).	33
Figura 9.2 Trituración, muestras de líquenes	34
Figura 9.3 Separación cromatográfica de las réplicas.	35
Figura 10. Compuestos extraídos en metanol para <i>H. integrifolium</i> (musgo), área de sol y área de sombra.	40
Figura 11. Compuestos extraídos en metanol para <i>F. brasiliensis</i> (hepática)	42

Figura 12. Separación de las muestras mediante CCF. (1) Muestra control de ácido úsnico, (2) Muestra E1 de *H. integrifolium* (3) Muestra E1 de *F. brasiliensis*, (4) Muestra L1 de *U. laevis*. 42

Figura 13 Valores de absorbancia obtenidas para (a) réplicas de *H. integrifolium* (musgo) luego de separar mediante cromatografía de capa fina el E1. (b) Compuestos extraídos en metanol para *H. integrifolium* (**musgo**), área de sol y área de sombra. 45

Figura 14: Absorbancia en función de la masa, para el máximo de absorbancia detectado en el análisis del compuesto separado mediante la separación por CCF de la fracción E1 (extracción a la pared celular) en muestras de *H. Integrifolium* recolectadas en (a) Área soleada. (b)Área de sombra. 47

Figura 15. Esquema de la separación observada bajo la lámpara UV, luego de aplicar cromatografía de capa fina. (a)*F. brasiliensis* (b)*H. integrifolium*. (c)*U. laevis*. 48

Figura 16.1 (a) Esquema de separación de la placa cromatográfica para las muestras de *F. brasiliensis* (b) Absorbancia las detectada para el compuesto A separado del extracto E1 mediante CCF de las réplicas de *F. brasiliensis* correspondientes a las diferentes áreas de estudio. 50

Figura 16.2 (a) Compuestos extraídos en metanol para *F. brasiliensis* (b) Absorbancia las detectada para el compuesto A separado del extracto E1 mediante CCF de las réplicas de *F. brasiliensis* correspondientes a las diferentes áreas de estudio. 52

Figura 17 (a) Absorbancia de los compuestos extraídos de las paredes celulares de las muestras de *H. integrifolium*. (b) Absorbancia de los compuestos extraídos de las vacuolas celulares en las muestras de *H.* 54

*integrifolium*.

Figura 18.1 Absorbancia de los compuestos extraídos de (a) las vacuolas celulares (b) paredes celulares; en las muestras de *F. brasiliensis*.(c) compuesto A . 56

Figura 18.2 Determinación de absorbancia de los compuestos extraídos de las vacuolas celulares de los briófitos seleccionados en las diferentes áreas de estudio (a) *F. brasiliensis* (b) *H. integrifolium*. 58

Figura 19. 1 Absorbancia de (a) Compuestos extraídos de las muestras de *U. laevis* (b) ácido úsnico separado mediante cromatografía de capa fina para las muestras de *U. laevis*. 61

Figura 19.2. Correlación absorbancia vs peso de muestra en el máximo de absorbancia (215 nm) (a) área de sombra. (b) área soleada. 63

Figura 20. Comparación entre la absorbancia de la totalidad de los compuestos extraídos de (a) las vacuolas celulares de *F. brasiliensis*. (b) *H. integrifolium* y de los tejidos de (c) *U. laevis* 64

Figura 21.1 Espectro de absorción del extracto total en el rango UVC y UVB de líquenes potencialmente vulnerables de las zonas glaciales y nevadas del Parque Nacional Sierra Nevada de Mérida. (a)Lecanora sp. (b)Physia sp. (c)Protoblastemia sp. (d)Verrucaria sp. (Tomado de Marcano et al.,2010) 65

Figura 21.2 Comparación de los resultados de absorbancia obtenidos para *H. integrifolium* y *F. brasiliensis*. (a)E1 de *H. integrifolium* (b) E1S de *H. integrifolium* (c) E2 de *H. integrifolium* (d) E1 de *F. brasiliensis*. (e) E1S de *F. brasiliensis*. (f) E2 de *F. brasiliensis*. 67

Figura 22. Cromatogramas representativos (unidades de miliabsorbancia vs tiempo de retención) de los compuestos (A) 69

extraídos en metanol, (B) extraídos mediante digestión alcalina a la especie *Jungermannia excertifolia* subsp. *Cordifolia*. Compuestos separados 1, ácido *p*-coumaroylmalico; 2, ácido fasélico; 3, ácido feruloylmalico; 4, ácido 5''-(7'',8''-dihydroxycoumaroyl)-2-caffeoylmalico; 5, ácido 5''-(7'',8''-dihydroxy-7-O- $\beta$ -glucosyl-coumaroyl)-2-caffeoylmalico; 6, ácido *p*-coumárico; and 7, ácido ferúlico. Espectro de absorción representativa (Tomado de Fabón et al., 2010).

## INDICE DE TABLAS

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
Tabla 1. Valores Rf de los compuestos separados mediante CCF.	34
Tabla 2. Índices de esclerofilia.	58

## INTRODUCCIÓN

La geoquímica como una ciencia moderna, se caracteriza por ser interdisciplinaria, así encontramos que para resolver problemas en sistemas naturales e interpretar los procesos que ocurren en ellos, estaremos integrando conocimientos que nos permiten abordar y analizar la información referente a estos sistemas desde múltiples puntos de vista. Desarrollar modelos que expliquen cómo evolucionan sistemas naturales en función del tiempo, considerando el mayor número de variables nos permitirá comprender mejor como podemos contribuir a solucionar sus problemas y a conservar el equilibrio de nuestro medio ambiente.

Para estudiar procesos que ocurren en el ambiente natural de una forma holística, por ejemplo las transformaciones de ciertos compuestos químicos por efecto de la radiación, debemos hacer uso de los conceptos y conocimientos provenientes de distintas disciplinas tales como la biología, la ecología, la química.

Uno de los fenómenos actuales de gran importancia a nivel científico, lo constituye el cambio climático y los procesos que engloba, debido a la producción de efectos evaluables desde el punto de vista químico y geoquímico, como por ejemplo el cambio en las concentraciones de ozono presente en la atmósfera y los niveles de radiación UV que llegan a la superficie terrestre. Numerosos estudios como los que se referirán posteriormente en los antecedentes son efectuados tomando en cuenta la necesidad de evaluar, conocer, predecir y estimar la magnitud de las variaciones que han tenido lugar y que siguen ocurriendo en las condiciones climáticas, además de considerar los efectos ambientales que dichas variaciones generan.

Entre los procesos que incluye el cambio climático encontramos la degradación de la capa de ozono, que constituye la protección natural proporcionada por la atmósfera de nuestro planeta contra las emisiones de radiación por parte del Sol. Si consideramos el desgaste en función del tiempo que ha sufrido la capa de

ozono, el consecuente incremento en la radiación captada por especies vivas como líquenes y briófitos, podemos detectar la influencia de estos niveles de radiación en ciertas características químicas, fisiológicas e incluso en las características del ADN propio de los organismos antes mencionados. Sin embargo, tomando en cuenta que la incidencia de la radiación varía en función de la latitud a la que nos encontramos, se hace necesario estudiar por separado los diferentes sistemas naturales, en este caso centraremos nuestra atención en el ecosistema de páramo, diferenciando áreas donde la incidencia de la radiación solar es directa de otras áreas donde la penetración de la misma es parcial, con la finalidad de evidenciar la influencia de los niveles de radiación del sistema sobre la proporción de compuestos susceptibles a UVR acumulados por briófitos y líquenes.

Al preguntarnos cómo afecta la radiación UV a los organismos fotosintéticos como los antes mencionados, surge la necesidad de establecer un parámetro que nos permita evidenciar la magnitud de las variaciones químicas que se identificaran, en este caso se efectuara la determinación de la absorbancia en el producto de la extracción de los compuestos susceptibles a la radiación en el rango UV obtenidos al atacar químicamente las paredes celulares y las vacuolas presentes en las células, en el caso de los briófitos y a nivel extracelular en el caso de los líquenes, siendo las regiones antes referidas el lugar donde los organismos seleccionados acumulan los compuestos de interés. Este análisis nos permitirá además establecer comparaciones entre la capacidad de absorber la radiación UV por parte de los organismos en cuestión.

De este modo, compuestos como ácidos hidroxicinámicos, cinámicos y úsnico, entre otros son capaces de participar en reacciones fotoquímicas para consumir la energía aportada por la UVR y proteger al organismo de sus efectos. Comportamiento que aprovecharemos como una herramienta que nos permitirá evidenciar la presencia de cierta influencia por parte de la radiación UV e



identificar variaciones del nivel de incidencia de la misma en estos organismos fotosintéticos.

Con la finalidad de definir la presente propuesta de investigación se plantean los siguientes objetivos:

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la absorbancia de compuestos susceptibles a la radiación UV presentes en los extractos de muestras de líquenes y briófitos, crecidos bajo la incidencia directa o la penetración parcial de radiación solar en el páramo Mucubají - Mérida.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar la absorbancia de los extractos provenientes de las vacuolas y la pared celular de briófitos que crecen bajo la incidencia directa o parcial de la radiación solar.
2. Comparar la absorbancia de los extractos obtenidos de briófitos que crecen en áreas con una penetración parcial de la radiación solar respecto a la absorbancia de sus homólogos crecidos bajo la incidencia directa de la radiación solar.
3. Comparar la absorbancia de los extractos obtenidos en líquenes que crecen en áreas con incidencia directa de la radiación solar respecto a la absorbancia de los extractos obtenidos en muestras de briófitos crecidos en las mismas condiciones.

4. Determinar el índice de esclerofilia, indicador del contenido químico de las hojas de las plantas, en las especies de briófitos seleccionadas.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Marco teórico

#### 1. Cambio climático

El clima en un lugar determinado lo conforma el conjunto de fenómenos meteorológicos que caracterizan durante un largo periodo el estado medio de la atmósfera y su evolución. A escala de tiempo de la vida humana, el clima en una zona concreta permanece prácticamente constante. Sin embargo, desde la formación del planeta Tierra hace 4600 m.a. el clima ha experimentado de forma natural cambios importantes. La actividad humana está produciendo desde el último siglo un incremento sustancial de la concentración de los gases de efecto invernadero en la atmósfera, provocando un aumento de la temperatura global que está acelerando el proceso de cambio climático. Esta alteración del clima global es la que recibe el nombre de cambio climático (Pernia y Fórnez, 2008)

En el estudio del cambio climático se consideran comúnmente tres procesos: el efecto invernadero, el adelgazamiento de la capa de ozono y el transporte de contaminantes a larga distancia. El adelgazamiento de la capa de ozono es generado como consecuencia de la acción de algunos compuestos capaces de degradar el ozono estratosférico, el cual tiene la función de proteger al planeta de la radiación ultravioleta-C (UV-C: 200-280nm) de un modo total y de la radiación ultravioleta-B (UV-B: 280-315nm) de un modo parcial, es necesario destacar que la primera es letal para los seres vivos. La cantidad de radiación UV-B que llega a

la superficie terrestre depende de factores como: estación del año, hora del día, altitud, entre otras; los organismos más sencillos resultan ser los más susceptibles a la exposición excesiva a la radiación UV-B (Núñez et. al, 2004).

## 2. Líquenes

Un líquen es una asociación simbiótica entre un hongo y un organismo fotosintético como un alga o una cianobacteria. En el caso de los líquenes la simbiosis es de tipo mutualista, ya que ambos organismos se benefician por la asociación, aportándose mutuamente protección y alimento. Ecológicamente son importantes colonizadores de zonas desérticas con rocas expuestas a meteorización, ya que se consideran precursores en la formación del suelo, capaces de adaptarse a cualquier tipo de superficie, sea esta corteza de árboles, suelo, rocas o construcciones (Giacobone, 2009)

La distribución de los líquenes y de los organismos fotosintéticos en general está influenciada por las condiciones del sistema al cual pertenecen. Factores como la temperatura, disponibilidad de agua, composición química de la misma, luz, entre otros resultan determinantes y nos ayudan a inferir la ubicación de las diferentes especies de líquenes (Barreno y Pérez-Ortega, 2003).

Existen diferentes sistemas de clasificación para los líquenes, que toman en cuenta aspectos como sus características morfológicas, sustrato sobre el cual crecen, su anatomía, los organismos que conforman la simbiosis, su composición química, entre otros. En este caso haremos referencia a la clasificación que considera la afinidad de los líquenes por la luz. Dado que es posible identificar diferentes ambientes fóticos considerando la intensidad, cantidad y calidad de luz que reciben las regiones de un mismo hábitat, además de tomar en cuenta que la luz puede provenir de la incidencia directa o de la luz reflejada; encontramos que hay especies que presentan una elevada afinidad por la iluminación y se denominan heliófitos, estas especies se encuentran en las copas de los árboles, márgenes de bosques, rocas expuestas, entre otros lugares con una elevada iluminación, por el contrario los esciófitos se encuentran en zonas donde la penetración de la

iluminación sea escasa, como por ejemplo, matorrales densos, bosques bien conservados, base de los troncos, entre otras zonas (Barreno y Pérez-Ortega, 2003).

### 3. Briófitos

Son plantas estructuralmente simples, que a menudo prevalecen en ambientes de condiciones duras, como suelos secos, montañas de corrientes turbulentas, entre otros, principalmente se diferencian dos grupos de briofitas: musgos y epifitas (Fabón et al., .2010)

El uso de los briófitos acuáticos como bioindicadores se remonta a finales de la década de 1960, aunque es a partir de la década de 1970 cuando se generaliza su uso. Los briófitos acuáticos se han empleado con gran profusión como bioindicadores de metales pesados, pero también han resultado útiles en casos de contaminación orgánica, acidificación, eutrofización, turbidez, salinidad, reactividad y contaminación térmica. Entre otras características que hacen considerarlos como organismos bioindicadores encontramos: simplicidad estructural, carencia de una cutícula desarrollada, de epidermis y de sistemas radical y vascular eficientes, de manera que pueden responder a las variaciones ambientales de manera más fiel que las plantas vasculares; además de un modo de vida perenne, lo que facilita un muestreo continuo durante todo el año y a lo largo de un periodo considerable (Nuñez et al., 2004)

### 4. Bioindicadores

Probablemente, la vida es el mejor monitor de la calidad ambiental de un medio, ya que los organismos integran la influencia de variables bióticas y abióticas en su hábitat, y suministran un registro continuo de la calidad ambiental (Nuñez et al., 2004). Los bioindicadores se definen como organismos que manifiestan síntomas

particulares en respuesta a cambios medioambientales, generalmente de manera cuantitativa (Hawksworth et al., 2005).

#### 5. La esclerofilia y los organismos fotosintéticos

La esclerofilia constituye una serie de aspectos morfológicos de los organismos fotosintéticos, que originan diferentes niveles de espesor de las paredes celulares de varios tejidos, estas variaciones dependen de las especies consideradas y de las condiciones del ambiente en el que se desarrollan, por lo tanto encontraremos que la esclerofilia en plantas superiores será diferente a la que encontraremos en briófitos, por ejemplo. Un modo experimental de efectuar determinaciones relacionadas a la esclerofilia es mediante el índice de esclerofilia, el cual se refiere al peso seco por unidad de superficie, (modificado de García Plé, et al., 1990) en el caso de los briófitos esta determinación se realizará empleando los ápices del organismo.

#### 6. Organismos fotosintéticos y radiación UV

Cuando los organismos fotosintéticos se encuentran expuestos a un exceso de luz y radiación desarrollan mecanismos adaptativos para protegerse, comúnmente estos consisten en una serie de respuestas fisiológicas, bioquímicas, histológicas, entre otras. Diversos estudios han demostrado el rol fotoprotector que cumplen los pigmentos y algunos compuestos secundarios sintetizados por estos organismos fotosintéticos, dadas las características químicas de estos compuestos polifenólicos quienes son capaces de disipar la energía de los fotones incidentes y en algunos casos presentan acción antioxidante ( la capacidad antioxidante depende de la estructura molecular de los mismos). En el caso de los pigmentos comúnmente encontramos a los flavonoides como el que se muestra en la figura 2, que principalmente absorben las longitudes de onda correspondientes al rango UV-A (315 -400 nm). Por otra parte, entre de los compuestos secundarios,

encontramos los ácidos cinámicos y sus derivados que absorben las longitudes de onda entre 280 y 320nm (rango UV-B) (Edreva, 2005).

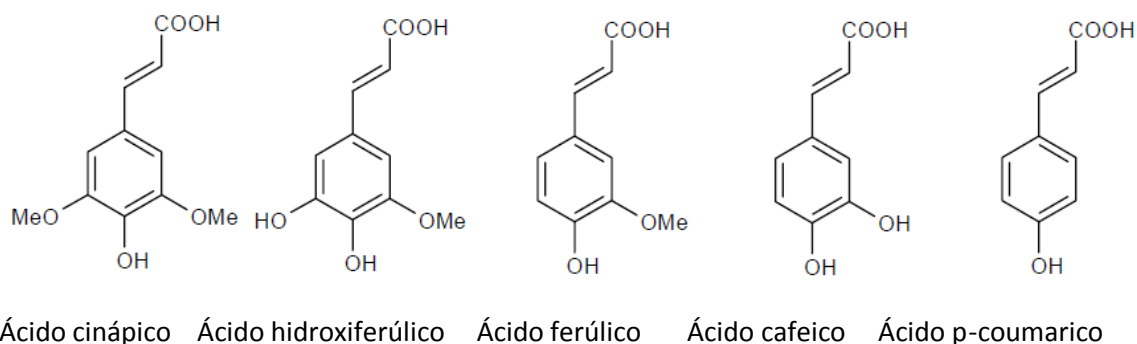


Figura 1. Estructuras de los ácidos cinámicos más sencillos

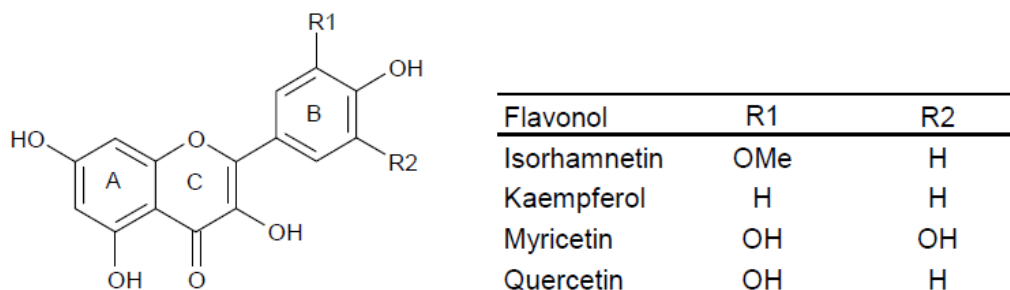


Figura 2. Estructura de un flavonoide.

## 7. Sustancias liquénicas.

Este término es aplicado a un conjunto de compuestos sintetizados exclusivamente por los líquenes y que son de origen extracelular, entre estos contamos principalmente: depsidos, depsidonas, depsonas y ácidos úsnicos (Culberson, 1969; Marcano, 1994).

Las sustancias liquénicas pueden clasificarse según su origen (considerando la bioquímica de estos organismos vivos) en:

- Productos metabólicos primarios.
- Productos metabólicos secundarios de la vía del acetato-polimalonato.
- Productos metabólicos secundarios de la vía del ácido mevalónico.
- Productos metabólicos secundarios de la vía del ácido shiquímico.

Los productos metabólicos correspondientes a la vía del acetato-polimalonato incluyen principalmente derivados fenólicos, entre los que encontramos los ácidos úsnicos. además de otras sustancias (Marcano, 1994).

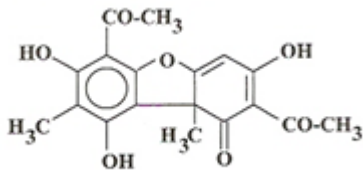


Figura 3. Estructura ácido úsnico.

#### 8. Compuestos absorbentes de la radiación UV en organismos fotosintéticos y la espectrofotometría UV

Dado el incremento de la radiación UV-B, los organismos fotosintéticos han sufrido diversos daños en su aparato fotosintético, ocurriendo la degradación de pigmentos, decrecimiento en la actividad enzimática, además de alteraciones de ADN y oxidación. Las plantas han desarrollado mecanismos protectores contra los efectos de la radiación UV-B, uno de estos es la acumulación de compuestos absorbentes de radiación UV, los cuales son principalmente fenólicos. Para la

detección de estos compuestos se emplea como herramienta principal el análisis de absorbancia en las longitudes de ondas correspondientes a la radiación UV en el producto de extracciones realizadas a dichos organismos fotosintéticos, la determinación de la absorbancia total del conjunto de los compuestos extraídos, evaluada de un modo adecuado, puede ser suficiente para realizar interpretaciones sobre la capacidad de dichos compuestos como protectores contra la radiación UV (Fabón et al., 2010). Es importante resaltar que en la presente revisión hacemos énfasis en la relación identificada entre presencia de estos compuestos acumulados y la incidencia de la radiación UV en los organismos vivos seleccionados.

#### 9. Compuestos UV-sensibles y los procesos enzimáticos en la plantas.

Al igual que en los líquenes que generan sustancias liquénicas mediante diversas vías de síntesis metabólicas, las plantas también cuentan con procesos metabólicos y enzimas que influyen considerablemente en la producción de algunos de los compuestos químicos que resultan sensibles en el rango UV.

Este es el caso de enzima PAL (Phenylalanine Amonium Lyase) y CHS (CHalcone Synthase), entre otras enzimas pertenecientes a la vía sintética fenil propanoica. De modo que PAL se estimula ante la presencia de la radiación UVB, catalizando la transformación de fenilalanina en ácido trans-cinámico, quien genera a su vez, compuestos fenólicos mas complejos como flavonoides, taninos y lignina. (Rozema et al., 2002)

### **Antecedentes**

La influencia de la radiación UV en los sistemas naturales de las diferentes latitudes ha sido estudiada desde hace algunos años conjuntamente con la investigación sobre la potencialidad de organismos vivos como indicadores de los efectos que ocasiona. A nivel internacional, numerosos investigadores han



realizado excursiones para explorar incluso los polos del planeta, donde los efectos del cambio climático son tangibles y donde pocas especies logran sobrevivir a causa de las extremas condiciones climáticas.

Gignac en el año 2001, realizó un análisis sobre las potencialidades de briófitos como indicadores de cambio climático y paleoclimatología, dada su capacidad para sobrevivir en diferentes condiciones climáticas y al éxito en la adaptación de las especies a nuevas condiciones. También comenta sobre algunos modelos que consideran la distribución de especies de briófitos para indicar el cambio climático, considerando variables como las concentraciones de dióxido de carbono, partiendo de las características de las especies en forma individual y de las asociaciones de especies encontradas en las regiones que se estudian. Además plantea que puede resultar de utilidad el estudio de sus características fisiológicas y los cambios que presentan dichas especies para realizar interpretaciones y comparaciones entre estas y las especies que habitaron el planeta cuando la atmósfera presentaba concentraciones de oxígeno menores a las que encontramos en la actualidad. Todo esto considerando que los organismos estudiados presentan una interacción directa con los sistemas de los cuales forman parte.

En el año 2002, Buffoni et al., identificaron cambios en el contenido fenólico y acumulación diferencial de pigmentos de un líquen fruticoso (*Cladonia arbuscula* ssp. *mitis*) como respuesta a la exposición a UVR en condiciones de laboratorio, encontraron que los líquenes expuestos a esta radiación presentaron un incremento en la acumulación de compuestos absorbentes de radiación UV.

Edreva, en el año 2005, establece la importancia de pigmentos no fotosintéticos y derivados de ácidos cinámicos en la fotoprotección, partiendo de las características químicas de compuestos como flavonoides, antocianinas y derivados de ácidos cinámicos (entre otros compuestos). Se establece que estos compuestos presentan respuestas químicas que protegen a los organismos fotosintéticos de los daños causados por la radiación, una vez que los compuestos antes mencionados son sintetizados vía enzimática se distribuyen a través del

organismo dependiendo de su estructura. Cabe mencionar que todos estos compuestos absorben la radiación comprendida en el rango UV y disipan la energía de los fotones incidentes.

En el año 2006, Arróniz-Crespo et al., aprovechan la asociación directa que hay entre el incremento de la radiación UV y el gradiente de altitud a la cual crecen las especies, para emplear como herramienta de estudio el análisis de la absorbancia total en el rango UV y la concentración de algunos ácidos hidroxicinámicos, dado que estos compuestos pueden actuar como protectores contra UVR (Tuba et al., 2010). Posteriormente en el 2008, los mismos autores estudiaron la respuesta fisiológica de la especie *Jungermannia excertifolia* subsp. *cordifolia* a la exposición a UVR en condiciones de laboratorio evaluando la respuesta de 5 derivados de ácidos hidroxicinámicos: ácido p-coumaroylmalico, ácido 500-(700,800-dihidroxycoumaroyl)-2-caffeoylmalico, ácido 500-(700,800-dihidroxi-7-O-b-glucosil-coumaroyl)-2-caffeoylmalico, ácido fasélico y ácido feruloylmalico concluyendo que estos compuestos pueden ser útiles como bioindicadores del incremento en la radiación UV.

En 2009, Núñez-Olivera et al., encontraron durante tres años consecutivos que la concentración del ácido p-coumaroylmalico en la especie *Jungermannia excertifolia* subsp. *cordifolia* fue mas alta entre verano y otoño respecto a las temporadas de verano y primavera, estableciendo una correlación positiva con los niveles de UVR. Es importante destacar que uno de los modelos que emplearon en su estudio consideraba como una de las variables los niveles de ozono, resultando que los niveles de ozono y del ácido p-coumaroylmalico se compensan entre sí.

En el año 2010 Fabón et al., encontraron que los derivados de ácidos hidroxicinámicos se hallan en diferentes partes de las células que constituyen a los organismos, esto fue posible evaluando extracciones efectuadas a las paredes de las células y a las vacuolas que se encuentran a nivel intracelular, además estudiaron la influencia de la radiación ultravioleta B (UVB) en la concentración de

los ácidos hidroxicinámicos, mediante la exposición bajo condiciones de laboratorio a periodos regulares de radiación UVB, encontrando que al incrementar la radiación UV también incrementaba la absorbancia de los compuestos sensibles a la misma.

Por otra parte, luego de hacer referencia a las investigaciones encontradas a nivel mundial, a continuación comentaremos sobre investigaciones realizadas en nuestro país.

En el Páramo Andino venezolano Marcano et al. (1999) identificaron la especie *Usnea laevis* y encontraron en la composición química de dicha especie la presencia de ácido úsnico, para esto extrajeron, separaron, identificaron y cuantificaron el mismo, mediante técnicas analíticas como cromatografía de capa fina (TLC), espectroscopia en el infrarrojo, espectrometría de masas (MS), entre otras, encontrando que el ácido úsnico presenta una proporción del 2,7% de la masa del líquen, con esta investigación se identifica la presencia de un derivado de ácido fenólico carboxílico en esta especie.

Collignon et al. En el año 2010 refieren una investigación realizada en los región andina, en la cual podemos encontrar que además de la especie *Usnea laevis*, también se han realizado estudios con otras especies de líquenes como: *Lecanora sp.*, *Physia sp.*, *Protoblastemia sp.* y *Verrucaria sp.* para las que se detectó la absorbancia de compuestos presentes en sus tejidos en el rango UVB y UVC. A partir de esta investigación interpretaron que los líquenes expuestos a radiación UV en regiones de alta montaña tropical desarrollan estrategias UV-protectoras generadas probablemente durante millones de años de evolución, basadas en la síntesis de metabolitos secundarios fenólicos

En el año 2010 Marcano et al., analizaron los compuestos secundarios en varias especies de líquenes crecidos en zonas glaciares, determinaron su absorbancia en el rango UV-A, UV-B y UV-C, además de analizar y caracterizar los mismos mediante técnicas espectrométricas y cromatográficas. Además realizaron interpretaciones sobre la actividad protectora de estos compuestos en los

microorganismos, considerando esto como un comportamiento que posiblemente fue presentado por los organismos que poblaron la tierra durante aquellos tiempos en que la atmosfera presentaba menores concentraciones de oxígeno.

### Zona de estudio

La región seleccionada para llevar a cabo el muestreo forma parte de la Sierra Nevada de Mérida, específicamente en Mucubají, ubicada a 3500m de altura. Esta región constituye una gran extensión de páramo, caracterizada por una vegetación variada, que depende del microclima (condiciones de humedad, altura, entre otros factores), diversidad topográfica y geomorfológica en la que destacan los rasgos de un modelado glacial intenso. A nivel general podemos decir que la temperatura se ve altamente influida por la altura, de modo que a 3.000m tenemos temperaturas de 10 °C, a 3.500m encontramos 6 °C y a 4.000m tenemos -1 C. El clima se caracteriza por ser de semiárido a semihúmedo, presentando un período de sequía que inicia en diciembre y culmina en abril. (Graf, 1996 ; Azócar y Monasterio, 1979).

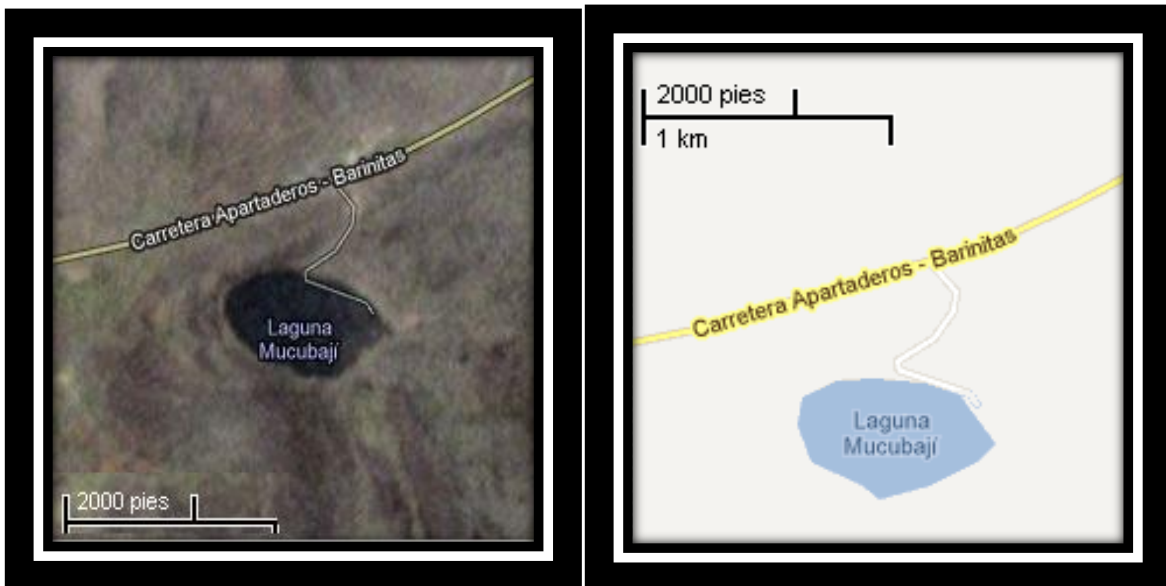


Figura 4.1. Laguna de Mucubají. Tomado y modificado de Google maps. (consultado 20 de junio 2012).

### **Áreas de muestreo.**

Antes de efectuar la recolección de muestras fue necesario definir o caracterizar los estadios dentro de la zona de estudio.

Área de sol o soleada: ubicado a orillas de la laguna, donde la incidencia de la radiación solar es directa y las muestras se encontraban expuestas a la radiación solar durante la mayor parte del día considerando el avance del sol a medida que transcurren las horas.

Área de sombra: En este caso nos referimos al área donde las muestras se encontraban bajo la sombra de pinos ó en zonas muy cercanas (1 o 2m) de estos, creciendo sobre la superficie de una roca, en un ángulo para el que la incidencia solar no era directa.



Figura 4.2. Áreas de estudio. (a) área soleada. (b) área de sombra.

## Metodología experimental.



Figura 5: Muestras recolectadas.

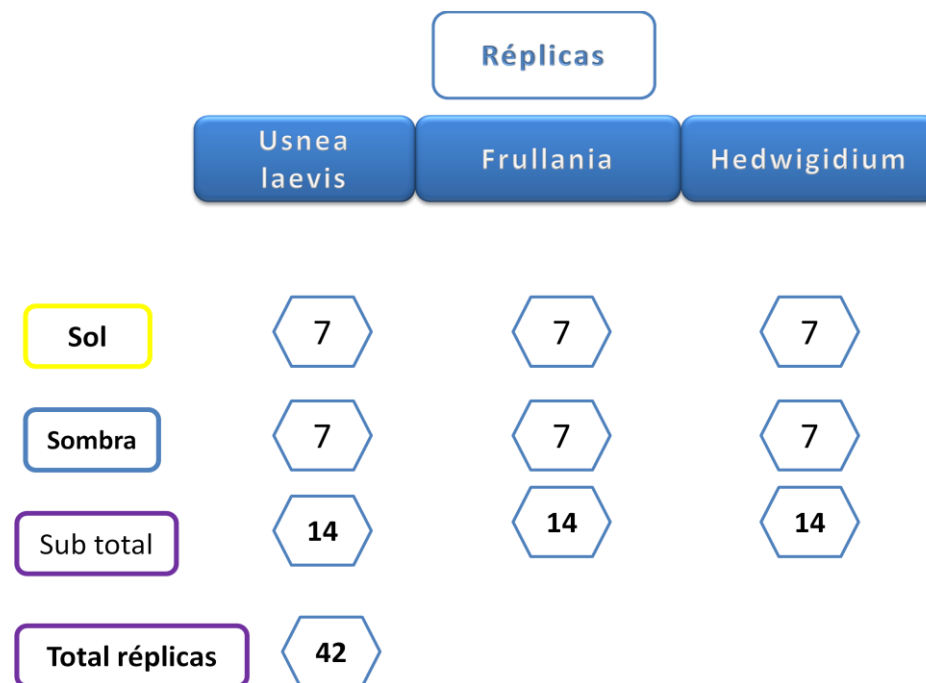


Figura 6. Réplicas preparadas.

### **Identificación de las especies.**

Para la realización del presente trabajo de investigación fueron seleccionadas 1 especie de liquen: *Usnea laevis* (*U.laevis*) y 2 especies de briófitos: un musgo y una hepática presentes en la zona de estudio, en el caso del liquen, la especie se encontraba previamente reportada en la zona y se encuentra ampliamente estudiada como se refiere en la revisión bibliográfica, pero en el caso de los briófitos fue necesario un análisis de las características de las especies recolectadas para su identificación taxonómica, este procedimiento fue realizado por la especialista en el área: Profa. Yelitza León, quien identificó las especies como: *Hedwigidium integrifolium* (*P. Beauv*) *Dixon* (musgo seleccionado, *H. integrifolium*) y *Frullania brasiliensis* *Raddi* (hepática seleccionada, *F. brasiliensis*).

### **Recolección y preparación de las muestras**

Luego de identificar los puntos de muestreo procedimos a recolectar las muestras de cada especie, para esto empleamos una espátula pequeña en el caso del musgo y para las otras especies la recolección fue con las manos. Las muestras recolectadas fueron almacenadas en bolsas de papel debidamente rotuladas.





Figura 7. Recolección de muestras

Una vez recolectadas las muestras fueron trasladadas en sus respectivas bolsas al laboratorio para iniciar su procesamiento.

### 1. Briófitos

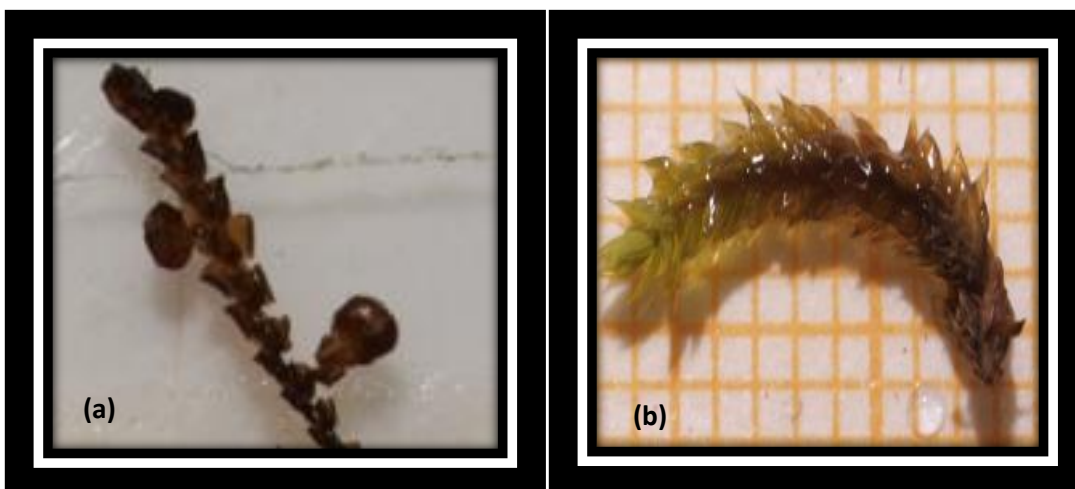


Figura 8.1. Briófitos: *F. brasiliensis* (a), *H. integrifolium* (b).

(a)Hepática: *F. brasiliensis*.

Para esta especie fue necesario separar cada una de las ramas de la planta, que se encontraban enredadas entre sí y con una especie de liquen no identificado, además de retirar los restos de tierra presentes entre las ramas. Para continuar fue necesario cortar los primeros 3 cm de la planta, correspondientes a los ápices de la misma, antes de ser llevados a la estufa junto a las muestras de *H. integrifolium*.

(b)Musgo: *H. integrifolium*

Inicialmente fue necesario limpiar los tallos del espécimen, ya que contenían restos de tierra. Empleando una hojilla de acero inoxidable, fueron cortadas las puntas impregnadas de tierra y la sección correspondiente a las raíces, dejando el resto de la planta lista para llevar a la estufa, donde fueron secadas las muestras.

Luego de secar las muestras a una temperatura de 30 °C hasta alcanzar peso constante (durante 67 horas), cada muestra fue colocada en un mortero al cual se le adicionó una pequeña proporción de nitrógeno líquido, seguidamente se procedió a triturar la muestra hasta conseguir un polvo fino, que fue transferido a tubos Eppendorf nuevos, esterilizados y previamente pesados, preparando así réplicas de 10, 20, 30, 40 y 50 mg. Para cada especie se prepararon 3 réplicas de 50 mg y 1 de cada una de las otras masas antes mencionadas para cada área de estudio.

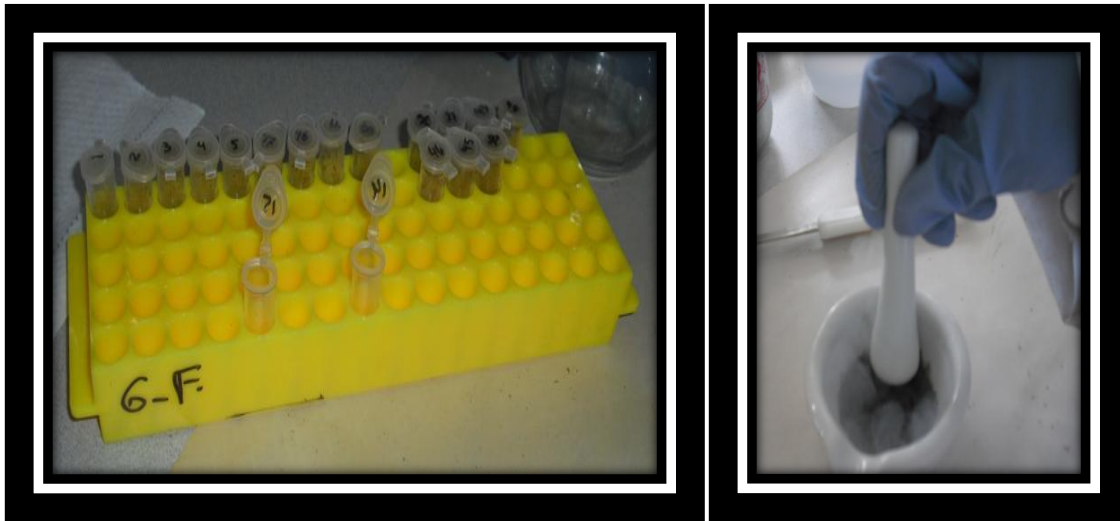


Figura 8.2: Preparación de muestras de briófitos.

## 2. Líquenes.



Figura 9.1 *U. laevis* (liquen).

En el caso de las muestras *U. laevis*, fueron llevadas a la estufa en las bolsas donde fueron recolectadas, durante 28 horas a 37°C, luego las transportamos en un desecador al laboratorio donde fueron cortadas en trozos empleando una hojilla

de acero inoxidable y seguidamente se procedió a triturar las mismas empleando un mortero y mazo de porcelana. Fueron preparadas de igual forma, réplicas de 10, 20, 30, 40 y 50 mg (se prepararon 3 muestras de 50 mg y 1 de cada una de las otras masas previamente mencionadas para cada estadio), fueron llevadas al desecador durante 24h antes de efectuar el proceso de extracción con la finalidad de garantizar la ausencia de humedad y su peso constante.

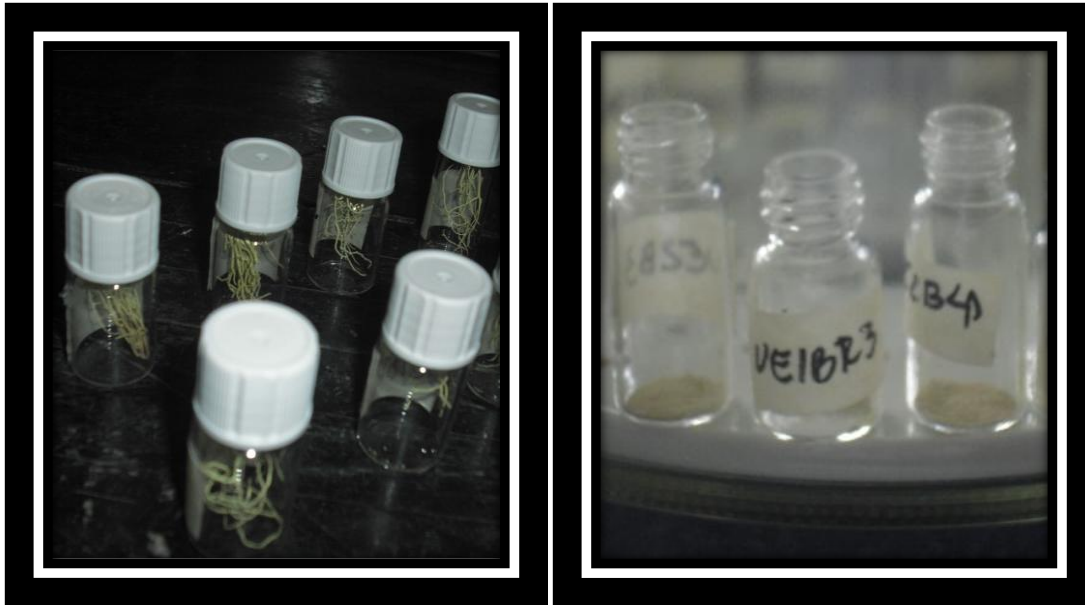


Figura 9.2 Trituración, muestras de líquenes.

## Procesos de extracción de los compuestos.

### 1. Briófitos.

#### I. Extracción 1: pared celular.

Para esta primera extracción a cada réplica se le adicionó 1,5 mL de Metanol empleando una pipeta automática de 1000  $\mu$ L. Luego trasladamos las muestras al refrigerador (a una temperatura de 4°C) en un recipiente porta-Eppendorf cerrado y forrado con papel aluminio, para evitar la incidencia de la luz,

Después de 24 horas las muestras fueron retiradas del refrigerador y trasladadas a otro laboratorio en una cava para luego proceder a centrifugar las mismas, generando la separación de dos fases, una sólida (pellet) y otra líquida (extracto 1). Seguidamente procedimos a decantar el líquido en otro recipiente Eppendorf previamente identificado.

Esta fracción denominada extracto 1 (E1) contiene los compuestos solubles en metanol presentes en la pared celular.

Una vez efectuada la primera extracción, procedimos a sembrar un volumen de 50 $\mu$ L del extracto obtenido para cada muestra en una placa de separación cromatográfica HPTLC de silica gel 60 F<sub>254</sub>, con ayuda de una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ L de capacidad. En el proceso empleamos como fase móvil el sistema de separación Culberson 2 (de acuerdo a lo expuesto en la referencia Marcano, 1994) correspondiente a la mezcla de solventes: tolueno, dioxano y ácido acético, en las siguientes proporciones: 90: 22,5: 2,5.

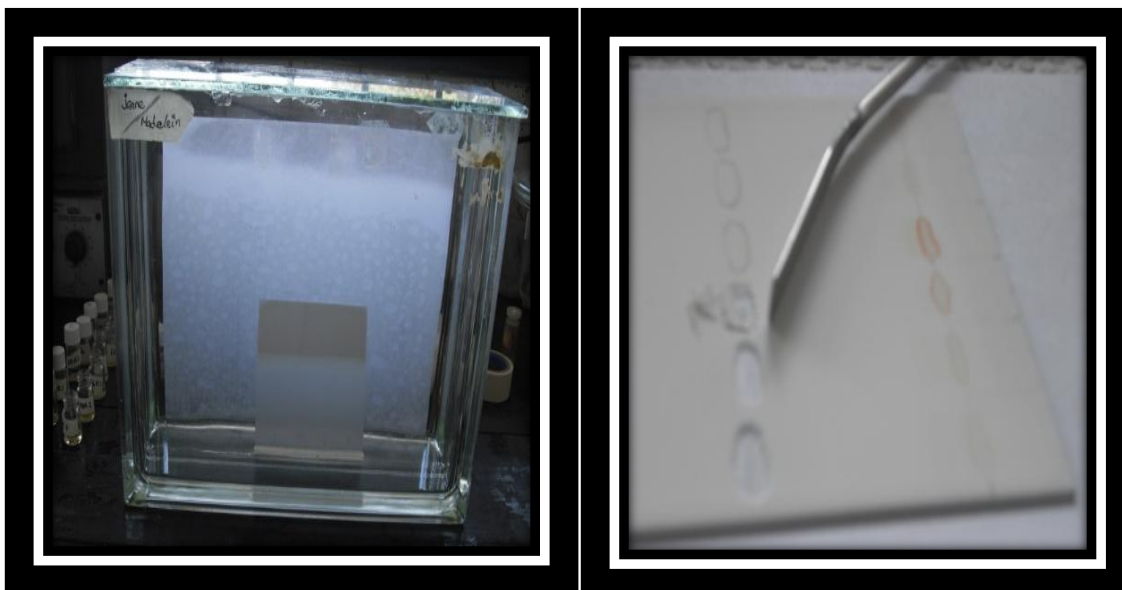


Figura 9.3 Separación cromatográfica de las réplicas.

Las placas que contenían las muestras fueron colocadas en una cubeta que contenía 140 mL de la mezcla de solventes antes referida como se muestra en la figura 9.3. Luego de que la mezcla de solventes recorrió aproximadamente el 80% de la placa, la misma fue retirada de la cubeta y se dejó secar durante 24h, seguidamente procedimos a chequear la separación de los compuestos y marcar las zonas de la placa donde observamos acumulación de algún compuesto (ver figura 12). Posteriormente, con ayuda de una espátula procedimos a raspar la zona marcada (ver figura 9.3) y recuperamos la porción de sílica que contenía el compuesto con ayuda de un pequeño trozo de papel encerado, para luego transferirlo cuidadosamente a un recipiente Eppendorf previamente rotulado. Luego fue necesario adicionar 1,5mL de metanol a cada réplica, seguidamente procedimos a tapar cada recipiente y agitarlos. Posteriormente fueron centrifugados durante 1 min a 1500g para decantar el líquido (E1S) que llevamos a analizar mediante el espectrofotómetro UV.

Luego de realizar la separación cromatográfica para las réplicas de musgo, logramos diferenciar un compuesto absorbente, el cual fue analizado mediante espectrofotometría UV (ver figuras 12 y 13). Mientras que para las réplicas de

hepática logramos obtener 5 fracciones que posiblemente son 5 o 6 compuestos diferentes (ver figuras 15 y 16).

## II. Extracción 2: intracelular, vacuolas celulares.

Una vez efectuada la primera extracción, tomamos la fracción sólida remanente o pellet y procedemos a realizar una segunda extracción, en la que atacaremos el interior de las células, específicamente las vacuolas. Para esto fue necesario realizar una digestión con NaOH durante 3 horas, a una temperatura de 80°C en baño de María. Para esto se adicionó un volumen de 1mL de NaOH 1M a cada muestra, luego de transcurrir las 3 horas y retirar las muestras de baño de María, adicionamos 0.5mL de HCl 5,6M para neutralizar y acidificar la solución. Seguidamente procedimos a centrifugar las muestras durante 1 min. a una velocidad de 6000g para separar la fase sólida (residuo) y la fase líquida (extracto 2).

Luego, tomamos el extracto 2 y lo transferimos a un tubo de ensayo, seguidamente efectuamos una extracción líquido- líquido empleando 0,5mL de acetato de etilo, procedemos a agitar y observamos que comienzan a separarse 2 fases, seguidamente separamos la fase orgánica (FO) situada sobre la fase acuosa empleando una pipeta Pasteur y la transferimos a un Eppendorf, seguidamente repetimos el procedimiento a partir de la adición del volumen de acetato de etilo.

Seguidamente los tubos Eppendorf que contienen la fracción FO fueron llevados a una estufa a una temperatura de 39°C hasta evaporar todo el solvente (48h). Posteriormente se adicionó 1,5mL de Metanol a cada muestra para solubilizar los compuestos extraídos (E2).

## 2. Líquenes.

Luego de triturar las muestras y asegurarnos que su peso era constante procedimos a adicionar 2mL de Etanol empleando una pipeta automática de 1000 $\mu$ L y se dejaron en extracción durante 72h. Seguidamente las muestras se trasladaron a la estufa, a una temperatura de 37°C hasta evaporar por completo el solvente, finalmente se adicionó un volumen de 1,5mL de etanol (L1), empleando una pipeta automática de 1000 $\mu$ L. Posteriormente procedimos a sembrar 50 $\mu$ L de cada muestra en una placa HPTLC de sílica gel 60 F<sub>254</sub>, con ayuda de una jeringa Hammlton de 10 $\mu$ L.del mismo modo que realizamos con las muestras de briófitos luego de efectuar la primera extracción, el procedimiento a seguir fue el mismo en los pasos de separación cromatográfica y recuperación del compuesto separado, con la diferencia de que el solvente adicionado a la sílica recuperada fue etanol en lugar de metanol (luego de centrifugar las réplicas se obtuvo la fracción L1S).

#### **Análisis de espectrofotometría UV.**

Una vez efectuadas las diferentes extracciones antes descritas, los extractos obtenidos fueron llevados a analizar mediante un espectrofotómetro UV Genesys 10 Bio v1.000 2P1H181001.

Inicialmente tomamos el producto de las extracciones 1 y 2 de los briófitos y de la extracción efectuada a los líquenes (3 réplicas procedentes de cada estadio, no separadas mediante cromatografía de capa fina), correspondientes a los extractos E1, E2 y L1. Procedimos a efectuar un análisis exploratorio en las longitudes de onda correspondientes al rango UV (desde 200 hasta 400nm.).

Para proceder a determinar el espectro UV de cada réplica, se tomaron 50 $\mu$ L de la réplica de interés y se disolvió en 1,5mL de metanol, esto se efectuó con la finalidad de poder establecer relaciones comparativas entre los análisis efectuados a los extractos crudos extractos obtenidos mediante la separación cromatográfica.



Seguidamente analizamos las muestras separadas mediante cromatografía de capa fina, correspondientes E1S y L1S, en el rango de longitudes de onda de 200 a 300nm para el caso de los briófitos y desde 200 hasta 400 nm. En el caso de los líquenes, los rangos de análisis fueron establecidos considerando los resultados obtenidos al analizar el grupo de muestras de los extractos E1, E2 y L1.

### **Determinación del índice de esclerofilia para las especies de briófitos seleccionadas.**

Para la determinación del índice de esclerofilia, fue tomado parte del material destinado a pulverizar (un ejemplar de cada una de las especies) y se determinó su peso empleando una balanza analítica, seguidamente procedimos a colocar cada ejemplar en un porta-objetos debajo del cual se encontraba un trozo de papel milimetrado, luego procedimos a rosear cada ejemplar con agua a fin de hidratarlo, eliminando los excesos con ayuda de papel absorbente. Luego se determinó el área de cada ejemplar con ayuda del papel milimetrado.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A continuación se presentan los resultados obtenidos al implementar la metodología previamente descrita, estos se encuentran ordenados en por una serie de gráficos que agrupan los resultados obtenidos, de igual forma analizaremos las características de dichas representaciones gráficas, realizaremos interpretaciones a partir de la comparación y el significado de las señales representadas en las figuras que apreciaremos.

**1. Determinación de la absorbancia de los compuestos presentes en extractos provenientes de la pared celular de briofitos recolectados en áreas soleadas y de sombra.**

Para iniciar, presentamos los resultados obtenidos en el estudio de absorbancia de la totalidad los compuestos extraídos de las especies de briófitos seleccionadas (musgo *H. integrifolium* y hepática *F. brasiliensis*), al realizar la primera extracción, correspondiente a de los compuestos presentes en la parte externa de la célula, empleando como solvente metanol.

**1.1 Determinación de la absorbancia de los compuestos presentes en extractos provenientes de la pared celular de *H. integrifolium* que crecen bajo la incidencia directa o parcial de la radiación solar**

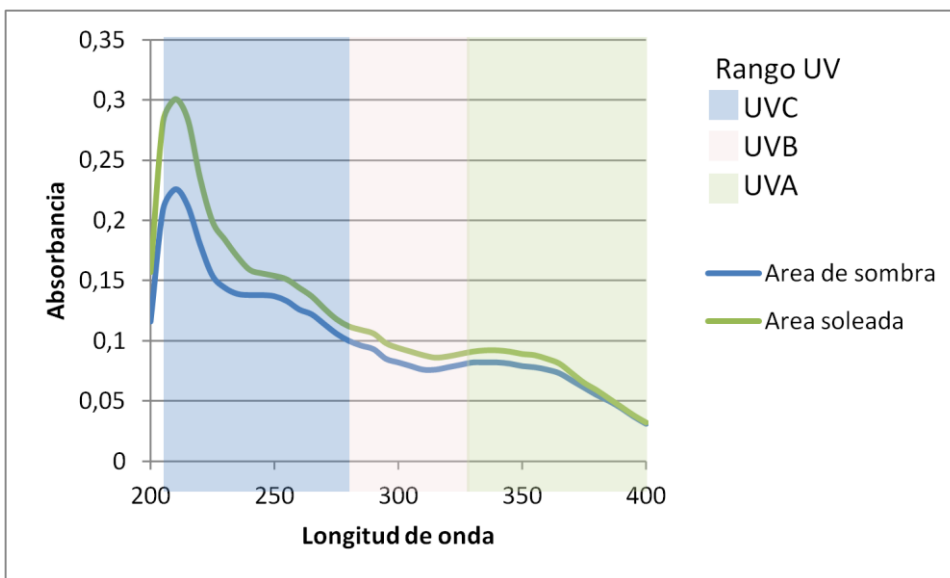


Figura 10. Compuestos extraídos en metanol para *H. integrifolium* (musgo), área de sol y área de sombra.

Como se puede apreciar en la figura 10, las señales representadas corresponden a la absorbancia de la totalidad de los compuestos extraídos mediante la primera extracción efectuada correspondiente a la pared celular, observamos que la tendencia presentada para ambas áreas de estudio es muy similar, aunque existe diferencia en la intensidad que presentan, siendo mayor la intensidad que exhibe la señal correspondiente a los compuestos provenientes de las muestras recolectadas en el área de estudio soleada. Es importante destacar que en el gráfico se aprecian una serie de señales que se encuentran solapadas, las cuales cubren el rango UV en las longitudes de onda UVA (315-400nm.), UVB (280-315nm.) y UVC (200-280nm.), esto nos permite interpretar que logramos extraer varios compuestos sensibles a la UVR y solubles en metanol aunque no podemos discriminar el número exacto de compuestos presentes.

### 1.2 Determinación de la absorbancia de los compuestos presentes en extractos provenientes de la pared celular de *F. brasiliensis*. que crecen bajo la incidencia directa o parcial de la radiación solar.

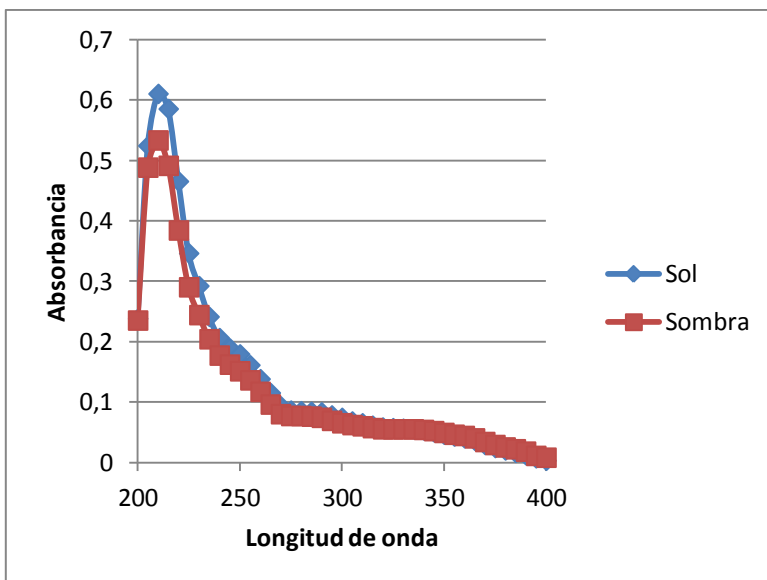


Figura 11. Compuestos extraídos en metanol para *F. brasiliensis* (hepática).

La figura 11 contiene la representación gráfica de la absorbancia determinada para los compuestos extraídos de las paredes celulares en la hepática *F. brasiliensis*. Como podemos apreciar en el gráfico se observa una señal bastante aguda y de gran intensidad, que parece estar solapada con otra u otras señales de una intensidad mucho menor, es importante destacar que la absorbancia determinada se ubica entre las longitudes de onda correspondientes al rango UVC (200- 280nm.). Comparando la figura 11 y la figura 10 podemos apreciar que la señal que se encuentra en el rango UVC en la figura 10 es menos aguda que la observada en la figura 11, considerando que el comportamiento de las señales observadas depende de los grupos funcionales presentes en la estructura de los compuestos extraídos y que son capaces de absorber la radiación UV, podemos asociar esta diferencia en las señales a la cantidad de cromóforos (grupos funcionales que absorben la radiación UV) presentes en cada muestra, es decir que esperaríamos encontrar un mayor número de sustituyentes en las estructuras de los compuestos extraídos de la especie *H. integrifolium* o un mayor número de compuestos. Además esperaríamos encontrar una mayor concentración de los compuestos asociados a las señales detectadas en el caso de *F. brasiliensis* si la comparamos con la concentración que esperaríamos para los compuestos extraídos de las paredes celulares en las muestras de *H. integrifolium*.

- 2. Separación de los compuestos extraídos de la pared celular de las especies *F. brasiliensis* y *H. integrifolium*, y separación del ácido úsnico extraído de la especie *U. laevis*, mediante cromatografía de capa fina (CCF) empleando una mezcla de solventes formada por tolueno, dioxano y ácido acético, en las siguientes proporciones, 90: 22,5: 2,5.**

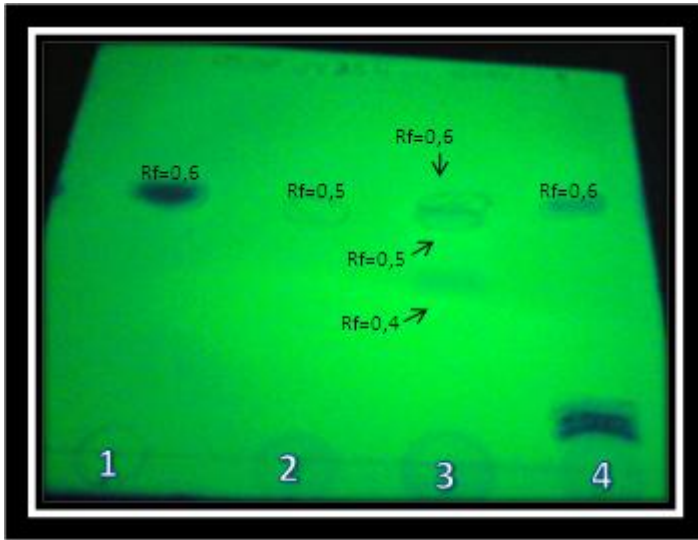


Figura 12. Separación de las muestras mediante CCF. (1) Muestra control de ácido úsnico, (2) Muestra E1 de *H. integrifolium* (3) Muestra E1 de *F. brasiliensis*, (4) Muestra L1 de *U. laevis*.

En la figura 12 observamos la perspectiva obtenida en la placa expuesta a la radiación emitida por una lámpara UV, podemos apreciar la separación de los compuestos lograda gracias a la mezcla de solventes seleccionada,

En la posición 1 tenemos una muestra control de un estándar de ácido úsnico, la cual emplearemos como referencia para comparar la separación lograda para las muestras que se encuentran en las otras posiciones.

Ocupando la posición 2 encontramos el punto de siembra de la muestra correspondiente a los compuestos extraídos de la pared celular de *H. integrifolium* (musgo), podemos apreciar unos centímetros más arriba de éste, una mancha oscura que corresponde al único compuesto separado (Compuesto S) en la placa cromatográfica. El mismo presenta un Rf un poco menor ( $Rf$  compuesto S = 0,5) que el Rf determinado para la muestra control de ácido úsnico ( $Rf$  ácido úsnico = 0,6), esto nos permite interpretar que el compuesto S presenta una polaridad un poco menor a la del ácido úsnico y por esta razón es retenido en la sílica con más facilidad que el estándar colocado en la posición 1. Por otra parte es importante

destacar que en el punto de siembra 2 se observa una sombra, esto nos indica que hay compuestos que no lograron separarse mediante la muestra de solventes empleados y que por tanto estos compuestos presentan una alta polaridad (siendo retenidos totalmente por la sílica en la placa).

De igual forma ocurre en la posición 3, ocupada por la muestra correspondiente a la extracción efectuada a la pared celular de *F. brasiliensis*, donde podemos apreciar que en el punto de siembra hay una sombra indicativa de la presencia de compuestos que no lograron separarse. Para esta muestra logramos diferenciar 3 manchas que presentan  $R_f$  diferentes (correspondientes a los valores 0,4; 0,5 y 0,6), aunque dos de ellas se solapan logramos diferenciar un mayor número de compuestos. Comparando la separación de esta muestra con la muestra control, podemos decir que el compuesto que corresponde a  $R_f = 0,4$  presenta una polaridad considerablemente mayor que el ácido úsnico mientras que las otras dos compuestos separados presentan una polaridad muy similar entre sí y del mismo modo muy similar al ácido úsnico.

Finalmente en la posición 4 encontramos una muestra de los compuestos extraídos en etanol de muestras de *U. laevis*. Al igual que en los dos casos anteriores podemos apreciar que hay una sombra en el punto de siembra, indicando que hubo compuestos cuya alta polaridad no les permitió separarse, además observamos una serie de manchas (que se solapan entre sí) muy cerca del punto de siembra y por último otra mancha correspondiente al ácido úsnico que presenta el mismo  $R_f$  que la muestra control, lo que nos permite confirmar su identidad.

2.1 Análisis de la separación de compuestos extraídos de la pared celular de la especie *H. integrifolium* mediante cromatografía de capa fina (CCF) Comparación entre la tendencia de absorbancia del extracto E1 y el compuesto S.

A continuación presentaremos los resultados obtenidos en el análisis de absorbancia efectuado a los compuestos separados de las muestras de *H. integrifolium* (musgo), sin embargo, es necesario hacer referencia a la similitud de los resultados obtenidos en la totalidad de las réplicas analizadas (ver resultados en anexo 1), por esta razón presentamos los resultados correspondientes a una de las muestras de cada área de estudio en forma comparativa para poder apreciar las variaciones entre las especies que se desarrollan en lugares que presentan condiciones diferentes.

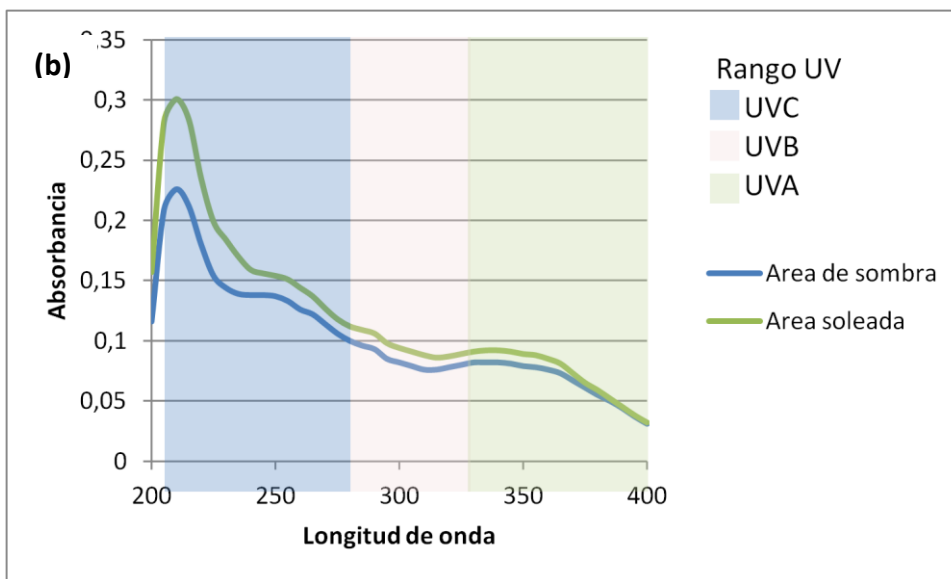
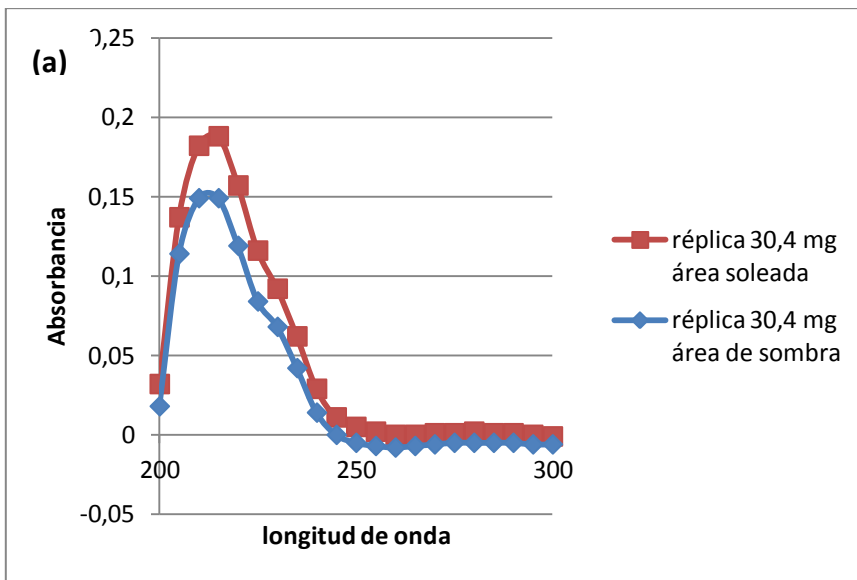


Figura 13 Valores de absorbancia obtenidas para (a) réplicas de *H. integrifolium* (musgo) luego de separar mediante cromatografía de capa fina el E1. (b) Compuestos extraídos en metanol para *H. integrifolium* (musgo), área de sol y área de sombra.

Como podemos observar en la figura 13 (a) para la mayoría de los casos las réplicas correspondientes al estadio sol presentan una mayor absorbancia respecto a las réplicas correspondientes al área de sombra. Se aprecian 2 señales solapadas que presentan absorbancia apreciable en el rango de longitudes de onda correspondiente a UVC. Considerando que la respuesta de absorbancia de un compuesto depende de la concentración del mismo en la solución (extracto E1) analizada, las señales observadas para ambas áreas de estudio presentan un máximo de absorbancia en el mismo rango de longitudes de onda (210-215nm) y al efectuar la separación en la placa determinamos el mismo Rf en todas las muestras *H. integrifolium* (ver tabla 1), podemos interpretar que la señal probablemente corresponda al mismo compuesto o grupo de compuestos.

Comparando los resultados obtenidos antes y después de efectuar la separación mediante CCF, se aprecia que la absorbancia del compuesto o compuestos separados coincide con los valores de absorbancia correspondientes a las señales de mayor intensidad, pero además del compuesto separado las paredes celulares también presentan una serie de compuestos que no logramos separar mediante la separación cromatográfica.

<b>Muestra</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Rf</b>
Ácido úsnico	Ácido úsnico	0,6
<i>U. laevis</i>	Ácido úsnico	0,6
<i>H. integrifolium</i>	Compuesto S	0,5
<i>F. brasiliensis</i>	Compuesto A	0,6
<i>F. brasiliensis</i>	Compuesto B	0,4



<i>F. brasiliensis</i>	Compuesto C	0,3
<i>F. brasiliensis</i>	Compuesto D	0,3
<i>F. brasiliensis</i>	Compuesto E	0,2

Tabla 1. Valores Rf de los compuestos separados mediante CCF.

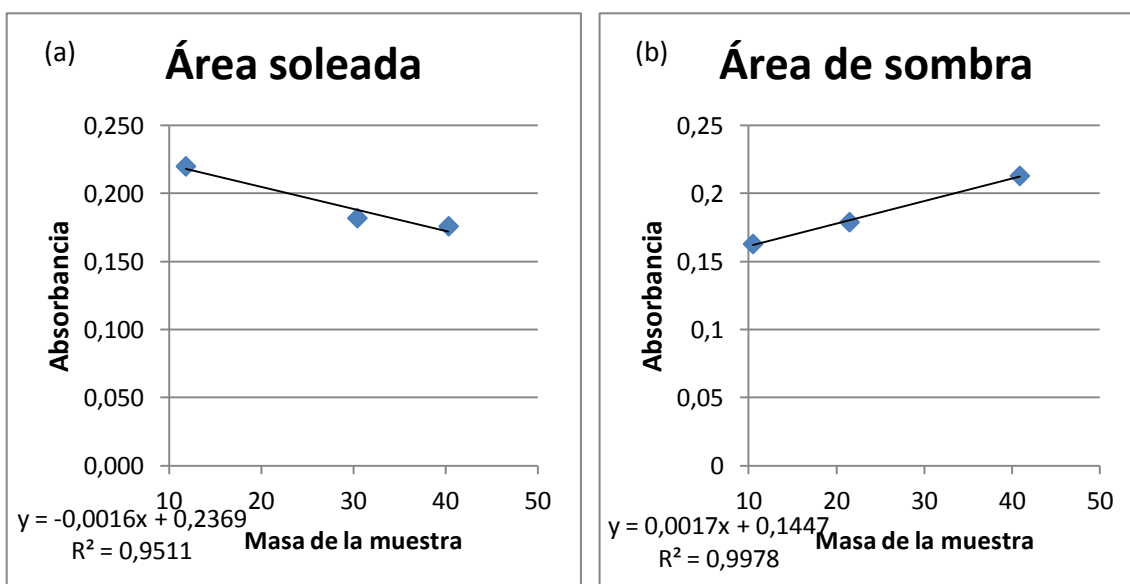


Figura 14. Absorbancia en función de la masa, para el máximo de absorbancia detectado en el análisis del compuesto separado mediante la separación por CCF de la fracción E1 (extracción a la pared celular) en muestras de *H. Integrifolium* recolectadas en (a) Área soleada. (b) Área de sombra.

Como ya se mencionó la extracción fue realizada en réplicas de diferente masa, considerando esto y relacionandolo con los valores obtenidos para el máximo de absorbancia en cada réplica como se aprecia en la figura 14 podemos conocer si existe alguna relación matemática o proporcionalidad entre los valores de absorbancia y la masa a la cual corresponde la réplica inicial, en este caso se aprecia cierta linealidad al realizar la correlación.

Comparando las tendencias observadas en las gráficas representadas en la figura 14, encontramos que son inversas, apreciandose que para el área soleada la

absorbancia disminuye a medida que aumenta la masa, esto puede deberse a que el compuesto separado no se encontraba uniformemente distribuido en las muestras analizadas, El cambio en la tendencia de la correlación cuando observamos la correlación realizada para el área de sombra nos sugiere que para este caso la concentración del compuesto si es proporcional a la masa, esta diferencia entre un área y otra puede deberse a que las condiciones de uno de las áreas de estudio son capaces de favorecer algunos procesos que ocurren en las plantas como es el caso de los procesos enzimáticos que pueden resultar determinantes en la concentración de compuestos específicos y existe la posibilidad de que el compuesto separado participe o sea un producto de alguno de los procesos enzimáticos.

## 2.2 Comparación de los resultados obtenidos en la separación de los compuestos diferenciados de las muestras E1, con los resultados de una muestra control de ácido úsnico.

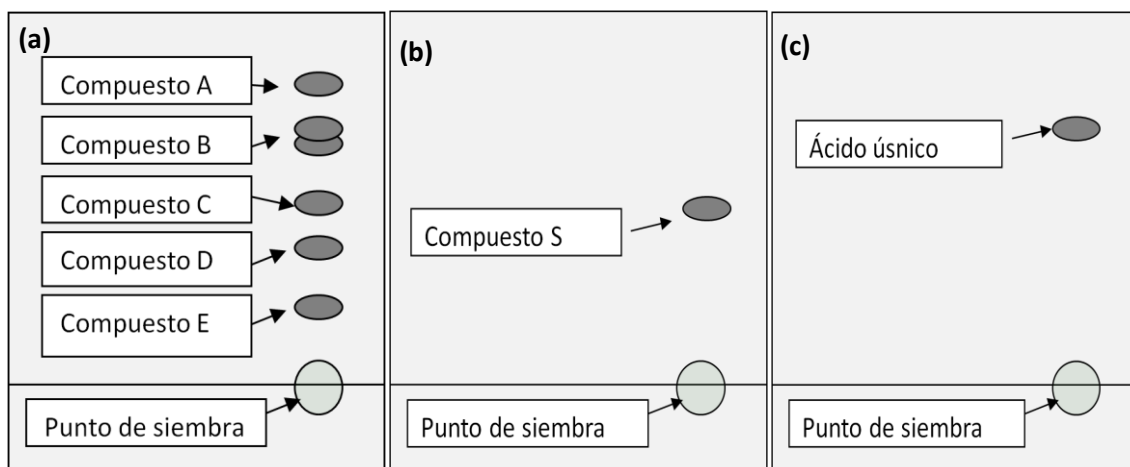


Figura 15. Esquema de la separación observada bajo la lámpara UV, luego de aplicar cromatografía de capa fina. (a) *F. brasiliensis* (b) *H. integrifolium*. (c) *U. laevis*.

Como podemos observar en la figura 15 en la posición (a) correspondiente a *F. brasiliensis*, al efectuar la separación cromatográfica logramos diferenciar un mayor número de compuestos, o familia de compuestos presentes en las paredes celulares de esta especie, mientras que para *H. integrifolium* (b) se logró diferenciar un solo compuesto y para *U. laevis* (c) logramos separar el ácido úsnico.

Considerando que el único compuesto para el que conocemos identidad es el ácido úsnico, en lo sucesivo emplearemos este compuesto como referencia comparativa. Como se aprecia en la figura 15 y la tabla 1, el **ácido úsnico** presenta un  $R_f$  igual que el **compuesto A** pero ligeramente mayor que los **compuestos S y B**, que por lo tanto se encuentran un poco más retenidos por la sílica de la placa y son ligeramente más polares, lo cual nos permitiría inferir la presencia de grupos funcionales que le proporcionen a estos compuestos una polaridad similar al ácido úsnico, pudiendo incluso ser comunes a los que presenta el ácido úsnico. Por otra parte los **compuestos C, D y E** presentan valores de  $R_f$  considerablemente menores que el  $R_f$  calculado para el **ácido úsnico**, de modo que podemos interpretar que estos compuestos son mucho más polares que el ácido úsnico, por lo que esperaríamos encontrar en estos, varios grupos funcionales como  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ , cetonas y escasos sustituyentes como cadenas alifáticas.

2.3 Análisis de la separación de los compuestos extraídos de la pared celular de la especie *F. brasiliensis*. mediante cromatografía de capa fina (CCF). Comparación entre los valores y tendencia de la absorbancia en el extracto E1 antes y después de efectuar la separación.

Seguidamente encontramos los resultados obtenidos en el análisis de absorbancia efectuado a los compuestos separados de las muestras de *F. brasiliensis*

(hepática), al igual que para los resultados obtenidos en el análisis de absorbancia de las réplicas correspondientes al compuesto separado de la especie *H. integrifolium* hacemos referencia a la similitud de los resultados obtenidos para las diferentes réplicas y compuestos separados (ver anexo 2.1 y 2.2)

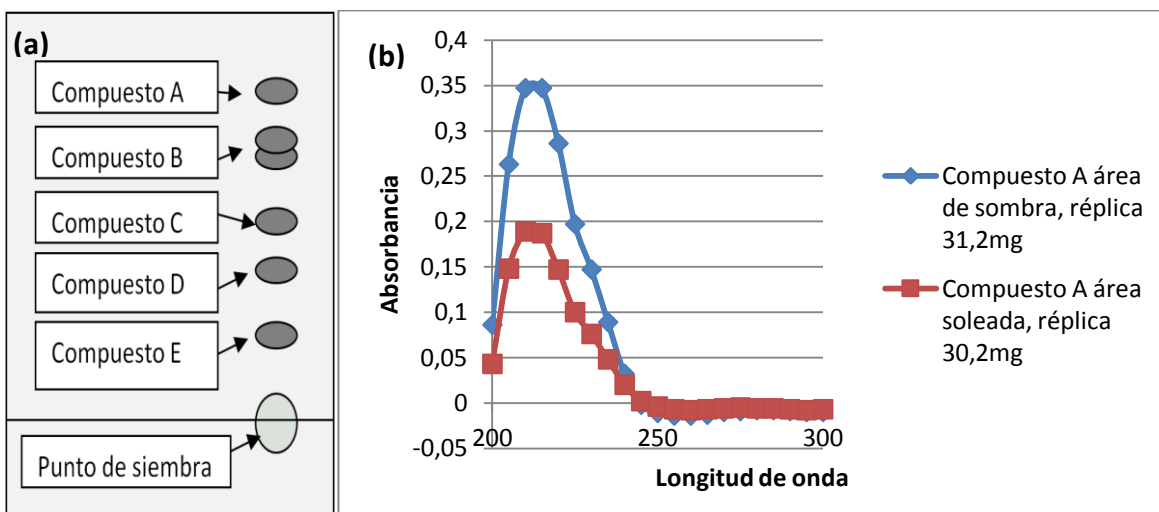


Figura 16.1 (a) Esquema de separación de la placa cromatográfica para las muestras de *F. brasiliensis* (b) Absorbancia las detectada para el compuesto A separado del extracto E1 mediante CCF de las réplicas de *F. brasiliensis* correspondientes a las diferentes áreas de estudio.

En la figura 16.1 (b) apreciamos la tendencia observada para los compuestos separados tal y como se mencionó anteriormente. En la representación gráfica destaca una señal aguda que parece estar solapada con otra señal de menor intensidad, ubicada en el rango de longitudes de onda correspondiente a la región UVC, mientras que para el resto del rango UV la absorbancia no fue significativa.

A pesar de haber separado una serie de compuestos, como se esquematiza en la figura 16.1 (a) las señales de absorbancia obtenidas en los análisis efectuados para cada uno de los compuestos resultaron muy similares como se aprecia en los anexos 2.1 y 2.2, considerando esto podemos interpretar que existe una gran similitud en el contenido de grupos funcionales que presentan estos compuestos, debido a que las señales de absorbancia detectadas en el rango UV son el producto de la energía absorbida en dicho rango por los electrones presentes en

los enlaces de grupos funcionales específicos, pero dado que la información suministrada por la técnica instrumental no permite discriminar entre las posiciones que ocupan los grupos funcionales en las estructuras químicas, ni ofrece indicios sobre el entorno químico del grupo funcional que origina la señal es difícil establecer diferencias entre un compuesto y otro. En este caso también podría ser posible que las señales resulten similares debido a que, por ejemplo, los compuestos evaluados presenten un conjunto de grupos funcionales diferentes, pero al efectuar el análisis se detecta la sumatoria de la contribución de todos los grupos funcionales presentes en cada compuesto y por coincidencia la sumatoria de las señales de los diferentes compuestos es la misma. Otra posibilidad sería que la concentración de los compuestos en la solución analizada sea muy baja y mediante el análisis logremos detectar solo la señal que presenta mayor intensidad en cada compuesto mientras que las otras señales no puedan apreciarse de forma significativa y que esta señal de mayor intensidad corresponda a un grupo funcional que sea común a todos los compuestos analizados.

Por otra parte, observando la figura 16.1 (b) podemos notar que las señales de absorbancia correspondientes al área de sombra presentan mayor intensidad que las detectadas para el área soleada (esto ocurre en todas las réplicas analizadas, ver anexos 2.1 y 2.2). Este comportamiento en la absorbancia sugiere que la concentración de los compuestos diferenciados para las muestras de *F. brasiliensis* recolectadas en el área de sombra, es superior a la concentración de sus homólogos presentes en las muestras de *F. brasiliensis* recolectadas en el área soleada. Lo antes expuesto nos lleva a cuestionarnos sobre las razones que originan esta diferencia de concentración entre las muestras recolectadas en ambas zonas, debido a que la absorbancia de los compuestos separados se encuentra, tal como ya se mencionó en el rango UVC y estas longitudes de onda tan energéticas no inciden sobre la superficie terrestre, de manera que no se encuentran influenciada por la radiación solar. Por tal motivo, probablemente la concentración de estos compuestos dependa de procesos metabólicos que se

vean estimulados en mayor o menor proporción por influencia de las condiciones del área en la cual se desarrolla el organismo.

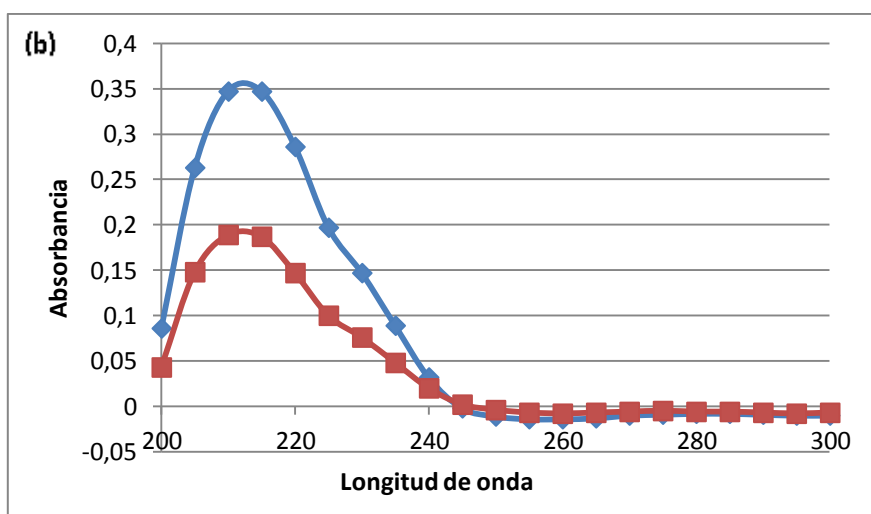
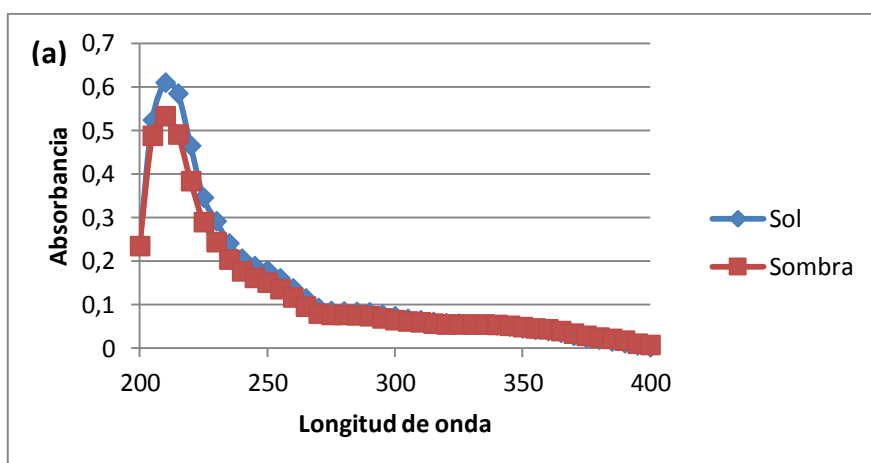


Figura 16.2 (a) Compuestos extraídos en metanol para *F. brasiliensis* (b) Absorbancia las detectada para el compuesto A separado del extracto E1 mediante CCF de las réplicas de *F. brasiliensis* correspondientes a las diferentes áreas de estudio.

Al apreciar las figuras 16.2 (a) y (b) podemos comparar la señal detectada antes y después de efectuar la separación cromatográfica, como se observa existe una diferencia considerable en la intensidad de las señales detectadas, en el caso del compuesto diferenciado (figura 16.2 b) las señales de mayor intensidad (200-

245nm.) cubren un rango de longitudes de onda menor que el observado para las señales de mayor intensidad (200- 270nm.) en el caso del extracto completo.

Encontramos otra apreciable diferencia al observar la figura 16.2 (a) donde la mayor intensidad de señales corresponde al área soleada, mientras que en la figura 16.2 (b) la mayor intensidad de señales presentada para los compuestos separados mediante CCF la presenta el área de sombra. Considerando lo antes expuesto, podemos interpretar que gran parte de los compuestos no pudieron ser diferenciados mediante la separación por capa fina.

### **3. Determinación de la absorbancia de los extractos provenientes de las vacuolas celulares de *H. integrifolium* y *F.brasiliensis*.**

#### 3.1 Determinación de la absorbancia de los extractos provenientes de las vacuolas celulares de *H. integrifolium* recolectados en áreas que presentan incidencia directa o parcial de la radiación solar.

Las muestras de briófitos fueron sometidas a una segunda extracción (ver anexo 3.1 y 3.2), en la que se extrajeron compuestos contenidos en las vacuolas celulares (interior de las células) y posteriormente se determinó su absorbancia en el rango UV, como podemos apreciar en la figura 17 (b), donde se observa que para la especie *H. integrifolium* la mayor intensidad en las señales de absorbancia fue detectada para el área soleada, tomando en cuenta que las dos señales observadas presentan una tendencia similar, siendo la intensidad de señal la única diferencia apreciable. De igual forma, la figura ilustra la presencia de una serie de señales que se solapan y presentan diferentes intensidades a lo largo del rango UV, encontrando las señales de mayor intensidad localizadas en el rango de longitudes de onda correspondiente a UVC (200- 280 nm.).

### 3.2 Comparación de os resultados obtenidos para las dos extracciones realizadas a *H. integrifolium*.

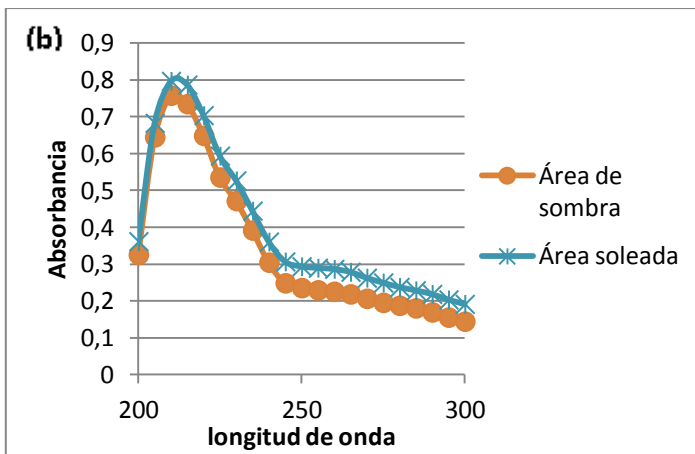
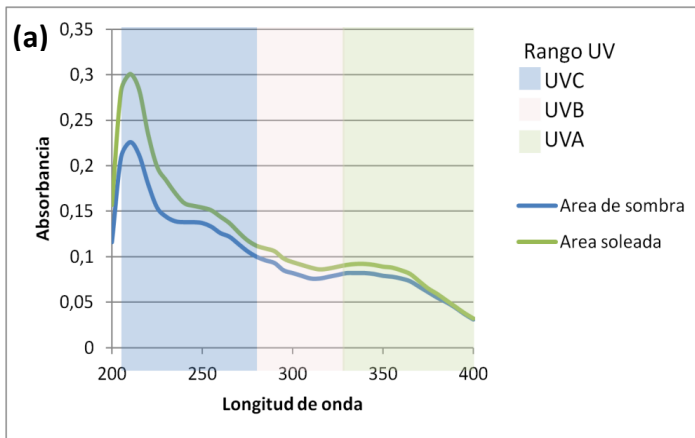


Figura 17 (a) Absorbancia de los compuestos extraídos de las paredes celulares de las muestras de *H. integrifolium*. (b) Absorbancia de los compuestos extraídos de las vacuolas celulares en las muestras de *H. integrifolium*.

Si comparamos los resultados de las 2 extracciones realizadas a las muestras de *H. integrifolium* (figura 17 a y b) encontraremos que para ambos casos el máximo de absorbancia lo presenta el área soleada, por lo tanto podemos interpretar que los compuestos detectados en ambas regiones de la célula (paredes y vacuolas) presentan un comportamiento similar.



Además de esto, en ambas extracciones se detectaron señales de absorbancia en el rango 200- 300nm que a pesar de ser poco intensas permite observar absorbancia en los 3 rangos de la UVR (UVA, UVB y UVC), observamos que la señales más intensas se obtuvieron en el análisis correspondiente a la segunda extracción aunque se aprecia un mayor solapamiento de señales en el gráfico correspondiente (17.2 b), por lo tanto podemos interpretar que en las paredes y vacuolas celulares existen compuestos sensibles a la radiación UV incidente (UVA y UVB) y no incidente (UVC).

Considerando lo antes expuesto, podemos plantear la posibilidad de que la radiación incidente ejerza alguna influencia en la concentración de los compuestos detectados, debido a su sensibilidad ante las longitudes de onda incidente en los tejidos de la planta, estos compuestos cumplan un papel foto-protector en la planta, degradándose para consumir la energía de dichas longitudes de onda, evitando daños a los tejidos de la planta, quien a su vez se encontraría estimulada para efectuar una mayor producción de estos compuestos degradados, conduciendo a un incremento en la concentración en función del incremento en la incidencia de la radiación UV.

Por otra parte, es importante mencionar que las características observadas en las muestras de *H. integrifolium* recolectadas en el área de sombra diferían de las observadas en las muestras de *H. integrifolium* correspondiente al área soleada, ya que este último se observaba de un color verde claro a intenso en la mayor parte de la planta, mientras que las muestras de *H. integrifolium* recolectadas en el área de sombra se observaba verde en algunas zonas (mayormente en las puntas o ápices y en el centro o tallo de la planta) pero predominaba un color marrón en la base de las hojas (predominando en la región cercana a la raíz de la planta), considerando esto y los resultados obtenidos podemos interpretar que probablemente los pigmentos presentes en la planta (que no fueron separados o extraídos y evaluados durante la realización de esta investigación) también presenten un importante rol foto-protector dadas las condiciones de exposición a niveles de radiación UV elevados

3.3 Determinación de la absorbancia de los extractos provenientes de las vacuolas celulares de *F. brasiliensis* recolectadas en áreas que presentan incidencia directa o parcial de la radiación solar. Comparación de los resultados de absorbancia obtenidos al analizar el producto de las extracciones realizadas a *F. brasiliensis*.

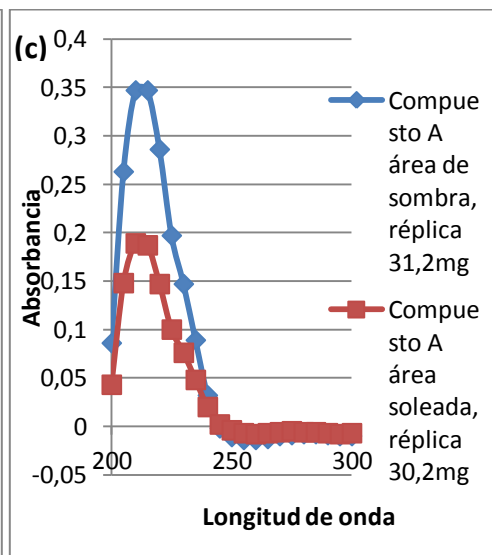
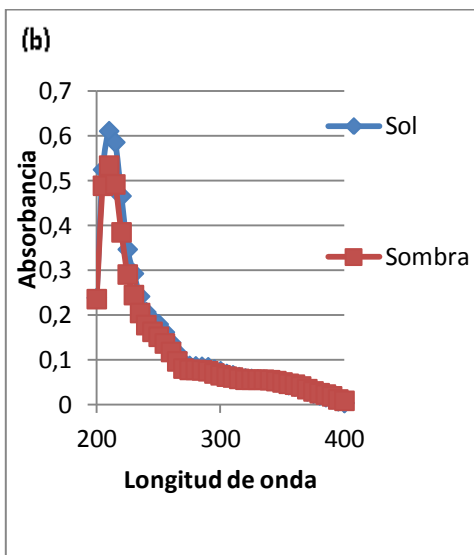
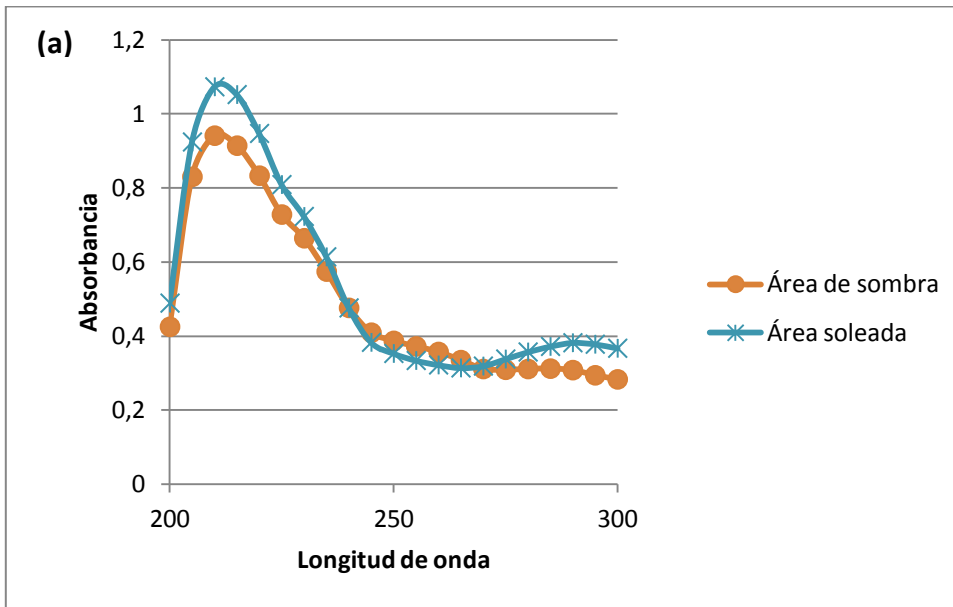


Figura 18.1 Absorbancia de los compuestos extraídos de (a) las vacuolas celulares (b) paredes celulares; en las muestras de *F. brasiliensis*.(c) compuesto A.

Observando la figura 18.1 (a) podemos apreciar la tendencia de las señales correspondientes a la absorbancia detectada al analizar el producto extracción en las vacuolas presentes en las células de *F. brasiliensis* procedentes de las muestras recolectadas en las diferentes áreas de estudio, se observa que la mayor intensidad de absorbancia es presentada por la curva que representa el área soleada, de forma similar al comportamiento observado en la figura 18.1 (b) correspondiente a los compuestos obtenidos en la primera extracción. Sin embargo, este comportamiento difiere de los compuestos que se lograron separar mediante CCF (figura 18.1 c). Del mismo modo podemos observar en la figura 18.1 (a) como en las longitudes de onda superiores a los 250nm fueron detectados valores de absorbancia que presentan una mayor intensidad respecto a las señales detectadas al analizar el producto de extracción 1, esto nos sugiere que a nivel intra-celular se logro extraer una mayor proporción de compuestos sensibles a la radiación UVB y UVA. Lo antes expuesto nos lleva a cuestionarnos sobre esta apreciable diferencia, que podría estar motivada por diferencias asociadas a las características del sistema metabólico de la planta o tal vez a la posibilidad de que la planta presente otros compuestos UV-sensibles que no logramos extraer mediante la metodología y solventes empleados.

#### **4 Comparación entre los resultados obtenidos en la determinación de absorbancia en realizada al producto de la extracción 2 correspondiente a las vacuolas celulares de *F. brasiliensis* y *H. integrifolium*.**

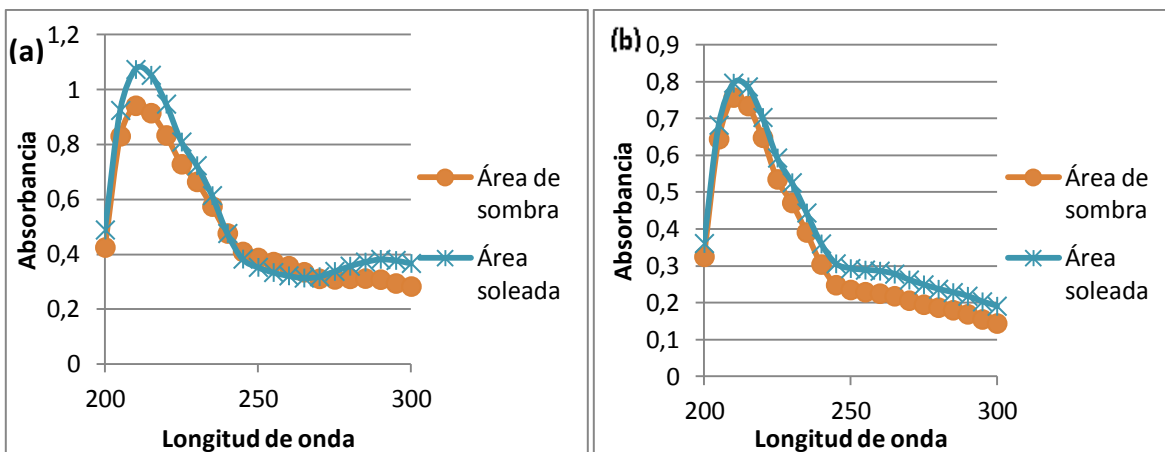


Figura 18.2 Determinación de absorbancia de los compuestos extraídos de las vacuolas celulares de los briófitos seleccionados en las diferentes áreas de estudio (a) *F. brasiliensis* (b) *H. integrifolium*.

Por otra parte, si comparamos los resultados obtenidos al analizar los extractos procedentes de las vacuolas celulares de *F. brasiliensis* y *H. integrifolium* (ver figura 18.2 a y b) podemos observar que existe similitud en la tendencia apreciada en el rango 200- 250nm (longitudes de onda que pertenecen al rango de UVC). Esto puede ser un indicativo de que los compuestos que detectados para ambas especies presentan los mismos grupos funcionales y que podría existir la posibilidad de que sinteticen compuestos similares o compuestos que pertenezcan a la misma familia.

Si comparamos la tendencia de las señales detectadas para ambas especies en longitudes de onda superiores a los 250nm encontramos notables diferencias en intensidad y comportamiento de la curva representada, esto nos indica que los compuestos que absorben estas longitudes de onda detectados para *F. brasiliensis* probablemente presentan características químicas considerablemente diferentes a los que podemos encontrar en *H. integrifolium* y que la concentración de los compuestos detectados en este último probablemente es inferior a la concentración de los compuestos que detectamos para *F. brasiliensis*.

## **5 Determinación de la absorbancia de los extractos provenientes de la especie de líquen *U. laevis* recolectada en áreas que presentan incidencia directa o parcial de la radiación solar.**

A continuación presentaremos los resultados obtenidos en la extracción aplicada a las muestras de *U. laevis* recolectadas en las diferentes áreas de estudio seleccionadas. Previamente, es necesario hacer referencia a la diferencia en metodología aplicada para las muestras de las 3 especies seleccionadas en el presente trabajo de investigación, como se ha mencionado con anterioridad las especies *H. integrifolium* y *F. brasiliensis* son plantas no vasculares conocidas como briófitos, mientras que la especie *U. laevis* es un líquen, esta diferencia entre los organismos seleccionados implica diferencias en las características morfológicas, químicas e incluso celulares, de modo que los tejidos de los briófitos son diferentes a los del líquen, por esta razón no es posible hacer una diferenciación entre pared y vacuolas celulares para los líquenes, debido a que los tejidos de dichos organismos son estructuralmente diferentes a los tejidos que presentan los briófitos.

Una vez aclarado esto, procedemos a presentar los resultados obtenidos en la extracción L1 efectuada a las muestras recolectadas de *U. laevis*.

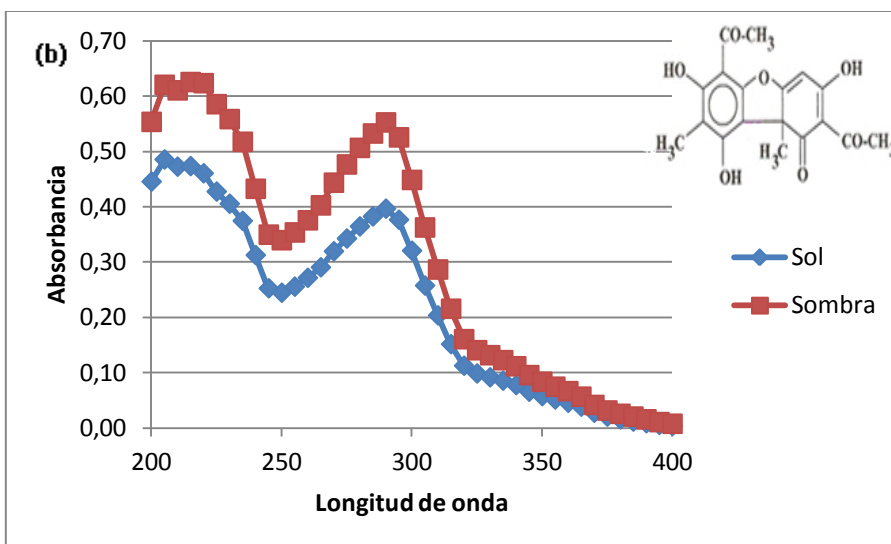
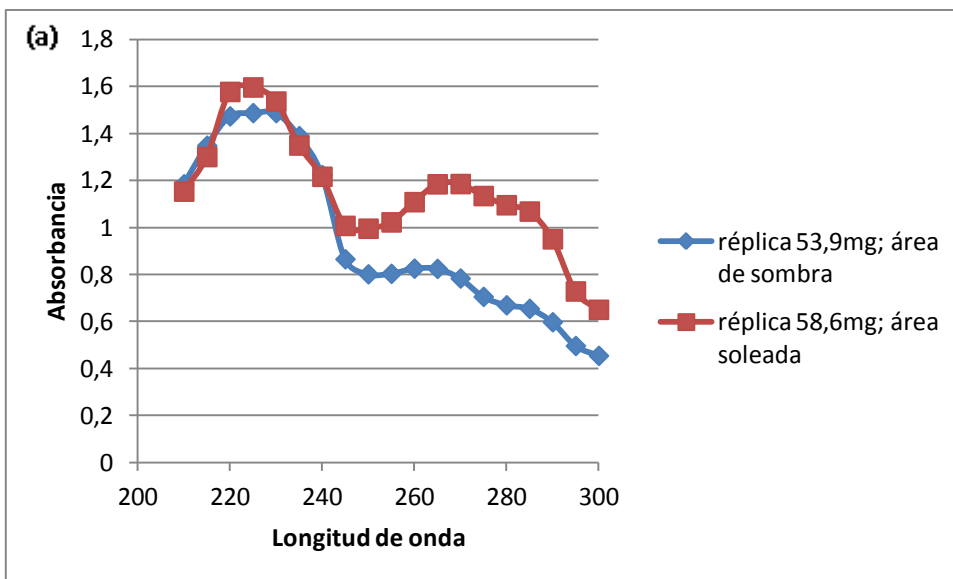


Figura 19. 1 Absorbancia de (a) Compuestos extraídos de las muestras de *U. laevis* (b) ácido úsnico separado mediante cromatografía de capa fina para las muestras de *U. laevis*.

Como podemos apreciar en la figura 19.1 (a) que contiene las representación de absorvancia en función de longitudes de onda, obtenida al analizar el extracto L1 correspondiente a la totalidad de los compuestos extraídos de los tejidos de la especie *U. laevis* encontramos una serie de señales de gran intensidad, que se

encuentran solapadas y cubren todo el rango de longitudes de onda que incluye parte de la UVR proveniente del sol, incidente (UVB) y no incidente (UVC) en la superficie de la tierra, la mayor intensidad en absorbancia se observa en la longitud de onda de 215nm incluida en el rango de UVC.

Comparando la tendencia que sigue la intensidad de las señales detectadas para la totalidad de los compuestos extraídos (figura 19.1 a) y las señales detectadas para el ácido úsnico, encontramos que la tendencia de intensidad para las áreas de estudio, es inversa, es decir que para el ácido úsnico, la mayor absorbancia se encuentra en la zona de estudio de sombra, mientras que para la totalidad de los compuestos extraídos, la mayor absorbancia se encuentra en el área soleada, esto nos permite interpretar que en la totalidad de los compuestos extraídos posiblemente podríamos encontrar alguno o algunos compuestos, cuya concentración se encuentre influenciada significativamente por la diferencia de radiación que existe entre ambas áreas de estudio, pero que ese no es el caso del ácido úsnico.

Seguidamente nos concentramos en la intensidad de las señales de cada una de las áreas de estudio, encontrando una mayor absorbancia en el área de sombra, lo cual sugiere mayores concentraciones del compuesto en los tejidos de las especies a los organismos de este estadio. Esto nos lleva a pensar que el compuesto se acumula en una mayor proporción en los tejidos debido a una menor incidencia de la radiación sobre estos (mientras menor sea la incidencia de la radiación solar en los tejidos del liquen, menor será la probabilidad de que el compuesto presente en los tejidos sea expuesta a la radiación UV proveniente del sol) y que del mismo modo la producción de este compuesto por parte del liquen probablemente no esté directamente vinculada con los niveles de radiación UV y que sean las vías de síntesis metabólicas las que determinan la concentración de este compuesto en presente en los tejidos de *U. laevis*

### 5.1 Análisis de las señales obtenidas luego de efectuar la separación de compuestos extraídos de la especie *U. laevis* mediante CCF

Para esta especie evaluamos la absorbancia del ácido úsnico ( $C_{18} H_{16} O_7$ ) en ambas áreas de estudio (ver figura 19.1 b), en el gráfico pueden apreciarse 2 señales de gran intensidad, mayor absorbancia corresponde al rango 200-250nm. y presenta una forma ancha, las señales detectadas para estas longitudes de onda reflejan la absorbancia de los grupos funcionales OH<sup>-</sup> enlazados a los anillos aromáticos, comúnmente estas señales se encuentran entre longitudes de onda cercanas a 210 nm, incrementando su absorbancia de acuerdo a su entorno químico, es decir la cantidad de grupos funcionales que también estén enlazados al mismo anillo aromático, además de la posición que ocupen los demás sustituyentes, en estas longitudes de onda también se reflejan las transiciones electrónicas que ocurren en los anillos aromáticos, otro de los grupos funcionales reflejado en la figura, en el enlace correspondiente al grupo cetona presente en la estructura y responsable del segundo máximo de absorbancia que se aprecia en la figura concentrado en las longitudes de onda cercanas a los 270nm.

### 5.2 Correlación entre la masa y absorbancia en el producto de la extracción realizada a la especie *U. laevis*.

Por otra parte, es necesario hacer referencia a la correlación efectuada entre la masa de las réplicas elaboradas y la absorbancia detectada para cada una de ellas (ver anexo 4) en las diferentes áreas de estudio y que se aprecian en la figura 19.2 (a) y (b), en la misma se evidencia la poca correlación detectada entre la masa y la absorbancia correspondiente a cada réplica, esto probablemente se ve influenciado por la baja concentración que se esperaba obtener para cada muestra según lo reportado por Marcano et al., 1999, puesto que según esta



publicación deberíamos esperar que el ácido úsnico represente el 2,7 a 3,4% del peso total de la muestra y posiblemente la variabilidad que incluye este intervalo resulta muy amplia considerando los valores tan pequeños a los que corresponden las masas de cada una de las réplicas pesadas.

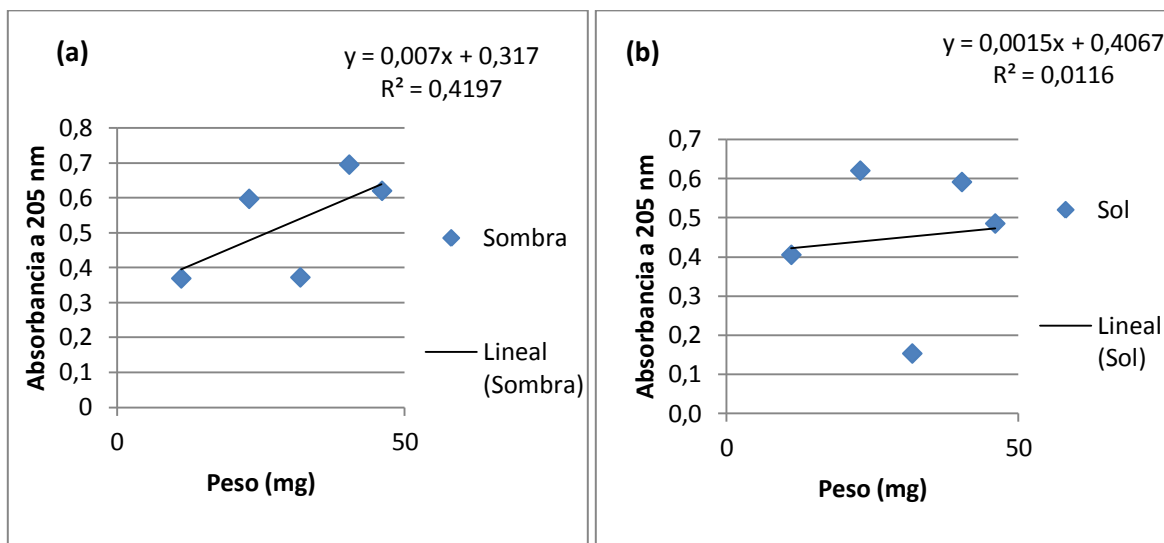


Figura 19.2. Correlación absorbancia vs peso de muestra en el máximo de absorbancia (215 nm) (a) área de sombra. (b) área soleada.

### 5.3 Comparación entre la absorbancia de la totalidad de los compuestos extraídos de las vacuolas celulares de *F. brasiliensis*, *H. integrifolium* y de los tejidos de *U. laevis*

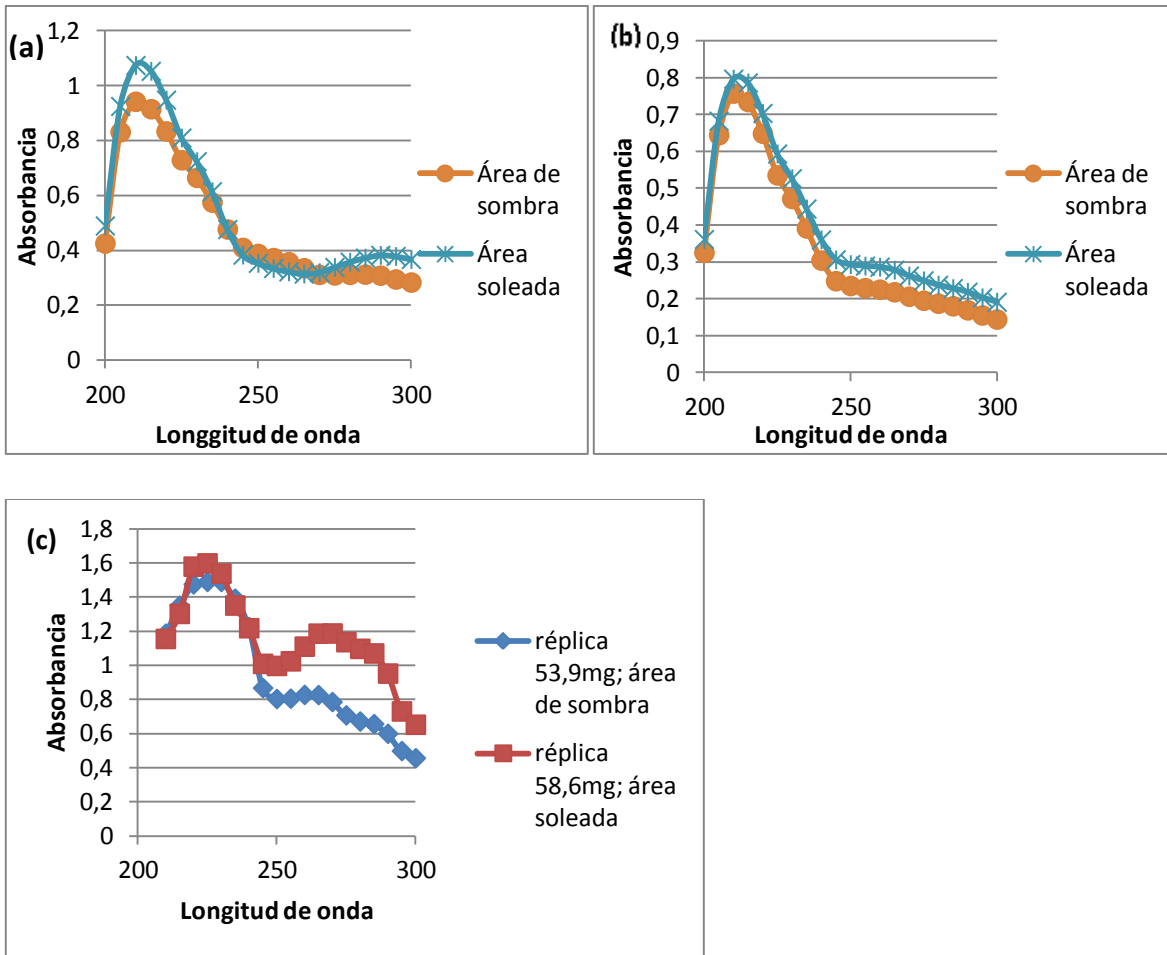


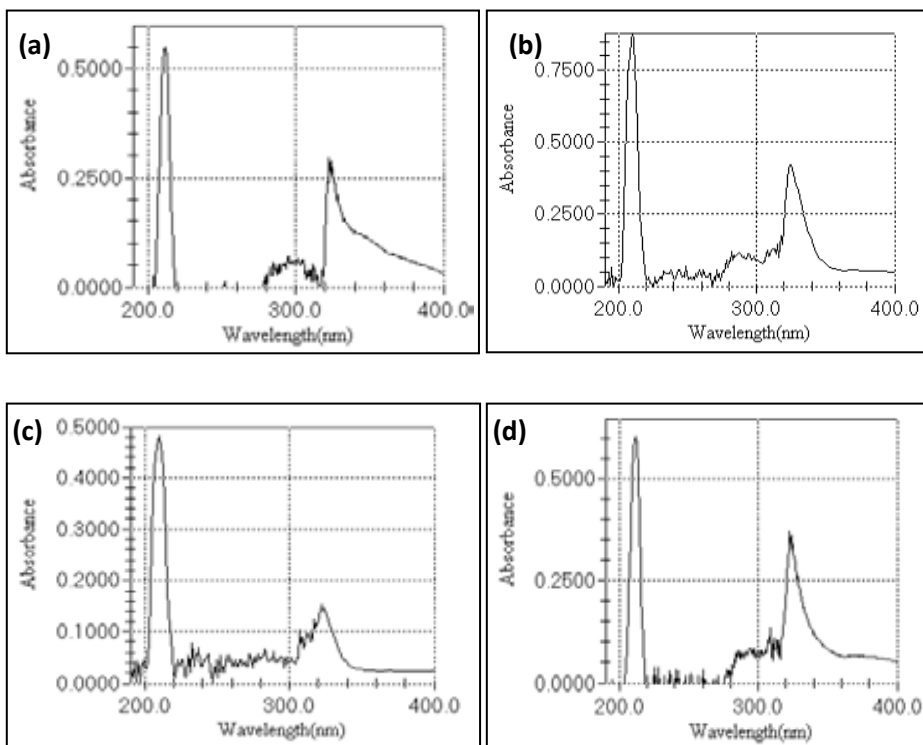
Figura 20. Comparación entre la absorbancia de la totalidad de los compuestos extraídos de (a) las vacuolas celulares de *F. brasiliensis*. (b) *H. integrifolium* y de los tejidos de (c) *U. laevis*

Comparando los resultados obtenidos para esta especie y los briófitos, como se aprecia en la figura 20, podemos observar que para *U. laevis* detectamos una absorbancia considerable en el rango UVB (figura 20 c) a diferencia de la tendencia presentada en los resultados correspondientes a los briófitos, que presentaron una mayor absorbancia en el rango UVC y escasa absorbancia en el rango UVB. Por esta razón podríamos pensar que resulta de mayor utilidad considerar la posibilidad de emplear la especie *U. laevis* como un indicador de los niveles de radiación incidentes, considerando la tendencia que se aprecia en la figura 20 (c), las curvas correspondientes a las 2 áreas de estudio presentan la misma tendencia pero se observan variaciones en la intensidad de las señales,

encontramos que las señales que se observan entre las longitudes de onda de 250 a 300 nm. exhiben una marcada diferencia de intensidad, siendo la mayor intensidad perteneciente a la representación de absorbancia de los compuestos extraídos de las muestras recolectadas en el área soleada. Lo antes expuesto nos lleva a plantearnos la posibilidad de que para estos compuestos probablemente la radiación incidente ejerza algún papel influyente en la producción de estos compuestos.

Por otra parte, tomando en cuenta el punto de vista metodológico resulta más sencillo emplear la especie de líquen seleccionada para la obtención de compuestos sensibles radiación correspondiente al rango UVB.

**6. Comparación de los resultados de absorbancia obtenidos en las extracciones realizadas para *H. integrifolium* y *F. brasiliensis* con resultados de absorbancia de compuestos extraídos de especies de líquenes diferentes a *U. laevis*.**



**Figura 21.1 Espectro de absorción del extracto total en el rango UVC y UVB de líquenes potencialmente vulnerables de las zonas glaciales y nevadas del Parque Nacional Sierra Nevada de Mérida. (a)Lecanora sp. (b)Physia sp. (c)Protoblastemia sp. (d)Verrucaria sp. (Tomado de Marcano et al.,2010)**

Analizando la figura 21.1 podemos observar que en todos los casos el extracto obtenido para las especies, presentan un conjunto de señales, entre las cuales destaca una señal aguda situada en longitudes de onda correspondiente al rango UVC que se caracteriza por presentar el mayor valor de absorbancia en el rango de longitudes de onda representado, además de esto es importante mencionar que en los gráficos representados en la figura corresponden a extractos totales en acetona y considerando que en los tejidos de los líquenes podemos encontrar compuestos fenólicos (Buffoni et al., 2002; Córdova 1975) y probablemente estas señales observadas estén asociadas a los mismos.

Con esto en mente, si observamos los resultados obtenidos para las extracciones realizadas a las muestras de briófitos, podemos apreciar que en todos los gráficos está presente una señales muy similares (ver figura 21.2) pero que a diferencia de las señales procedentes de líquenes, estas no se encuentran acompañadas por ninguna otra señal de elevada intensidad. En este sentido surge la inquietud ante la posibilidad de la existencia de otras señales a longitudes de onda mayores, que presenten una intensidad tan baja que no puedan ser detectados por el equipo espectrofotómetro UV, hecho que podría esperarse, considerando las bajas concentraciones de las soluciones analizadas.

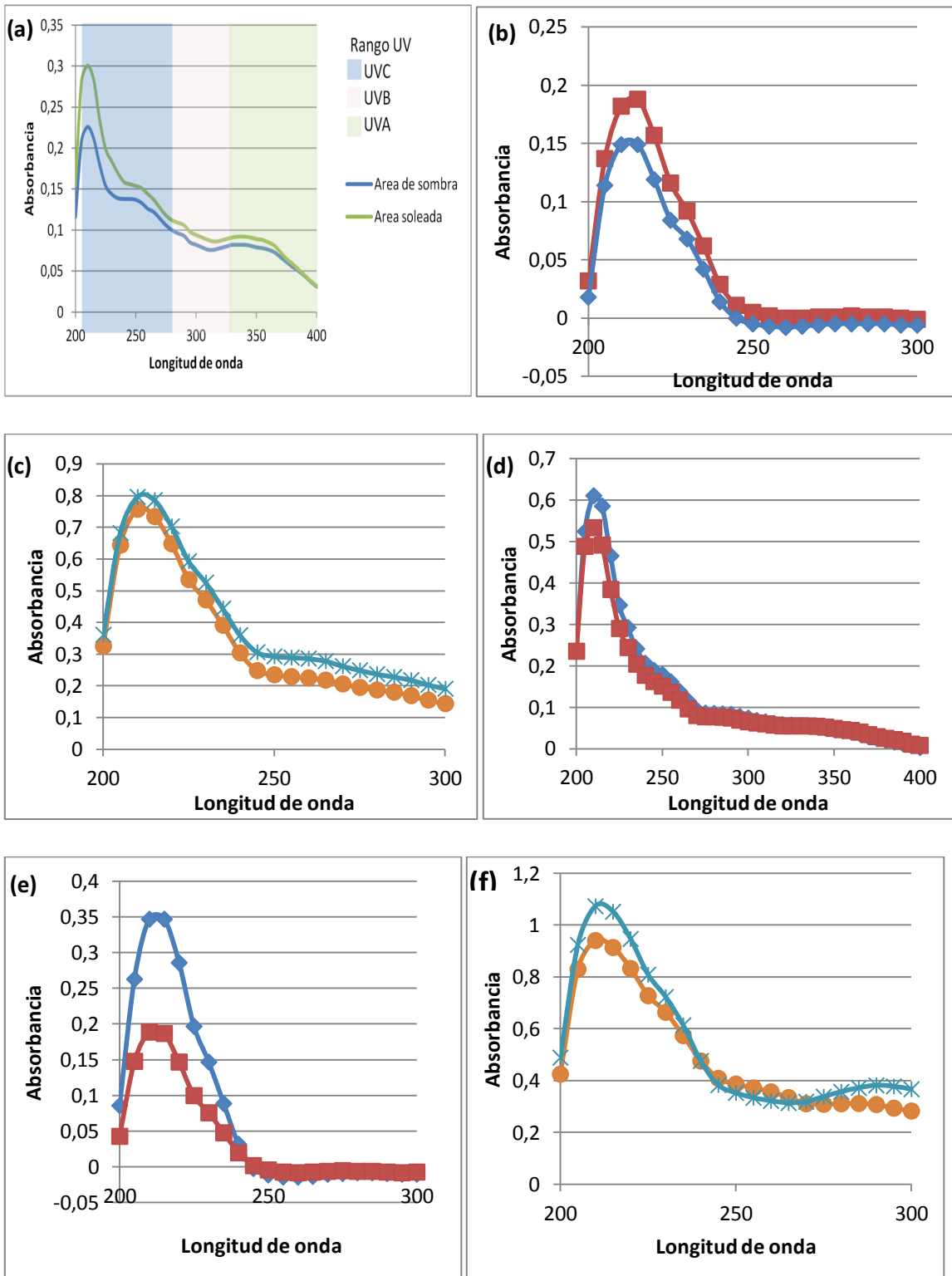


Figura 21.2 Comparación de los resultados de absorbancia obtenidos para *H. integrifolium* y *F. brasiliensis*. (a) E1 de *H. integrifolium* (b) E1S de *H. integrifolium*

(c) E2 de *H. integrifolium* (d) E1 de *F. brasiliensis*. (e) E1S de *F. brasiliensis*. (f) E2 de *F. brasiliensis*.

Luego de observar los resultados obtenidos para las especies de briófitos en las 2 extracciones y definir el rango de longitudes de onda en el que se detectó absorbancia para los compuestos extraídos (correspondiente al rango UVC), es posible considerar que probablemente el mecanismo fotoprotector de estas plantas ante la radiación UV incidente en sistema natural del cual forman parte, este constituido por compuestos fenólicos como lo son algunos pigmentos y flavonoides que se encuentran en sus tejidos, en este sentido resulta de gran importancia destacar una de las características observadas en campo, particularmente en la coloración presentada por la especie de musgo recolectada, tal y como antes se mencionó.

Es importante destacar que al igual que algunos líquenes como los referidos en la figura 21, las especies de briofitos empleadas en este trabajo de investigación presentaron absorbancia en el rango UVC, capacidad que podría ser aprovechada para futuras investigaciones en otros ámbitos, como es el caso del aprovechamiento de esta capacidad protectora de los líquenes para filtrar la UVC no incidente en la Tierra, pero existente fuera de la atmósfera de nuestro planeta, para su uso en investigaciones espaciales.

**7. Comparación de los resultados de absorbancia obtenidos en las extracciones realizadas para *H. integrifolium* y *F. brasiliensis* con resultados de absorbancia de compuestos extraídos de la especie *Jungermannia excertifolia*. recolectada y estudiada en La Rioja, España.**

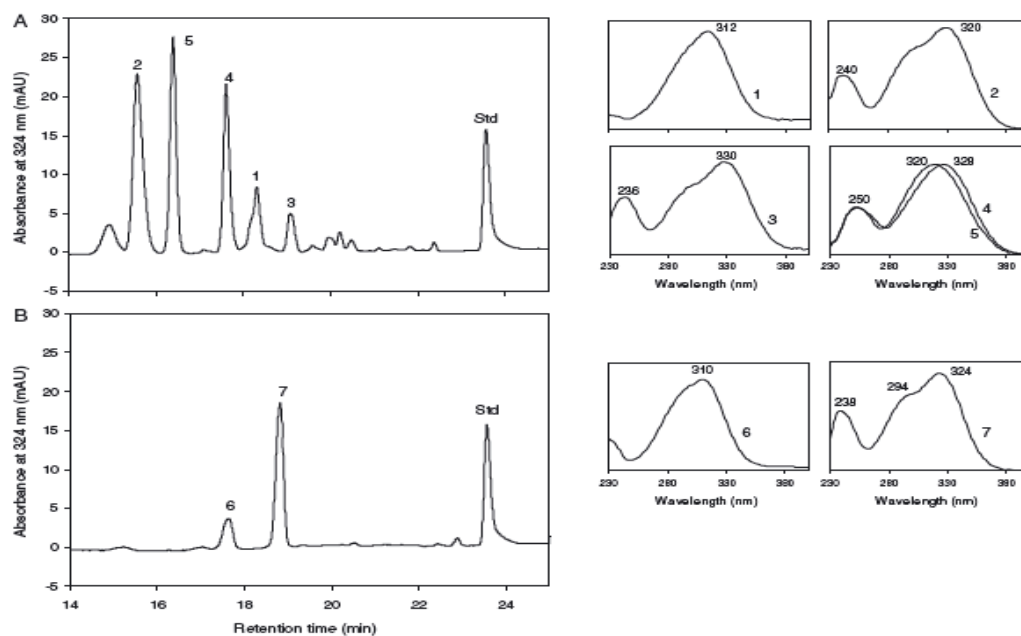


Figura 22. Cromatogramas representativos (unidades de miliabsorbancia vs tiempo de retención) de los compuestos (A) extraídos en metanol, (B) extraídos mediante digestión alcalina a la especie *Jungermannia excertifolia subsp. Cordifolia*. Compuestos separados 1, ácido *p*-coumaroylmalico; 2, ácido fasélico; 3, ácido feruloylmalico; 4, ácido 5''-(7'',8''-dihydroxycoumaroyl)-2-caffeoylmalico; 5, ácido 5''-(7'',8''-dihydroxy-7-O- $\beta$ -glucosyl-coumaroyl)-2-caffeoylmalico; 6, ácido *p*-coumárico; and 7, ácido ferúlico. Espectro de absorción representativa (Tomado de Fabón et al., 2010).

Al observar los resultados de los análisis como los que se observan en la figura 22, realizados a otras especies de briofitos correspondientes a compuestos separados y compararlos con resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, encontramos grandes diferencias en el comportamiento de absorbancia de los compuestos detectados para las especies seleccionadas, específicamente en el rango de absorbancia de los compuestos, de modo que nos planteamos la posibilidad de que los compuestos detectados para *H. integrifolium* y *F. bralisiensis* presenten características químicas considerablemente diferentes a las presentadas por la especie de hepática *Jungermannia*, (fabón, 2010; Núñez 2009) esto probablemente podría ser a causa de que esta última es un briofito

acuático, mientras que la *H. integrifolium* es una especie saxícola y *F. brasiliensis* es una especie epífita, de modo que estas se encuentran directamente expuestas a la radiación solar, mientras que la especie *Jungermannia* se encuentra protegida hasta cierto punto por una columna de agua, por esta razón sería probable que esta especie desarrollara un sistema foto-protector adaptado a las condiciones del medio en el cual se desarrollan (condiciones de incidencia indirecta o parcial de la radiación solar). Además de lo antes expuesto es necesario considerar que el presente estudio fue realizado en páramo andino venezolano, la situación geográfica de nuestro país genera condiciones climáticas y características en el sistema natural que difieren de las condiciones y características del lugar donde se realizaron los estudios a la especie *Jungermannia*. es importante mencionar que factores como la altitud de la zona de estudio y la latitud geográfica, inciden en la intensidad de la radiación solar que reciben los organismos estudiados.

#### 8. Análisis y comparación entre los valores de esclerofilia detectados para *H. integrifolium* y *F. brasiliensis*.

Briófito	Área de estudio	Índice de esclerofilia (g/cm <sup>2</sup> )	Desviación estándar.
<i>H. integrifolium</i>	Sol	0,0059	0,0027
<i>H. integrifolium</i>	Sombra	0,0068	0,0033
<i>F. brasiliensis</i>	Sol	0,0033	0,0007
<i>F. brasiliensis</i>	Sombra	0,0034	0,0010

Tabla 2. Índices de esclerofilia.



En la tabla 2 podemos observar los valores calculados para el índice de esclerofilia en las especies de briofitos recolectadas, estos presentan diferencias poco significativas entre sí (para ambas especies). Tomando en cuenta que este valor nos proporciona un indicativo de la calidad química o contenido de compuestos en la especie analizada y observando los resultados obtenidos en las extracciones realizadas encontramos que no todos los compuestos siguen una misma tendencia, por esta razón se hace necesario considerar que al determinar el índice de esclerofilia no tenemos la posibilidad de asociarlo en forma directa a un grupo de compuestos específicos, ya que esto es indicativo de la calidad química de la planta de un modo general, de modo que se considera la totalidad de compuestos presentes, en este sentido podemos interpretar que probablemente en las especies estén presentes una variedad de compuestos además de los extraídos, que influyen en mayor proporción en los valores obtenidos para el índice de esclerofilia.

## CONCLUSIONES

A partir del musgo de la especie *H.integrifolium* fueron extraídos compuestos sensibles a la radiación UV en los diferentes rangos (UVA, UVB y UVC). El máximo de absorbancia de los compuestos extraídos de las paredes celulares y las vacuolas se presenta en el rango UVC.

La Hepática *F. brasiliensis* a diferencia del musgo, contiene en sus paredes celulares y vacuolas compuestos mayormente sensibles al rango UVC y poco sensibles a las longitudes de onda incidentes en la superficie terrestre (UVB y UVA).

Las especies de *H.integrifolium* y *F. brasiliensis* seleccionadas presentan algunos compuestos cuya concentración parece estar influenciada de alguna forma por la incidencia de la radiación UV, favoreciendo en algunos casos la degradación del compuesto y en otros casos su acumulación.

Los compuestos extraídos en la pared celular de *F. brasiliensis* presentan muy poca actividad fotoprotectora, debido a que su absorbancia en el rango de longitudes de onda UVB y UVA es poco apreciable y por tanto su sensibilidad a estas longitudes de onda.

El ácido úsnico presente en el líquen *Usnea laevis* presenta una mayor intensidad y rango de absorbancia en el intervalo UV que los compuestos separados para las especies *H. integrifolium* y *F. brasiliensis*.

El comportamiento de la absorbancia que presentan los compuestos presentes en las paredes celulares de *H. integrifolium* en las dos áreas estudiadas (área de sombra y área soleada) es inverso al comportamiento de la absorbancia presentada por el ácido úsnico extraído de *Usnea laevis*, por lo que interpretamos que la radiación UV incidente genera en *H. integrifolium* un efecto contrario al que produce en el ácido úsnico.

El índice de esclerofilia es un parámetro insuficiente para discriminar entre los compuestos presentes en los tejidos de los briófitos pero nos ayuda a ilustrar que existen otros compuestos, además de los detectados que influyen en una proporción mayor sobre los valores obtenidos para la relación entre el peso de la planta y su volumen.

## RECOMENDACIONES.

Los resultados obtenidos para los compuestos separados ilustran la capacidad UVC-protectora que presentan *H. integrifolium* y *F. brasiliensis*, por lo cual podría considerarse la utilidad de estas especies en la realización de estudios en condiciones donde influya la radiación UVC.

Considerar el estudio de las especies para cuantificación e identificación de los compuestos separados para *H. integrifolium* y *F. brasiliensis*, empleando las técnicas analíticas como HPLC y RMN,

Estudiar las especies de briófitos seleccionadas para este trabajo de investigación en zonas que presenten alturas diferentes, lo cual implica diferencias en la radiación incidente y comparar los resultados que se obtengan en los diferentes lugares con el fin de establecer si existen variaciones en la acumulación de los compuestos UV sensibles por parte de dichas especies.

Realizar pruebas con diferentes mezclas de solventes con la finalidad de lograr la diferenciación e identificación de todos los compuestos obtenidos mediante las diferentes extracciones realizadas a las especies seleccionadas para el presente trabajo de investigación.

Realizar investigaciones como la presente empleando diversas especies de briófitos propias de la región del Páramo de los Andes Venezolanos, para determinar cuáles especies presentan mayor acumulación de compuestos sensibles a la radiación UV.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Allen D.J., Nogués S. y Baker N.R. (1998) Ozone depletion and increased UV-B radiation: is there a real threat to photosynthesis? J. Exp. Bot. 328. 49, 1775-1788pp.

Arróniz M., Nuñez E. y Martínez J. (2008) Hydroxycinnamic acid derivatives in aquatic liverwort as possible bioindicators of enhanced UV radiation. Environmental pollution , vol 151. 1, 8-16pp.

Azócar A. y Monasterio M. (1979) Variabilidad ambiental en el Páramo de Mucubají. (Ed Ediciones CIET-IVIC/MAB-UNESCO. Caracas). pp.149-159.

Barreno E., y Pérez-Ortega S. (2003) Líquenes de la reserva natural integral de Muniellos, Asturias. (Ed.KRK). pp. 84-85.

Buffoni R., Bornman J. y OlofBjörn L. (2002) UV-induced changes in pigment content and light penetration in the fruticose lichen *Cladoniaarbusculasp. Mitis*. Journal of photochemistry and photobiology B: biology 66. 13-20pp.

Collignon L.N., Normand C. B. (2010) Photobiology: principles, applications and effects. Nova Science Publishers, Inc. (Chapter 7) 159- 178pp.

Córdova V. (1975) Fisiología de las sustancias liquénicas. Ed. Alhambra. España. (capítulo 1) 1- 43pp.

Culberson C.F., Kristinsson H.(1969) A standardized method for the identification of lichens products. Journal of chromatography, vol 4471. 85-93pp.

Edreva A. (2005) The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. agriculture, ecosystems and environments, vol.106, pp. 135- 146.

Fabón G., Martínez J., Tomás R. y Nuñez E. (2010) Effects of enhanced UV-B radiation on hydroxycinnamic acid derivatives extracted from different cell compartments in aquatic liverwort *Jungermannia exsertifolia* subsp. *Cordifolia*. *Physiologia Plantarum* 140, pp. 269–279.

García Plé C., Ferrá J.L., Ferriol A., Martínez C. y Morey M. (1989-1990) Relación entre el índice de esclerofilia y el contenido de clorofila total por unidad de peso seco en algunas especies arbustivas de Encinar en Mallorca. *Boll. Soc. Rist. Nat. Balears*, vol.33, pp. 237-251.

Giacobone G. (2009) Monitoreo de líquenes como bioindicadores de contaminación. Por Buenos Aires Ciudad. [http://books.google.com/books?id=fsL2CIALuIC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/books?id=fsL2CIALuIC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false) (consultado el 10 de Octubre de 2011)

Gignac L. (2001) New frontiers in bryology and lichenology. Bryophytes as indicators of climate change. *The Bryologist* 104, 410-420.

Graf K. (1996) Algunos apuntes sobre el paleoclima en los Andes venezolanos hace 13.000 años. *Plantula* 1, pp.95-106.

Hawksworth D., Iturriaga T. y Crespo A. (2005) Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos *Rev. Iberoam. Micol.* 22, pp. 71-82.

Marcano V (1994) Introducción al estudio de los líquenes y su clasificación. Colección flora líquénica de los Andes. Vol 1. Ed. del Museo de Ciencia, Tecnología, Artes y Oficios. Mérida - Venezuela. (Capítulo 6).

Marcano V., Rodríguez-Alcocer V. y Morales A. (1999) Occurrence of usnic acid in *Usnea laevis* Nylander (lichenized ascomycetes) from the Venezuelan Andes. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 66, pp. 343-346.

Marcano V., Balza A., Pérez R., Rojas J., Diaz R. y Palacios E. (2010). Synthesis of secondary compounds as a uv-screening strategy of lichenized fungi from the tropical andes and its possible role on the early earth. *Ernstia*, vol. 20, 1.

Núñez E., Otero S., Tomás R. y Martínez-Abaigar R. (2009) Seasonal variations in UV-absorbing compounds and physiological characteristics in the aquatic liverwort *Jungermannia exsertifolia* subsp. *Cordifolia* over a 3-year period. *Physiologia Plantarum*. 136, pp.73-85.

Núñez E., Martínez J., Tomás R., Betancourt N., y Arróniz M. (2004) Briófitos de ríos y bioindicación del cambio climático, una experiencia en la rioja, *Zubía* 22, pp.165-185.

Pernia J. y Fórnes J, (2008). Cambio climático y aguas subterráneas, Instituto Geológico y Minero de España, Madrid.  
[http://books.google.co.ve/books?id=9HXcZLzgXr4C&pg=PR4&dq=cambio+climatic+o+y+aguas+subterranneas+pernia+2008&hl=es&sa=X&ei=gr8eT\\_bUFenV0QHwnb\\_wH&ved=0CDIQ6AEwAQ#v=onepage&q=cambio%20climatico%20y%20aguas%20subterranneas%20pernia%202008&f=false](http://books.google.co.ve/books?id=9HXcZLzgXr4C&pg=PR4&dq=cambio+climatic+o+y+aguas+subterranneas+pernia+2008&hl=es&sa=X&ei=gr8eT_bUFenV0QHwnb_wH&ved=0CDIQ6AEwAQ#v=onepage&q=cambio%20climatico%20y%20aguas%20subterranneas%20pernia%202008&f=false) (consultado el 10 de Octubre de 2011)

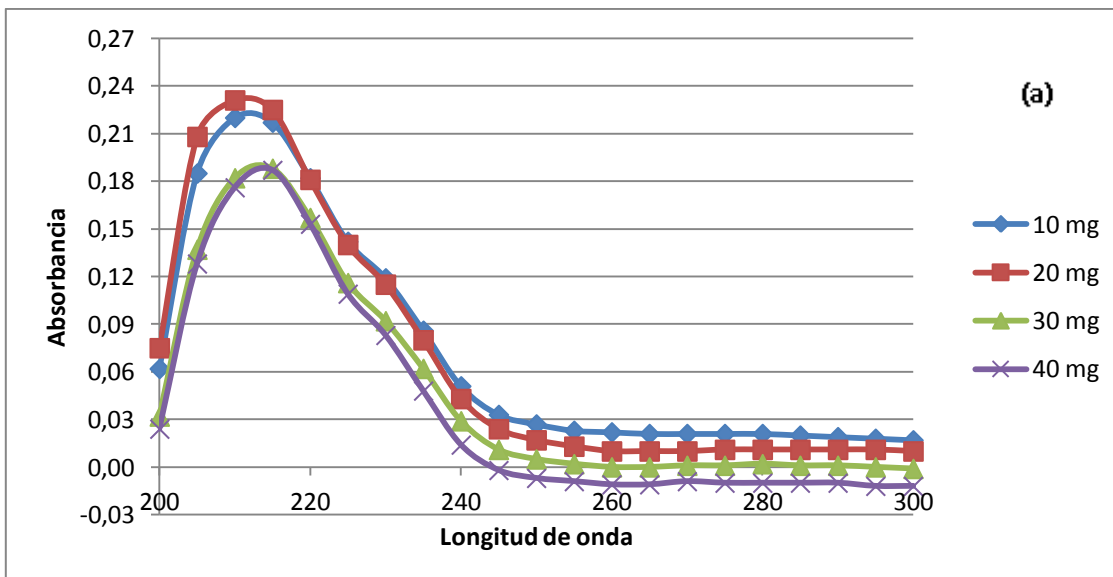
Rozema, J., Björn L.O., Bornman J.F., Gaberšček A., Häder D-P., Trost T., Germ M., Klisch M., Gröniger A., Sinha R.P., Lebert M., He Y-Y., Buffoni-Hall, de Bakker N.V.J., van de Staaij J., Meijkamp B.B. (2002) The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems- an experimental and functional analysis of evolution of UV- absorbing compounds. *Journal of photochemistry and photobiology B: biology* 66. 2-12 pp.

Zoltan T., Slack N. y Stark L. (2010) *Bryophyte ecology and climate change*. Cambridge University Press.  
[http://books.google.co.ve/books?id=rHE2KmGdwLEC&printsec=frontcover&dq=Zoltan+bryophyte+ecology+and+climate+change&hl=es&sa=X&ei=j8EeT7DACKff0Q\\_Goz40H&ved=0CDEQ6AE\\_wAA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.co.ve/books?id=rHE2KmGdwLEC&printsec=frontcover&dq=Zoltan+bryophyte+ecology+and+climate+change&hl=es&sa=X&ei=j8EeT7DACKff0Q_Goz40H&ved=0CDEQ6AE_wAA#v=onepage&q&f=false) (consultado el 11 de octubre de 2011)

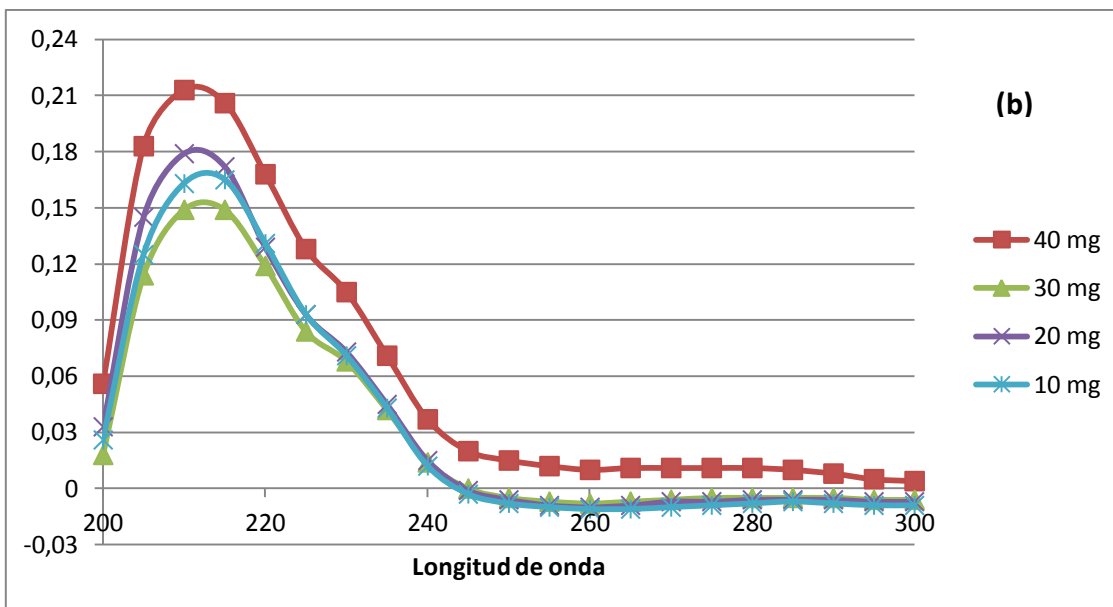


## Apéndice 1. Gráficas de absorbancia

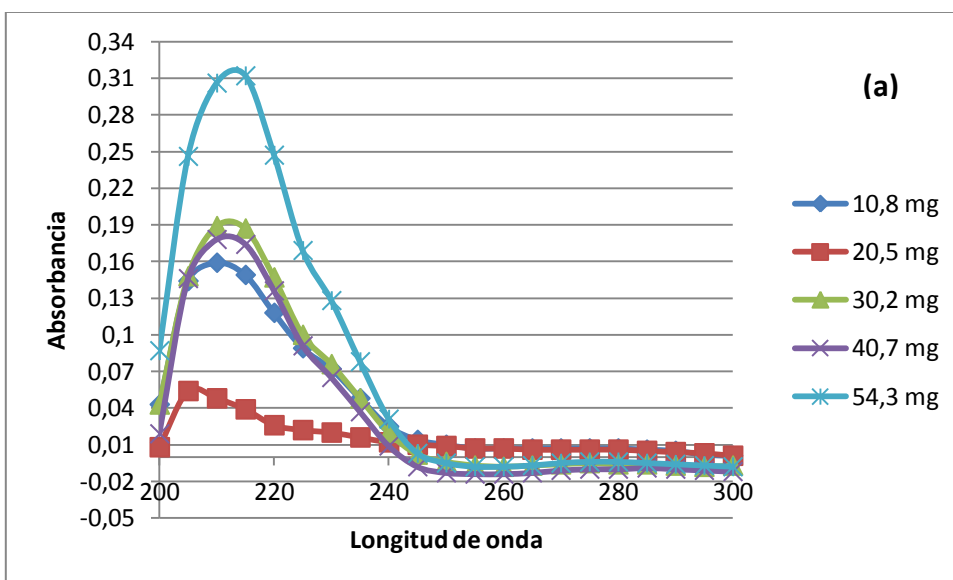
Anexo 1. Resultados obtenidos en la determinación de absorbancia para los compuestos separados mediante CCF, en muestras de *H. integrifolium* que crecen en las áreas de estudio. (a) área soleada (b) área de sombra.

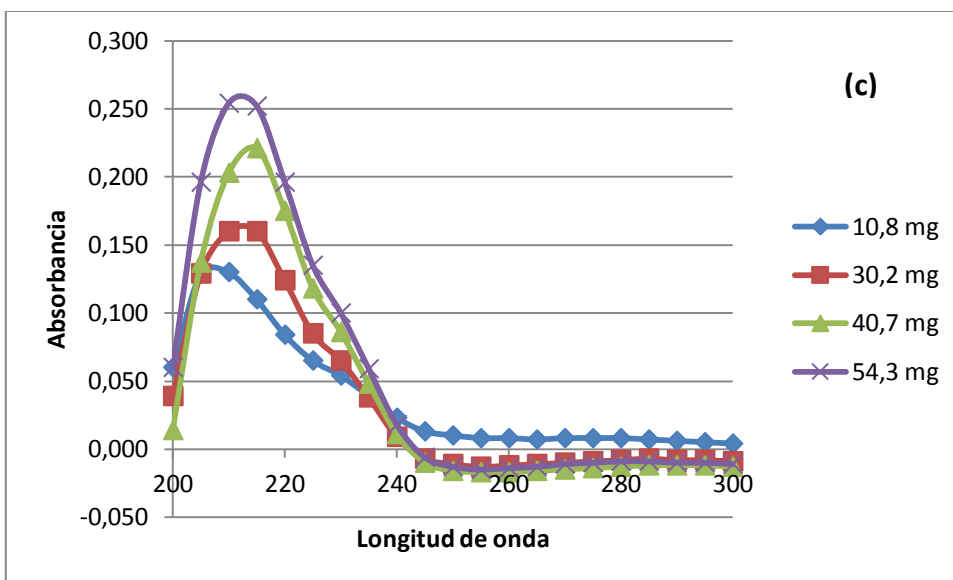
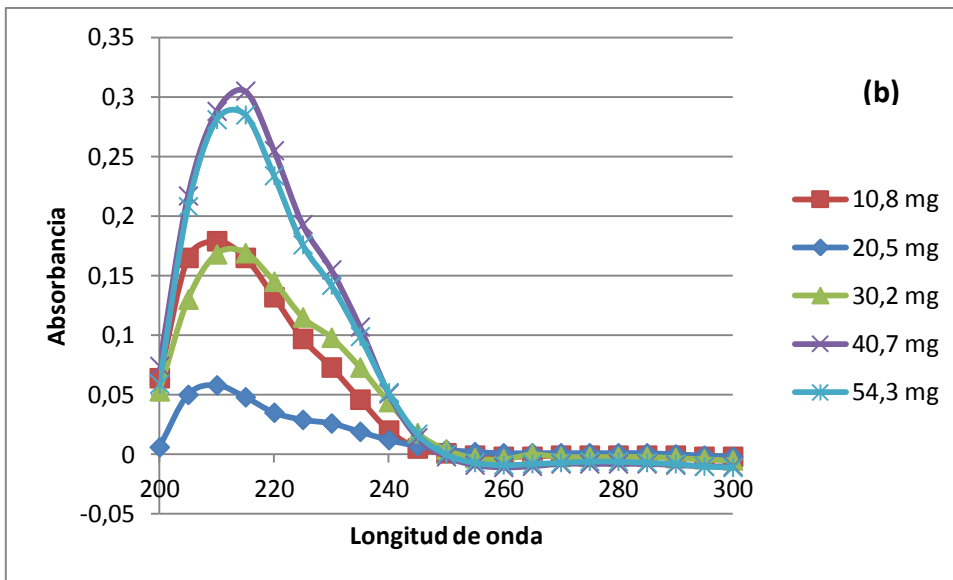


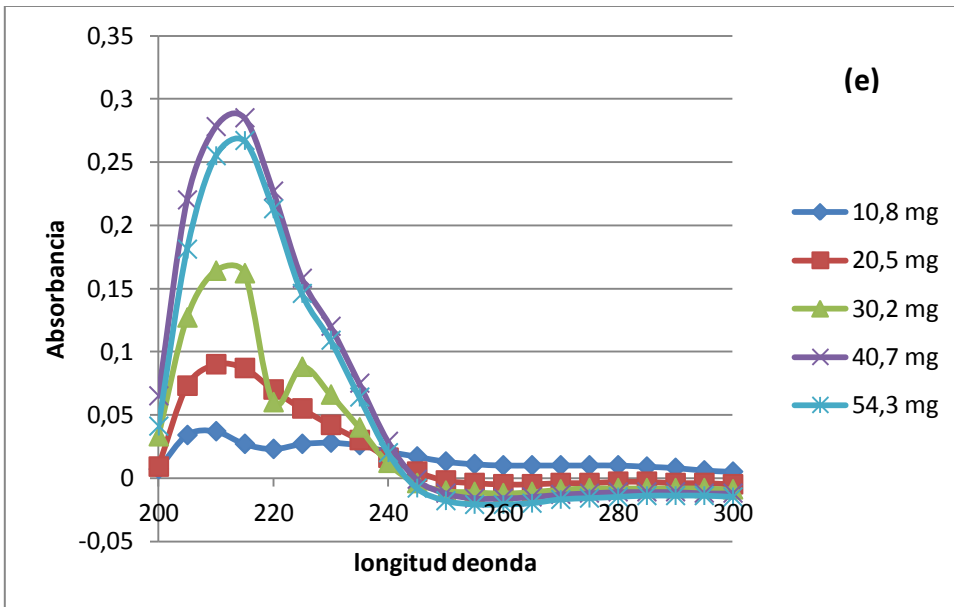
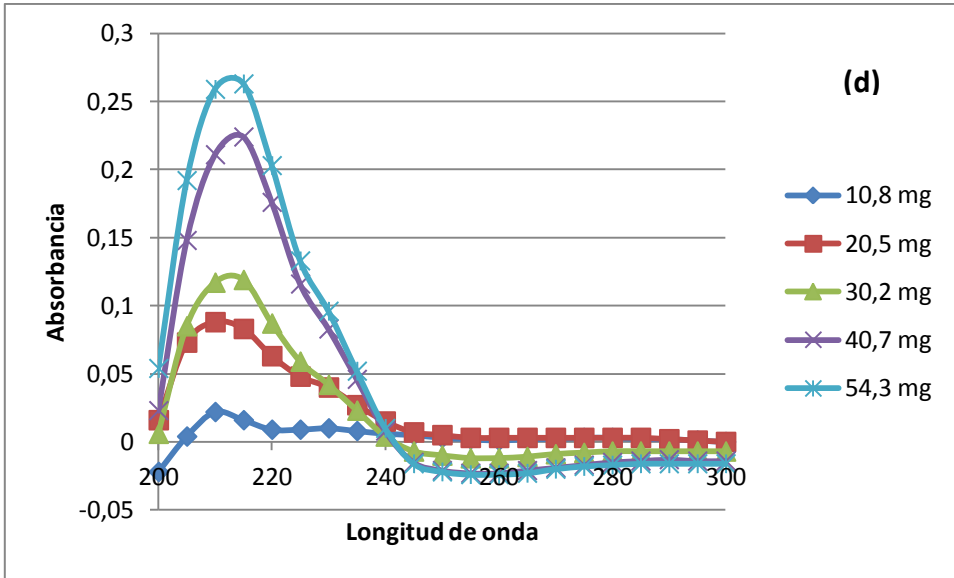




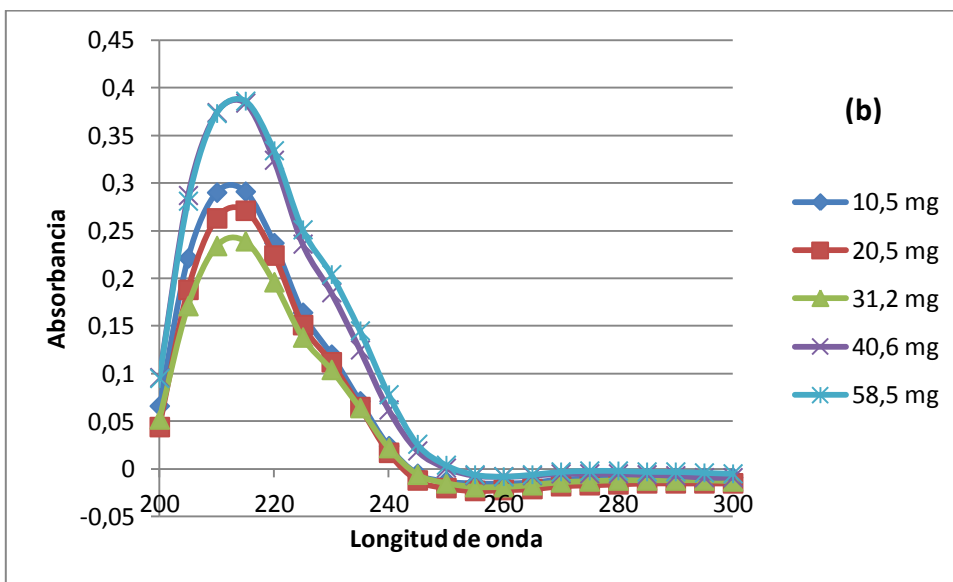
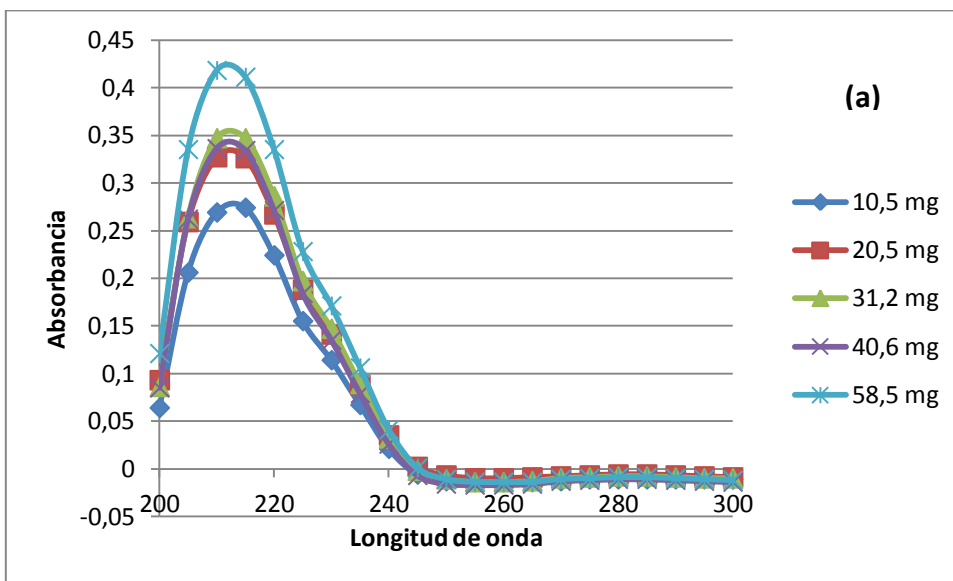
Anexo 2.1 Absorbancia determinada para los compuestos separados mediante CCF a los extractos E1 (pared celular) de la especie *F. brasiliensis* recolectada en el área soleada (a) compuesto A. (b) compuesto B. (c) compuesto C. (d) compuesto D. (e) compuesto E.

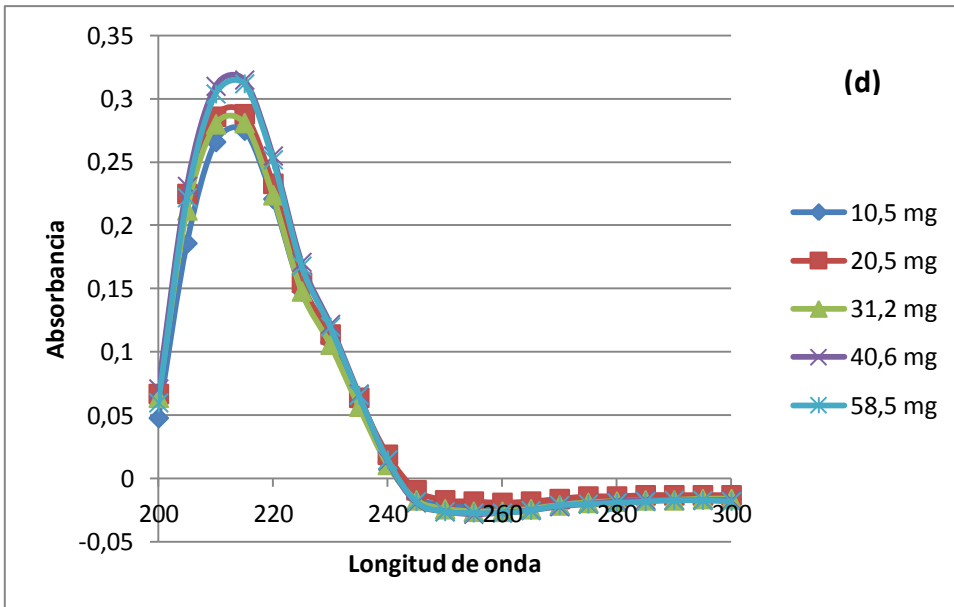
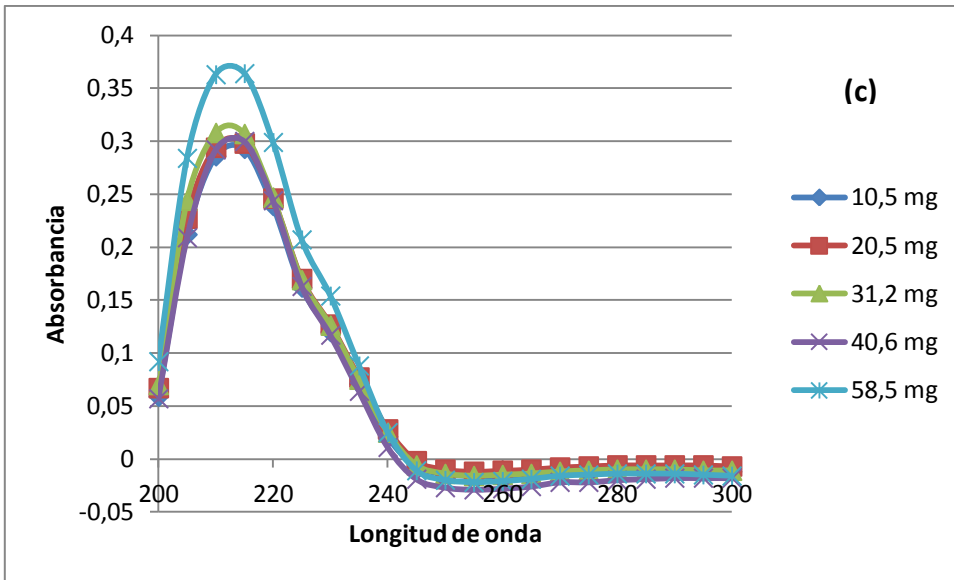


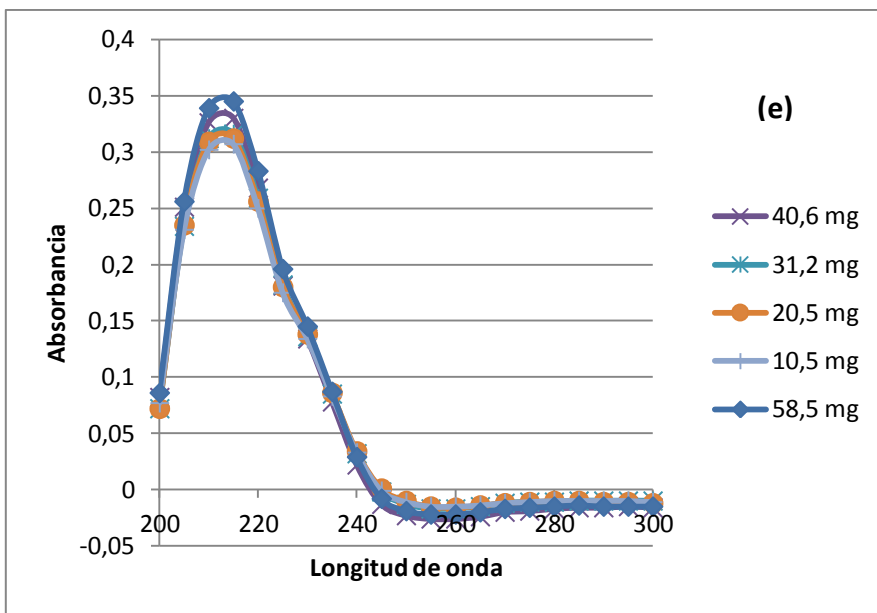




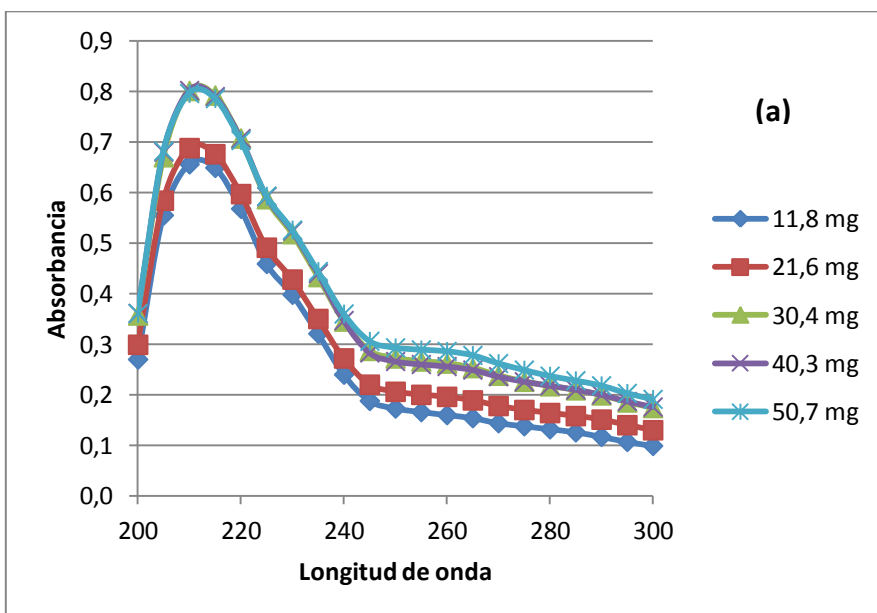
Anexo 2.2 Absorbancia determinada para los compuestos separados mediante CCF a los extractos E1 (pared celular) de la especie *F. brasiliensis* recolectada en el área de sombra (a) compuesto A. (b) compuesto B. (c) compuesto C. (d) compuesto D. (e) compuesto E.

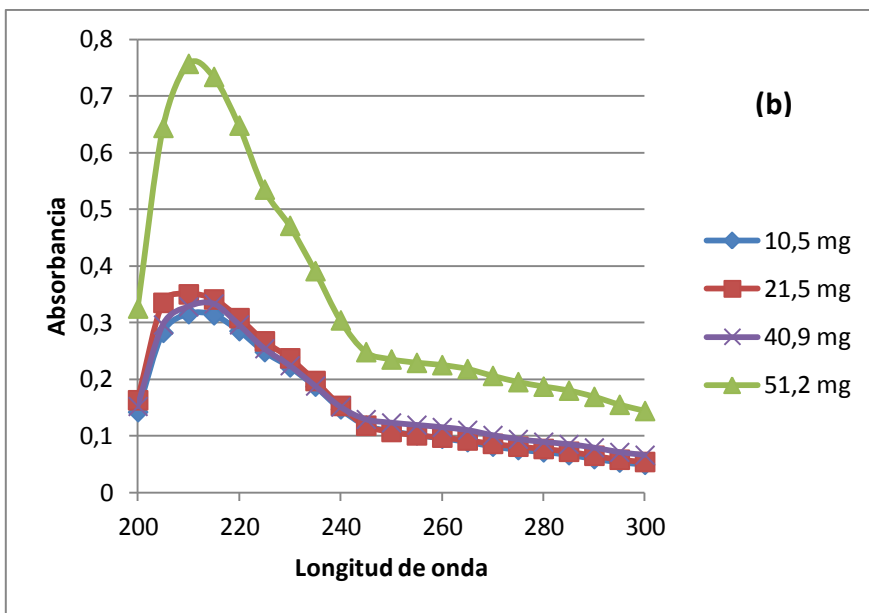




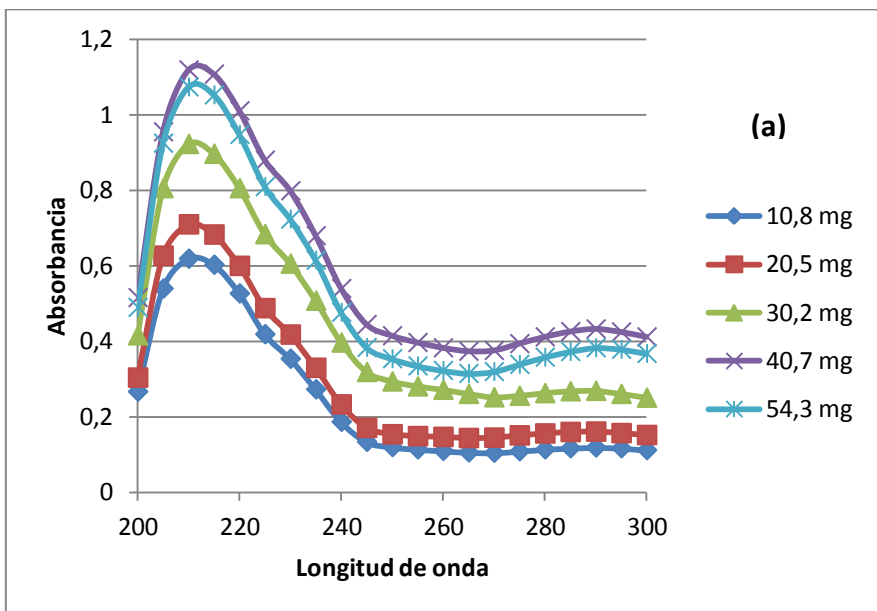


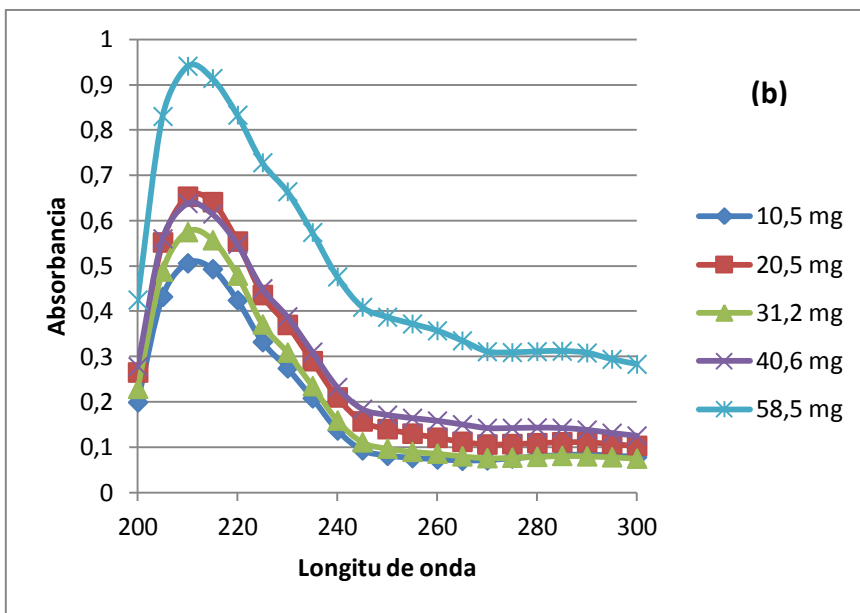
Anexo 3.1 Resultados obtenidos en la determinación de absorbancia para los compuestos extraídos de las vacuolas celulares de *H. integrifolium* que crecen en (a) área soleada (b) área de sombra





Anexo 3.2 Resultados obtenidos en la determinación de absorbancia para los compuestos extraídos de las vacuolas celulares de *F. brasiliensis* que crecen en (a) área soleada (b) área de sombra





Anexo 4 Resultados obtenidos en la determinación de absorbancia para los compuestos extraídos de los tejidos de la especie *U. laevis*.

