

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Búsqueda de antioxidantes y/o fotoprotectores en un hongo liquenizado del páramo de Sumapaz, Colombia, como posibles agentes preventivos de cáncer de piel**

**LEIDI YENIFER NOMELIN BALLEEN**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá D.C, Colombia

2020



# **Búsqueda de antioxidantes y/o fotoprotectores en un hongo liquenizado del páramo de Sumapaz, Colombia, como posibles agentes preventivos de cáncer de piel**

**LEIDI YENIFER NOMELIN BALLEEN**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magíster en Ciencias Química**

Director:

PhD. José Leopoldo Rojas Araque  
Profesor Asociado  
Departamento de Química

Codirectora:

PhD. Norma Angélica Valencia Islas  
Profesora Titular  
Departamento de Farmacia

Grupos de Investigación:

Grupo de Investigación en Estudios Biológicos y Físicoquímicos de Líquenes  
Colombianos

Grupo de Investigación en Química Medicinal (GRIQUIMED)

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Bogotá D.C, Colombia  
2020



*La ciencia es bella y es por esa belleza que debemos trabajar en ella, así quizás, en algún punto del tiempo, un descubrimiento científico, pueda llegar a beneficiar a toda la humanidad.*

*Marie Curie*



## **Agradecimientos**

La presente investigación se realizó bajo la supervisión de los docentes Doctor José Rojas, profesor del Departamento de Química y la Doctora Norma Valencia, profesora del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia a quienes agradezco el haberme aceptado en sus grupos de investigación. Además, por su excelente dirección y codirección, su gran ejemplo como profesional y sus enseñanzas académicas y personales. A ellos les expreso mis más profundos agradecimientos, por hacer posible la realización de mi tesis de maestría, agradeciendo su paciencia, tiempo y dedicación para que esto saliera de manera exitosa. Gracias por su apoyo en uno de mis retos personales y profesionales.

Al Maestro en Ciencias Roberto Dávila, de la fundación Funbiocol por su amistad y guía en la recolección e identificación de las especies liquénicas.

A la candidata a Doctorado Lissy Marcella Núñez Arango por su apoyo, asesoría y facilidades proporcionadas para la realización de los diferentes ensayos de actividad biológica y a mis compañeros del Laboratorio 302 del Departamento de Farmacia de la UN por su ayuda y apoyo en tan diversos ámbitos académicos y personales.

A los miembros del jurado por sus observaciones y sus valiosos aportes académicos.

A toda mi familia y allegados por ser el apoyo y estímulo de esta travesía para cumplir mis sueños.

A los Maestros de Licenciatura de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas por su amistad y apoyo incondicional y finalmente, de manera muy importante a la Universidad Nacional de Colombia por todo lo que ha aportado a mi vida profesional y personal.



## Resumen

La radiación ultravioleta constituye uno de los principales factores causantes de cáncer de piel asociado a la generación de estrés oxidativo en dicho órgano. Por ello, sustancias con propiedades antioxidantes y/o fotoprotectoras, se usan para su prevención ya que, por un lado, disminuyen el estrés oxidativo y por otro lado evitan la incidencia de dicha radiación. Pese al uso de fotoprotectores tradicionales, el cáncer de piel sigue en continuo crecimiento, lo cual hace necesaria la búsqueda de entidades moleculares novedosas con propiedades duales (antioxidantes y fotoprotectoras) que resulten potencialmente más eficaces. *Everniastrum cirrhatum* (Fr.) Hale (Parmeliaceae) un hongo liquenizado del páramo de Sumapaz, fue sometido a estudio para aislar sus constituyentes químicos y determinar su actividad biológica con la finalidad de encontrar dichos agentes. A partir de su extracto acetónico, se aislaron e identificaron a los compuestos: ácido salazínico (1), pseudocifelarina A (2), ácido atrárico (3), atranorina (4) y el ácido úsnico (5), de los cuales 2 y 5 son reportados por primera vez para la especie. La actividad antioxidante se determinó *in-vitro* evaluando su poder captador de radicales libres (DPPH•), su poder reductor férrico y su poder para inhibir la peroxidación lipídica, mientras que su capacidad fotoprotectora se evaluó *in-vitro* frente a la radiación UVB y UVA. Adicionalmente, se calculó la lipofilia y permeabilidad preliminar de los compuestos, considerando que estos pueden ser empleados como ingredientes de formulaciones destinadas a la piel, órgano que posee una naturaleza lipofílica. Los compuestos 1, 4 y 5 resultaron ser agentes duales con propiedades antioxidantes que involucran la reducción férrica y la inhibición de la peroxidación lipídica, que además poseen capacidad fotoprotectora alta en contra de la radiación UVB y UVA. Adicionalmente, 2 resultó ser un agente fotoprotector con “muy alta” capacidad fotoprotectora frente a la radiación UVA. Dichos compuestos poseen características de permeabilidad adecuada para ser entregadas en el estrato córneo de la piel, por lo cual se podrían constituir en principios activos para el desarrollo de formulaciones destinadas a la prevención de padecimientos asociados a la radiación solar, entre ellos el cáncer de piel.

**Palabras clave:** Hongo liquenizado, estrés oxidativo, antioxidante, fotoprotector, cáncer de piel.

## Abstract

Ultraviolet radiation is one of the main causes of skin cancer associated with the generation of oxidative stress. Therefore, substances with antioxidant and / or photoprotective properties are used for its prevention, since on the one hand, they reduce oxidative stress and on the other hand they avoid the incidence of said radiation. Despite the use of traditional photoprotectors, skin cancer continues to grow, which makes it necessary to search for novel molecular entities with dual properties (antioxidant and photoprotective) that are potentially more effective. *Everniastrum cirrhatum* (Fr.) Hale (Parmeliaceae) a lichenized fungus from Sumapaz páramo, was subjected to study to isolate its chemical constituents and determine its biological activity in order to find said agents. From its acetonetic extract, were isolated and identified: salazinic acid (1), pseudocifelarín A (2), atraric acid (3), atranorin (4) and usnic acid (5). Compounds 2 and 5 are reported here for the first time for the species. Their antioxidant activity was determined *in-vitro* by evaluating their free radical scavenging power (DPPH•), their iron-reducing power and their power to inhibit lipid peroxidation, while their photoprotective capacity was evaluated *in-vitro* against UVB and UVA radiation. Additionally, the lipophilicity and preliminary permeability of these compounds were calculated, considering they can be used as ingredients of formulations intended for the skin, which in turn is an organ that has a lipophilic nature. Compounds 1, 4 and 5 were dual agents with antioxidant properties that involved iron reduction and inhibition of lipid peroxidation, which also showed high photoprotective capacity against UVB and UVA radiations. Additionally, 2 was an agent with "very high" photoprotective capacity against UVA radiation. These compounds have adequate permeability to be delivered to the *stratum corneum* of the skin, therefore they could become active principles for the development of formulations aimed at the prevention of conditions associated with solar radiation, including skin cancer.

**Keywords:** Lichenized fungus, oxidative stress, antioxidant, photoprotective, skin cancer

# Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b> .....	V
<b>Lista de figuras</b> .....	X
<b>Lista de tablas</b> .....	XIII
<b>Lista de símbolos y abreviaturas</b> .....	XV
<b>Planteamiento del problema y justificación</b> .....	1
<b>1. Objetivos</b> .....	<b>5</b>
1.1 General.....	5
1.2 Específicos.....	5
<b>2. Marco teórico y estado del arte</b> .....	<b>6</b>
2.1 La piel.....	6
2.2 Cáncer de piel.....	7
2.2.1 Tipos de cáncer de piel.....	7
2.2.2 Cáncer de piel en Colombia.....	8
2.3 Efecto de la exposición a la radiación UV en la piel humana.....	10
2.3.1 Papel de los antioxidantes en la prevención y tratamiento del cáncer de piel.....	13
2.3.2 Protectores solares como agentes preventivos de cáncer de piel.....	14
2.4 Hongos liquenizados.....	20
2.4.1 Hongos liquenizados en Colombia.....	23
2.4.2 Usos tradicionales.....	24
2.4.3 Metabolitos secundarios de los hongos liquenizados y sus propiedades biológicas.....	25
2.4.4 Actividad antioxidante y fotoprotectora de liquenoquímicos.....	29
2.5 <i>Everniastrum cirrhatum</i> .....	38
2.5.1 Taxonomía.....	38
2.5.2 Hábitat y distribución.....	39
2.5.3 Usos tradicionales y propiedades medicinales.....	40
2.5.4 Sustancias aisladas y reportadas.....	40
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>42</b>
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	<b>43</b>
4.1 Selección de la especie objeto de estudio.....	43
4.1.1 Recolección.....	43

4.1.2	Operaciones previas a la preparación de extractos .....	44
4.1.3	Extracción en pequeña escala.....	44
4.1.4	Evaluación preliminar de la actividad antioxidante.....	44
4.1.4.1	Cuantificación del poder captador de radicales libres .....	44
4.1.5	Evaluación preliminar de la actividad fotoprotectora .....	44
4.1.5.1	Cuantificación de la actividad fotoprotectora frente a la radiación UVB a través del factor de protección solar (FPS) .....	44
4.2	Estudio químico de la especie objeto de estudio.....	44
4.2.1	Procedimientos generales experimentales .....	44
4.2.2	Confirmación de la identidad taxonómica de la especie objeto de estudio.....	46
4.2.3	Extracción a mayor escala del hongo liquenizado objeto de estudio .....	47
4.2.4	Fraccionamiento del extracto.....	47
4.2.5	Aislamiento y purificación de compuestos .....	48
4.2.5.1	Obtención de ácido salazínico (1) .....	49
4.2.5.2	Obtención de la pseudocifelarina A (2).....	51
4.2.5.3	Obtención del ácido atrárico (3).....	52
4.2.5.4	Obtención de la atranorina (4).....	53
4.2.5.5	Obtención de ácido úsnico (5).....	55
4.3	Estudio biológico.....	59
4.3.1	Procedimientos generales .....	59
4.3.2	Actividad Antioxidante .....	59
4.3.2.1	Poder captador de radicales libres DPPH• .....	59
4.3.2.2	Reactividad de los compuestos aislados como agentes captadores de radicales libres.....	61
4.3.2.3	Inhibición de la peroxidación lipídica .....	63
4.3.2.4	Poder reductor férrico.....	65
4.3.3	Actividad Fotoprotectora.....	66
4.3.3.1	Determinación del efecto fotoprotector <i>in vitro</i> frente a la radiación UVB a partir del factor de protección solar (FPS) <i>in vitro</i> .....	66
4.3.3.2	Determinación del efecto fotoprotector frente a la radiación UVA a partir de la longitud de onda crítica ( $\lambda_{crit.}$ ) .....	68
4.3.3.3	Determinación del efecto fotoprotector frente a la radiación UVA y UVB a partir del Factor UVA/UVB (UV-r*) .....	69
4.3.4	Determinación preliminar del carácter lipofílico y la posible permeabilidad dérmica de los compuestos aislados mediante el cálculo del coeficiente de reparto (P) y la energía libre de Gibbs de transferencia .....	69
4.4	Análisis estadístico .....	71
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>72</b>
5.1	Selección de la especie <i>Everniastrum cirrhatum</i> (Fr.) Hale ex Sipman .....	72
5.2	Estudio químico del hongo liquenizado <i>Everniastrum cirrhatum</i> .....	72
5.2.1	Aislamiento de las sustancias liquénicas.....	72
5.2.2	Caracterización estructural de los compuestos aislados.....	75
5.2.2.1	Ácido salazínico (1).....	75
5.2.2.2	Pseudocifelarina A (2).....	78
5.2.2.3	Ácido atrárico (3).....	80
5.2.2.4	Atranorina (4) .....	81
5.2.2.5	Ácido úsnico (5) .....	83
5.3	Estudio de la actividad biológica del hongo liquenizado <i>Everniastrum cirrhatum</i> .....	86

5.3.1	Actividad antioxidante del extracto y liquenoquímicos de <i>E. cirrhatum</i> .....	86
5.3.1.1	Cuantificación del poder captador del radical libre DPPH* del extracto y compuestos aislados de <i>E. cirrhatum</i> .....	86
5.3.1.2	Determinación de la reactividad de los compuestos aislados como agentes captadores de radicales libres .....	89
5.3.1.3	Determinación del poder reductor férrico o (PRF).....	91
5.3.1.4	Determinación del poder inhibidor de la peroxidación lipídica .....	93
5.3.2	Evaluación de la actividad fotoprotectora del extracto y compuestos aislados de <i>Everniastrum cirrhatum</i> .....	95
5.3.2.1	Determinación del factor de protección solar (FPS) <i>in vitro</i> .....	95
5.3.2.2	Determinación de la longitud de onda crítica ( $\lambda_{crit}$ ), como metodología en la cuantificación del efecto fotoprotector frente a la radiación UVA .....	98
5.3.2.3	Determinación de la relación UVA-r* como criterio para evaluar efecto fotoprotector frente a la radiación UVA y UVB.....	99
5.3.2.4	Estimación preliminar del carácter lipofílico y la posible permeabilidad dérmica de los compuestos aislados de <i>E. cirrhatum</i> .....	101
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>Recomendaciones</b> .....	<b>104</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	<b>105</b>
<b>9.</b>	<b>Anexo: Espectros de los liquenoquímicos aislados del <i>Everniastrum cirrhatum</i></b>	<b>113</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 2 - 1.</b> Estructura de la piel (Winslow, 2008). .....	6
<b>Figura 2 - 2.</b> Prevalencia por cada 100000 habitantes del cáncer melanoma en Colombia (Fondo Colombiano de Enfermedades de alto Costo, 2017). .....	9
<b>Figura 2 - 3.</b> Radiación solar que alcanza la superficie de la Tierra, la penetración de la piel y sus efectos biológicos. (A) Porcentaje aproximado (%) de la radiación solar total que alcanza la superficie de la Tierra para diferentes regiones de longitud de onda. (B) Penetración en la piel de UVB y UVA. También se mencionan las principales consecuencias celulares (Solano, 2020). .....	10
<b>Figura 2 - 4.</b> Efectos de la radiación ultravioleta en la piel. Representación simplificada de los efectos de RUV (UVA y UVB) en queratinocitos epidérmicos, además la formación de especies oxígeno reactivas (Solano, 2020). .....	11
<b>Figura 2 - 5.</b> Estructura química de las bases nitrogenadas del ADN alteradas por efecto de la radiación UV (Dunaway, et al., 2018). .....	12
<b>Figura 2 - 6.</b> a) Proceso de formación de un hongo liquenizado. b) Sección transversal del cuerpo vegetativo (Lara - Carrio, 2015). .....	21
<b>Figura 2 - 7.</b> Tipos de talos. A: escamoso; B-D-K-J: fruticoso; E-G: foliosos; F-H: crustáceos y C: compuestos (Aguirre, 2006). .....	22
<b>Figura 2 - 8.</b> Ruta sintética de los policétidos (Calcott, et al., 2018). .....	26
<b>Figura 2 - 9.</b> Estructuras típicas de los metabolitos secundarios de hongos liquenizados (Wolfgang , et al., 2011). .....	29
<b>Figura 2 -10.</b> <i>Everniastrum cirrhatum</i> (André , 2007). .....	38
<b>Figura 2 - 11.</b> Ubicación Geográfica del <i>Everniastrum cirrhatum</i> (EOL, 2015; GBIF, 2013). En color amarillo y anaranjado, se indica su ubicación. ....	39
<b>Figura 4 - 1<sup>a</sup>.</b> Aislamiento y purificación de compuestos de <i>E. cirrhatum</i> . .....	48
<b>Figura 4 - 2<sup>a</sup>.</b> Aislamiento y purificación de compuestos de <i>E. cirrhatum</i> . .....	49
<b>Figura 4 - 3.</b> Representación de la reacción general entre el radical libre DPPH• y un antioxidante. ....	60
<b>Figura 4 - 4.</b> Reacciones generales del radical libre DPPH• con un antioxidante y un radical libre. ....	62
<b>Figura 4 - 5.</b> Reacciones asociadas al proceso de peroxidación lipídica (a, b y c) y cuantificación de hidroperóxidos (LOOH) formados (d y e). ....	64
<b>Figura 5 - 1.</b> Estructura química del ácido salazínico (1) .....	77
<b>Figura 5 - 2.</b> Estructura química de la pseudociferalina A (2) .....	79
<b>Figura 5 - 3.</b> Estructura química del ácido atrárico (3) .....	80
<b>Figura 5 - 4.</b> Estructura química de la atranorina (4) .....	82
<b>Figura 5 - 5.</b> Estructura química del ácido úsnico (5) .....	84
<b>Figura 5 - 6.</b> Poder reductor férrico del extracto acetónico, compuestos aislados del de <i>E. cirrhatum</i> y patrones. Extracto acetónico (E), ácido salazínico (1), pseudociferalina A (2), ácido atrárico (3), atranorina (4), ácido úsnico (5) y butirato de hidroxitolueno (BHT). ....	92

<b>Figura 5 - 7.</b> Poder inhibitor de la peroxidación lipídica del extracto y sustancias aisladas de <i>E. cirrhatum</i> . Extracto acetónico (E), ácido salazínico (1), pseudocifelarina A (2), ácido atrárico (3), atranorina (4), ácido gálico (AG) y butirato de hidroxitolueno (BHT). ....	94
<b>Figura 5 - 8.</b> Poder fotoprotector en contra de la radiación UVB del extracto acetónico y compuestos aislados de <i>E. cirrhatum</i> . Extracto acetónico (E), ácido salazínico (1), pseudocifelarina A (2), ácido atrárico (3), atranorina (4), ácido úsnico (5), ácido 2-fenil-5-bencimidazol-sulfónico (AFBS), Tinosorb S (Tin. S) y Avobenzona (AVO). ....	97
<b>Figura 5 - 9.</b> Comparación de las estructuras de los compuestos 2 y 4 aislados de <i>Everniastrum cirrhatum</i> . ....	98
<b>Figura 9 - 1.</b> Espectro de infrarrojo (KBr) ácido salazínico (1).....	113
<b>Figura 9 - 2.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H (400 MHz, DMSO d <sub>6</sub> ) del ácido salazínico (1). ....	114
<b>Figura 9 - 3.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C (101 MHz, DMSO d <sub>6</sub> ) del ácido salazínico (1).....	115
<b>Figura 9 - 4.</b> Espectro HMBC ( <sup>1</sup> H a 400 MHz y <sup>13</sup> C a 101 MHz DMSO d <sub>6</sub> ) del ácido salazínico (1).....	116
<b>Figura 9 - 5.</b> Espectro de infrarrojo (KBr) de pseudocifelarina A (2).....	117
<b>Figura 9 - 6.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H (400 MHz, CHCl <sub>3</sub> ) de la pseudocifelarina A (2).....	118
<b>Figura 9 - 7.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C (101 MHz, CHCl <sub>3</sub> ) de la pseudocifelarina A (2).....	119
<b>Figura 9 - 8.</b> Espectro HMBC ( <sup>1</sup> H a 400 MHz y <sup>13</sup> C a 101 MHz CDCl <sub>3</sub> d <sub>6</sub> ) de la pseudocifelarina A (2), para los hidrógenos (H-10 y H-10').....	120
<b>Figura 9 - 9.</b> Espectro HMBC ( <sup>1</sup> H a 400 MHz y <sup>13</sup> C a 101 MHz CDCl <sub>3</sub> d <sub>6</sub> ) de la pseudocifelarina A (2), para las correlaciones de los hidrógenos (H-4,H-2, H-2', H-9 y H-8').....	121
<b>Figura 9 - 10</b> Espectro de infrarrojo (KBr) de ácido atrárico (3).....	122
<b>Figura 9 - 11.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) del ácido atrárico (3). ....	123
<b>Figura 9 - 12.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C (101 MHz, CHCl <sub>3</sub> ) del ácido atrárico (3). ....	124
<b>Figura 9 - 13.</b> Espectro HMBC ( <sup>1</sup> H a 400 MHz y <sup>13</sup> C a 101 MHz CDCl <sub>3</sub> d <sub>6</sub> ) del ácido atrárico (3).....	125
<b>Figura 9 - 14</b> Espectro de infrarrojo (KBr) de atranorina (4).....	126
<b>Figura 9 - 15.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H (400 MHz, CHCl <sub>3</sub> ) de la atranorina (4).....	127
<b>Figura 9 - 16.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C (101 MHz, CHCl <sub>3</sub> ) de la atranorina (4).....	128
<b>Figura 9 - 17.</b> Espectro HMBC ( <sup>1</sup> H a 400 MHz y <sup>13</sup> C a 101 MHz CDCl <sub>3</sub> d <sub>6</sub> ) de la atranorina (4).....	129
<b>Figura 9 - 18.</b> Espectro HMBC ( <sup>1</sup> H a 400 MHz y <sup>13</sup> C a 101 MHz CDCl <sub>3</sub> d <sub>6</sub> ) de la atranorina (4), para las correlaciones de los hidrógenos (H-8' y H9').....	130
<b>Figura 9 - 19</b> Espectro de infrarrojo (KBr) del ácido úsnico (5).....	131

<b>Figura 9 - 20.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) del ácido úsnico (5).....	132
<b>Figura 9 - 21.</b> Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ (101 MHz, $\text{CHCl}_3$ ) del ácido úsnico (5).....	133
<b>Figura 9 - 22.</b> Espectro HMBC ( $^1\text{H}$ a 400 MHz y $^{13}\text{C}$ a 101 MHz $\text{CDCl}_3$ $d_6$ ) del ácido úsnico (5).....	134

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 2- 1.</b> Filtros UV orgánicos e inorgánicos actualmente aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos para uso y venta libre. ....	15
<b>Tabla 2 - 2.</b> Sustancias liquénicas con capacidad antioxidante. ....	29
<b>Tabla 2 - 3.</b> Sustancias liquénicas con capacidad fotoprotectora. ....	34
<b>Tabla 2 - 4.</b> Metabolitos secundarios reportados para la especie <i>Everniastrum cirrhatum</i> . ....	40
<b>Tabla 4 - 1.</b> Datos de recolección del material liquénico objeto de estudio. ....	43
<b>Tabla 4 -2.</b> Sistemas de elución para cromatografía en capa delgada para liquenoquímicos. ....	45
<b>Tabla 4 - 3.</b> Reactivos de coloración para talo liquénico con fines de identificación taxonómica (Orange, et al., 2001). ....	46
<b>Tabla 4 - 4.</b> Características morfológicas y de coloración de talo de <i>Everniastrum cirrhatum</i> para confirmación de su identidad taxonómica. ....	47
<b>Tabla 4 - 5.</b> Fraccionamiento primario por partición líquido-líquido del extracto acetónico de <i>Everniastrum cirrhatum</i> . ....	48
<b>Tabla 4 - 6.</b> Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción primaria etérea (FII). ....	50
<b>Tabla 4 - 7.</b> Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción primaria de acetato de etilo (FIII). ....	51
<b>Tabla 4 - 8.</b> Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción FI. ....	52
<b>Tabla 4 - 9.</b> Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción primaria acetónica (FIV). ....	54
<b>Tabla 4 - 10.</b> Cromatografía en columna abierta sobre de gel de sílice de la fracción FIV-1. ....	54
<b>Tabla 4 - 11.</b> Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción FII-5. ....	55
<b>Tabla 4 - 12.</b> Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción FII-6. ....	55
<b>Tabla 4 - 13.</b> Cromatografía en columna abierta sobre de gel de sílice de la fracción FII-7. ....	56
<b>Tabla 4 - 14.</b> Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la reunión de fracciones FII-6-2 y FII-7-1. ....	57
<b>Tabla 4 - 15.</b> Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción FII-6-7-A. ....	58
<b>Tabla 4 - 16.</b> Filtros utilizados como patrones en los ensayos de actividad fotoprotectora ....	66
<b>Tabla 4 - 17.</b> Constantes normalizadas (Sayre, et al., 1979). ....	67
<b>Tabla 5 - 1.</b> Compuestos aislados del hongo liquenizado <i>Everniastrum cirrhatum</i> . ....	74
<b>Tabla 5 - 2.</b> Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido salazínico (1). ....	77

<b>Tabla 5 - 3.</b> Datos de Resonancia Magnética Nuclear para la pseudocifelarina ( <b>2</b> ).....	79
<b>Tabla 5 - 4.</b> Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido atrárico ( <b>3</b> ).....	80
<b>Tabla 5 - 5.</b> Datos de Resonancia Magnética Nuclear de la atranorina ( <b>4</b> ). ....	82
<b>Tabla 5 - 6.</b> Datos de Resonancia Magnética Nuclear para del ácido úsnico ( <b>5</b> ).....	85
<b>Tabla 5 - 7.</b> Poder captador de radicales libres (CE <sub>50</sub> ) del extracto acetónico de <i>E. cirrhatum</i> , compuestos aislados y patrones. ....	87
<b>Tabla 5 - 8.</b> Reactividad de los compuestos <b>1</b> a <b>5</b> , aislados de <i>E. cirrhatum</i> como agentes captadores de radicales libres (k <sub>2</sub> ; 25.0 ± 0.1 °C). ....	89
<b>Tabla 5 - 9.</b> Poder reductor férrico del extracto acetónico y compuestos aislados del <i>E. cirrhatum</i> .....	91
<b>Tabla 5 -10.</b> Poder inhibidor de la peroxidación lipídica del extracto acetónico y compuestos aislados de <i>Everniastrum cirrhatum</i> . ....	93
<b>Tabla 5 - 11.</b> Actividad fotoprotectora (FPS, λ <sub>crit</sub> . y UVA-r*) y permeabilidad dérmica (Log P y Δ <sub>r</sub> G) del extracto acetónico y compuestos aislados de <i>E. cirrhatum</i> .....	95

## Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
CaPiel	Cáncer de piel
RUV	Radiación ultravioleta
UV	Ultravioleta
RL	Radicales libres
EOR	Especies oxígeno reactivas
ENR	Especies nitrógeno reactivas
AVO	Avobenzona
Tin. S	Tinosorb S
AFBS	Ácido fenilbencilimidazolsulfónico
HL	Hongo liquenizado
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ds	Desviación estándar
AG	Ácido gálico
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
% IPAL	% de inhibición de peroxidación del ácido linoleico
PRF	Poder reductor férrico
FPS	Factor de protección solar
MED	Dosis eritematogena mínima
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
HMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<i>n</i> -hex	Hexano
tol	Tolueno
DCM	Diclorometano
AcOEt	Acetato de etilo
Me <sub>2</sub> CO	Acetona
MeOH	Metanol
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
EtOH	Etanol
AcOH	Ácido acético
HCOOH	Ácido fórmico
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa

## Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$k_{obs.}$	Constante de velocidad aparente	$s^{-1}$	Sección 4.3.2.2
$k_2$	Constante de velocidad de 2 <sup>do</sup> orden	$M^{-1}s^{-1}$	Sección 4.3.2.2

## Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$\lambda_{crit}$	Longitud de onda crítica	nm	Ecuación 4.9
R	Factor de correlación lineal	N.A.	
$\delta$	Desplazamiento químico	ppm	

## Planteamiento del problema y justificación

El componente ultravioleta (UVA y UVB) de la radiación solar causa efectos perjudiciales en la piel, entre ellos, envejecimiento prematuro y cáncer de piel (CaPiel) tanto melanoma como no melanoma (Ulrich, et al., 2007). Siendo así, que la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, la ha calificado como carcinogénica y causante principal de este cáncer (World Health Organization International Agency For Research On Cancer, 1992). Por ello, el uso de agentes fotoprotectores, que evitan la incidencia directa de la radiación UV en la piel constituyen una estrategia para su prevención (Rai, et al., 2012).

Una exposición constante a la radiación solar sin protección provoca que la piel alcance un estado de estrés oxidativo que daña al ADN celular, produciendo peroxidación de sus lípidos y proteínas (Antolovich, et al., 2002), provocando pérdida de elastina y colágeno (Zaw, et al., 2006). Por lo tanto, las sustancias antioxidantes que permitan contrarrestar el estrés oxidativo generado por la radiación UV o que favorezcan el aumento del umbral antioxidante del organismo, también pueden ser empleadas para la prevención de estos problemas dérmicos (Saewam, et al., 2013).

Los protectores solares comerciales están diseñados para prevenir las quemaduras solares debido a la radiación UVB con la idea de que ello evita el cáncer de piel (Rai, et al., 2012). Sin embargo, la radiación UVA, también causa daño oxidativo a este órgano, por lo que se hace necesaria la protección ante ambos tipos de radiación, siendo deseable contar con protectores solares duales que protejan a la piel de la radiación ultravioleta y que a su vez sean antioxidantes (Giraldo, et al., 2014).

El CaPiel es uno de los más comunes a nivel mundial detectándose ca. de 13 millones de casos anualmente y más de 60 mil muertes por su causa (De Martel, et al., 2012). En Colombia, ocupa el tercer lugar, con un aumento progresivo de la frecuencia de casos nuevos, siendo más frecuente en individuos mayores de 75 años. Entre los subtipos histológicos del CaPiel, predominan el carcinoma basocelular (52.7 %), el escamocelular (22.6 %) y el melanoma (16.1 %). La incidencia estimada del melanoma, que es el más

mortal, corresponde en Colombia a 4.6 por cada 100000 mujeres y 4.4 por cada 100000 hombres. Su importancia como prioridad en salud pública, se evidencia en su frecuencia relativa de aparición en los individuos en relación con otros tipos de cáncer como el de mama o de cuello uterino y que ocurre durante todas las etapas de la vida (Pozzobon, et al., 2018; ley 1384 de 2010). En el caso del CaPiel no melanoma, no se contemplan datos epidemiológicos actuales en las instituciones oficiales, dada su baja incidencia y bajas tasas de mortalidad. De cualquier modo, la Secretaria de Salud de Bogotá ha reportado 37342 nuevos casos de cáncer entre los años 2003 y 2010, donde el 17.5 % son de piel, siendo el más alto en las tasas de morbilidad (Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, 2014).

El aumento en las tasas de incidencia del CaPiel a pesar del uso de los protectores solares comerciales, manifiesta su ineficacia, resaltando la necesidad de contar con moléculas alternativas que pudieran presentar efecto dual antioxidante y fotoprotector. Algunos de los filtros que componen a los protectores solares, como la benzofenona-3, presentan el inconveniente de ser foto-inestables; otros como el ácido para-aminobenzoico generan alergias mientras que, en el caso de los protectores inorgánicos tipo óxido de zinc, generan cubiertas inconsistentes y el efecto antiestético “mimo” (Mejia - Giraldo, et al., 2014). Por su parte, los antioxidantes de naturaleza sintética como el butilhidroxitolueno (BHT), en la industria de los alimentos, cosméticos y medicamentos está siendo restringido dada su hepatotoxicidad y carcinogenicidad (Palm, et al., 2007). Por ello, la búsqueda de moléculas alternativas con efecto dual antioxidante y fotoprotector mejorados se encuentra justificada y en este sentido, los productos de origen natural se constituyen en alternativas para satisfacer esta necesidad en el supuesto de ser potencialmente más efectivos, estables, y biodegradables, además de presentar mayor aceptación por la población en comparación con los productos sintéticos (Mishra, et al., 2011; Pouillot, et al., 2011).

En esta búsqueda de compuestos de origen natural con propiedades antioxidantes y/o fotoprotectores, Colombia cuenta con una gran diversidad de especies de flora y fauna poco exploradas, además de que sus diferentes ecosistemas permiten adaptaciones extraordinarias a los organismos que los habitan, permitiéndoles la biosíntesis de sustancias con actividades biológicas únicas (Loizzo, et al., 2019). Un ejemplo de esto son los hongos liquenizados (HL), organismos únicos resultantes de la asociación simbiótica entre organismos fotobiontes como un alga verde y/o una cianobacteria y uno o más micobiontes que pueden ser un hongo y/o una levadura (Spribille, et al., 2016). Resultado

de dicha asociación, se genera un organismo único y diferente a los individuos que le dieron origen, capaz de prosperar en todo tipo de hábitats incluyendo aquellos sometidos a condiciones extremas de temperatura, humedad, desecación, salinidad, radiación UV intensa, contaminación, radiación cósmica (Raggio, et al., 2010), etc., donde otros organismos no podrían desarrollarse, forzándolos a biosintetizar metabolitos secundarios únicos con propiedades biológicas diversas (Ranković, 2015) que les permiten lograr su supervivencia. En este sentido se ha determinado que los HL que prosperan en ecosistemas de alta montaña sometidos a elevada radiación ultravioleta o bajo atmósferas altamente oxidantes ricas en ozono, biosintetizan sustancias fotoprotectoras y/o antioxidantes (Nguyen, et al., 2013; Rojas, et al., 2015; Fernández - Moriano, et al., 2015; Valencia - Islas, et al., 2007) constituyéndose en una fuente prometedora de las mismas.

Los estudios en Colombia sobre HL se han enfocado principalmente a su identificación taxonómica, permitiendo identificar cerca del 50 % de las especies potencialmente esperadas para el país a pesar de la pobre exploración llevada a la fecha. Se han estimado alrededor de 1674 especies de líquenes de las 20 mil descubiertas en el mundo, posicionando al país como uno de los de mayor riqueza en este recurso natural (Aguirre, 2006; Bernal, et al., 2016). Sin embargo, siguen siendo incipientes los estudios conducentes a determinar su potencialidad como fuente de moléculas bioactivas.

En estudios llevados a cabo en el Grupo de Investigación en Estudios Biológicos y Físicoquímicos de Líquenes Colombianos y en el Grupo de Investigación en Química Medicinal de la Universidad Nacional de Colombia, en donde se enmarca este trabajo, se ha confirmado que este recurso natural es una fuente muy prometedora de sustancias con propiedades antioxidantes y fotoprotectoras (Rojas, et al., 2015; Perico - Franco, et al., 2015a; Perico - Franco, et al., 2015b; Sánchez - Lira, et al., 2017; Leal, et al., 2018; Valencia - Islas, et al., 2007), entre otras.

Este trabajo se orientó en la búsqueda de sustancias antioxidantes y fotoprotectoras en el hongo liquenizado *Everniastrum cirrhatum* colectado en el páramo de Sumapaz, Colombia. Cabe mencionar que el páramo es un ecosistema de alta montaña (3500-4700 m s.n.m) restringido a la zona occidental de Suramérica con mayor porcentaje en Colombia, el cual posee diversidad biológica única, incluyendo hongos liquenizados en abundancia sometidos a una alta incidencia de radiación ultravioleta (Pinto - Zárate, et al., 2012). Por

consiguiente, se presume que estos organismos pudieran biosintetizar sustancias con dichas propiedades biológicas.

Adicionalmente, la especie seleccionada posee limitados estudios químicos y sus estudios biológicos se centran en el extracto, además fue escogida como especie de interés para este estudio, dada la actividad antioxidante y fotoprotectora que presentó su extracto en ensayos preliminares, respecto a otras especies potencialmente activas con las cuales fue evaluada (*Peltigera neopolydactyla* y *Sticta humboldtii*), mismas que se encuentran cohabitando en el páramo bajo condiciones ambientales similares.

# 1. Objetivos

## 1.1 General

Contribuir al conocimiento de los constituyentes químicos de un hongo liquenizado del páramo de Sumapaz, y establecer su capacidad antioxidante y fotoprotectora *in vitro* con la finalidad de obtener compuestos con dichas actividades que sean potencialmente útiles en la prevención del cáncer de piel.

## 1.2 Específicos

1. Seleccionar la especie objeto de estudio por medio del tamizaje de las especies *Everniastrum cirrhatum*, *Peltigera neopolydactyla* y *Sticta humboldtii* evaluando la actividad antioxidante y fotoprotectora de los extractos.
2. Aislar, purificar e identificar los compuestos mayoritarios de la especie seleccionada, con la finalidad de contribuir al conocimiento de sus constituyentes químicos.
3. Evaluar la actividad antioxidante y fotoprotectora *in vitro* de las sustancias aisladas.
4. Determinar de manera preliminar la lipofilia de las sustancias aisladas y su posible permeabilidad a fin de ser entregadas a nivel del estrato córneo de la piel.

## 2. Marco teórico y estado del arte

### 2.1 La piel

La piel es el órgano vivo más grande del cuerpo con gran capacidad de regenerarse, es impermeable, resistente y flexible, además respira y se mantiene activo las 24 horas del día, realizando todo tipo de acciones fundamentales para nuestro organismo. Dentro de sus principales funciones esta la defensa contra el medio, evitando traumatismos, fricciones e infecciones, pérdidas excesivas de agua, es aislante térmico y sintetiza vitamina D, entre otras (Meruane, et al., 2012). La piel está constituida por 3 capas (Figura 2-1): la epidermis, que es la capa más superficial, conformada por queratinocitos y melanocitos, además de una gran variedad de lípidos y proteínas. La dermis, capa intermedia, está conformada de fibroblastos productores de colágeno y elastina que le confieren las características estructurales, mientras que la hipodermis, capa más interna, consta de lípidos y tejido conectivo (Sordo, et al., 2013).

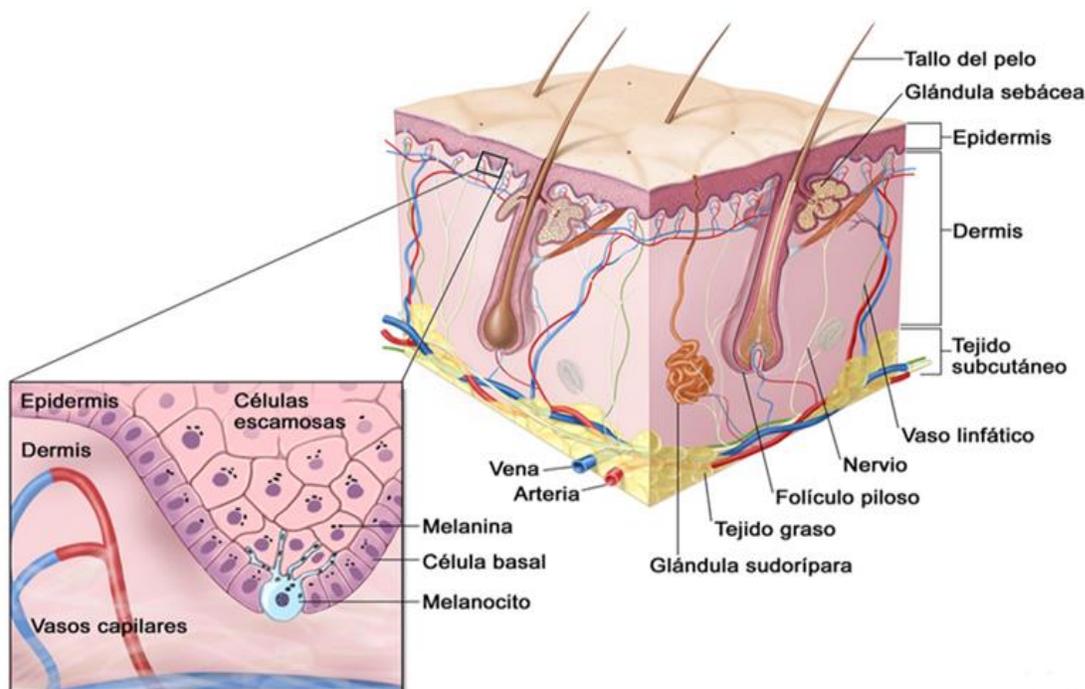


Figura 2 - 1. Estructura de la piel (Winsiow, 2008).

## 2.2 Cáncer de piel

El cáncer de piel (CaPiel) es una de las enfermedades más comunes en los seres humanos y una con las tasas de incidencia más altas en el mundo, considerándose una enfermedad de salud pública (Sánchez, et al., 2011). Múltiples factores se han asociado con su patogénesis entre ellos la edad, el sexo, el fototipo de la piel, la exposición solar, el estilo de vida, la ocupación, etc. Esta neoplasia se genera por progreso tumoral en diferentes células de la piel debido a procesos complejos que se caracterizan por el crecimiento incontrolado de las células cancerosas, la necrosis celular del tejido sano y la neovascularización del área afectada asociada al aporte de oxígeno y nutrientes al tumor (Esposito, et al., 2000).

Diversos estudios resaltan la incidencia del estrés oxidativo en el desarrollo tumoral, evidenciándose la estimulación en el crecimiento de las células musculares lisas y la neovascularización tumoral (Rogers, et al., 2010). Por otra parte, las células cancerosas generan especies reactivas resultado de la acción mitocondrial, la estimulación de oncogenes, metabolismo anormal y de la actividad inflamatoria agravada, que influyen en el estrés oxidativo. La evidencia disponible sugiere que las células cancerosas dependen del nivel de especies oxígeno reactivas (EOR) intrínsecas y extrínsecas para su proliferación y supervivencia (Corrales, et al., 2012).

Otro factor que genera CaPiel es la activación de genes que podrían participar en el control de la transcripción de factores de crecimiento necesarios para el desarrollo tumoral. Así mismo, la transformación que sufren las células está condicionada por la presencia de genes mutados que controlan funciones celulares claves, que a su vez también pueden estar relacionados con el estrés oxidativo (Ospina - Pérez, et al., 2011).

### 2.2.1 Tipos de cáncer de piel

El CaPiel se clasifica de acuerdo con el tipo de células afectadas e histológicamente en: melanoma y no melanoma. El cáncer melanoma se origina en los melanocitos, células productoras de melanina, localizadas principalmente en la capa basal de la epidermis y forma la unidad melanocítica cutánea junto a los queratinocitos (Figura 2-1) (Lozano, 2004). Esta característica explica por qué este tipo de cáncer es el de mayor tasa de mortalidad de los diagnosticados, ya que se origina en cualquier órgano, encontrándolo en las mucosas, los tejidos blandos y en los ganglios. Además, es transportado con facilidad

por vía sanguínea, lo que permite que se expanda a otros órganos (Instituto Nacional de Cáncer, 2015).

El cáncer de piel no melanoma compromete las células basales y escamosa que se encuentran en la zona más superficial de la epidermis como se aprecia en la Figura 2-1. Se caracteriza por ser localmente invasivo, de crecimiento lento y escaso riesgo de metástasis, pero es considerado realmente letal sin un diagnóstico rápido. Posee capacidad de generar daño tisular local extenso, lo que genera que su tratamiento quirúrgico sea doloroso y a menudo desfigurante (Lobos B, et al., 2011).

El carcinoma basocelular posee mayor incidencia que el carcinoma escamoso y se encuentra asociado a exposiciones cortas a la radiación UV en el rango UVA, la cual está presente en la mayor cantidad de horas/día haciendo que su diagnóstico en la población se vea incrementado a nivel mundial (Cormane, et al., 2014). Este cáncer prevalece en personas de fototipo I: piel muy pálida que casi siempre se quema, apenas se broncea y suelen sufrir reacciones fotoalérgicas al exponerse de forma prolongada a la luz solar directa y fototipo II: piel blanca, sensible y delicada, generalmente de cabellos rubios o claros que al broncearse presentan reacciones fotoalérgicas en caso de exposición prolongada al sol (Lomas, et al., 2012).

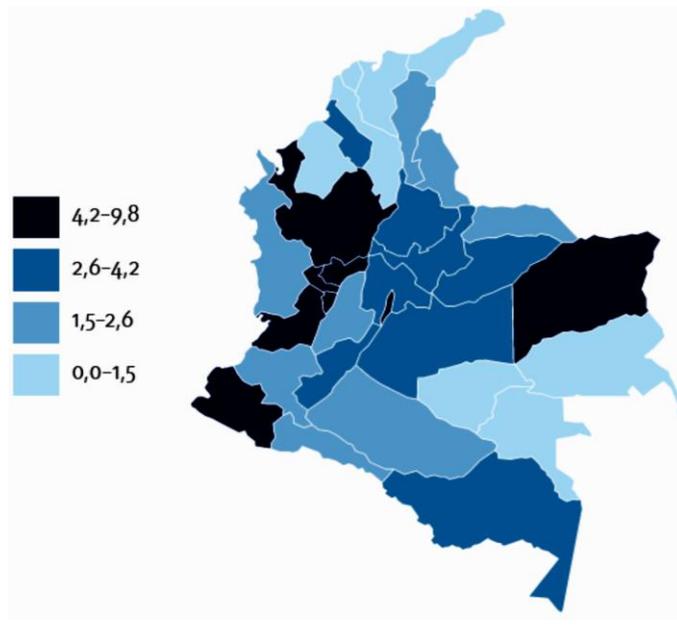
El carcinoma escamoso o epidermoide es más agresivo y posee mayor capacidad de formar metástasis, su incidencia es más irregular que el de células basales y su aparición se asocia a la exposición tanto a la radiación UVA como UVB (Lang, 2006).

El cáncer de piel es susceptible de un diagnóstico temprano, por lo cual se debe instruir a la población sobre el alto riesgo que incurre por exponerse a la radiación UV sin protección, además de la realización de autoexamen de piel y la habituación del uso de fotoprotección como estrategia preventiva (Sordo, et al., 2013; Lang, 2006).

### **2.2.2 Cáncer de piel en Colombia**

De acuerdo con las estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología 2017, durante los últimos años en Colombia se han registrado 79381 casos nuevos de cáncer, de los cuales 11780 (14.9 %) fueron casos nuevos de cáncer de piel, siendo el melanoma el más prevalente en la población de tercera edad de ambos sexos con una prevalencia de 46.6 % en hombres y 53.4 % en mujeres (Pozzobon, et al., 2018).

En la Figura 2-2 se indica el número de casos por cada 100000 habitantes de melanoma, observando que los departamentos del país con mayor incidencia están sujetos a factores medio ambientales, recreativos y económicos, que inciden en la aparición del cáncer de piel. Aunque el melanoma no lidera los índices de mayor mortalidad por cáncer en el país, genera un alto gasto en el sistema de salud y perjudica la calidad de vida del paciente debido a que su tratamiento es altamente invasivo, requiriendo quimioterapia o cirugía (Pardo, et al., 2015; Fondo Colombiano de Enfermedades de alto Costo, 2017; Pozzobon, et al., 2018).

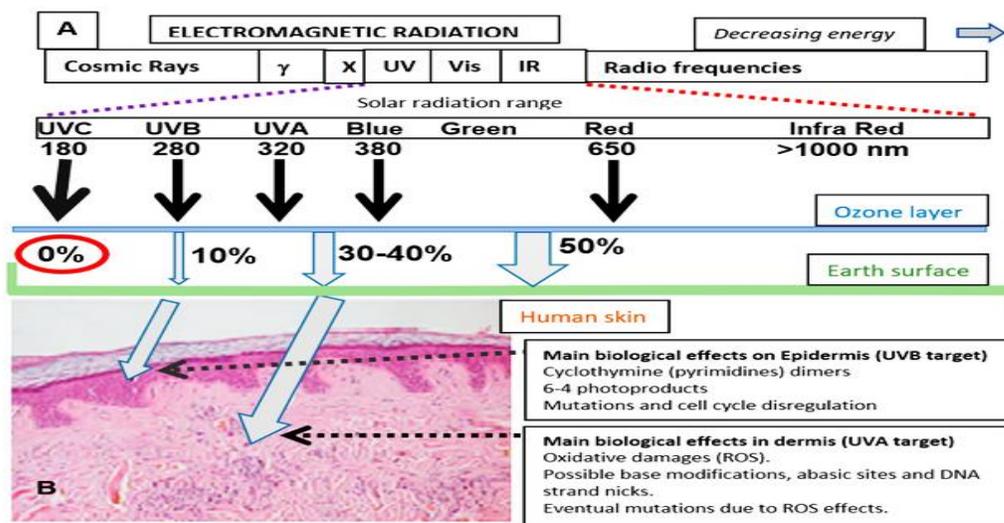


**Figura 2 - 2.** Prevalencia por cada 100000 habitantes del cáncer melanoma en Colombia (Fondo Colombiano de Enfermedades de alto Costo, 2017).

En el Plan Decenal de Salud Pública 2012-2021 se encuentran las iniciativas del gobierno nacional para controlar el aumento de casos de CaPiel, el cual dispone como meta número 19 de las dimensiones prioritarias en “salud ambiental: hábitat saludable” que en el año 2021 se implementará el sistema de control de riesgo frente a la exposición a radiación solar ultravioleta (Ministerio de salud y protección social, 2010) como estrategia para la prevención del cáncer de piel (Ministerio de Salud y Protección Social - Instituto Nacional de Cancerología, 2012).

## 2.3 Efecto de la exposición a la radiación UV en la piel humana

La exposición directa a la radiación solar es uno de los factores más agresivos para la piel humana relacionado con su rango espectral electromagnético y energía que alcanza la superficie terrestre, abarcando regiones del visible, infrarrojo y ultravioleta (UV). Esta última se clasifica de acuerdo con su longitud de onda en 4 tipos: UV al vacío que contempla los rangos de longitudes de onda menores a 200 nm, UVC entre 200 y 280 nm, UVB que se encuentra entre 280 y 320 nm y el UVA entre 320 y 400 nm, que a su vez puede dividirse UVA I larga (340-400 nm) y UVA II corta (320-340 nm) (Figura 2-3) (Cockell, et al., 1999). La radiación solar terrestre está constituida por un 5 % de radiación ultravioleta, frente a un 95 % de radiación visible e infrarroja. Donde la radiación UVA representa el 98 % del total de la energía solar UV incidente en la piel humana.

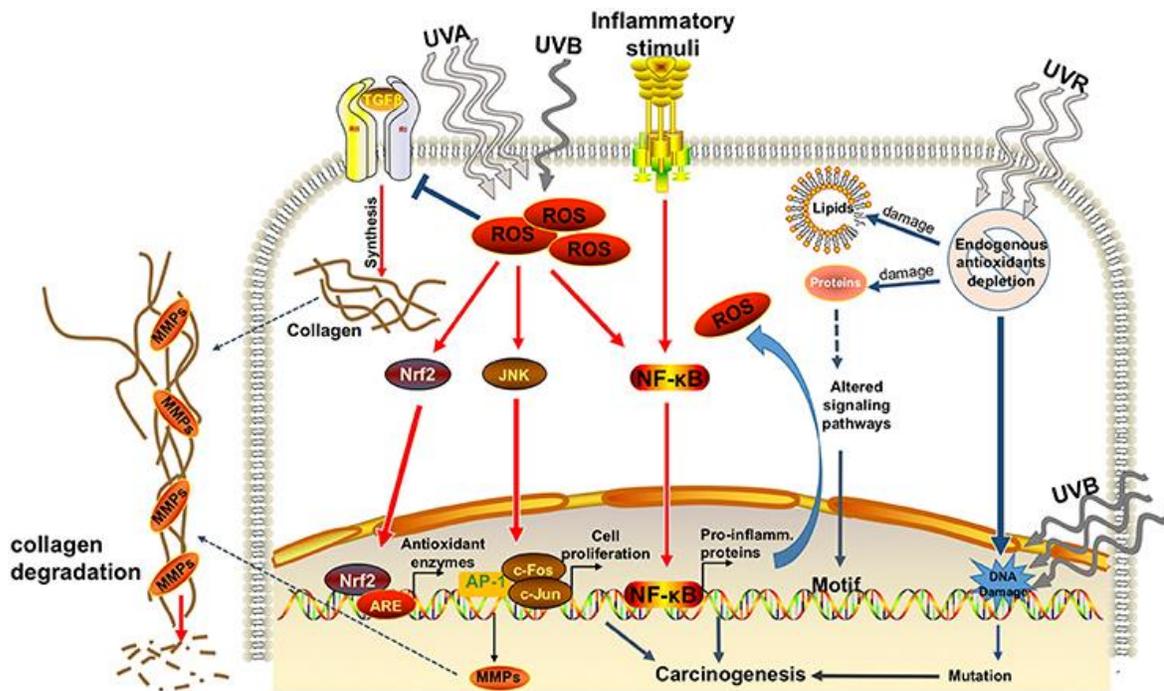


**Figura 2 - 3.** Radiación solar que alcanza la superficie de la Tierra, la penetración de la piel y sus efectos biológicos. (A) Porcentaje aproximado (%) de la radiación solar total que alcanza la superficie de la Tierra para diferentes regiones de longitud de onda. (B) Penetración en la piel de UVB y UVA. También se mencionan las principales consecuencias celulares (Solano, 2020).

La exposición excesiva a la radiación ultravioleta (RUV) causa daños en la piel a través de dos mecanismos principales: directamente, a través de la absorción de energía por las biomoléculas e indirectamente a través de una mayor producción de especies oxígeno reactivas (EOR) y especies nitrógeno reactivas (ENR). Principalmente EOR como los aniones superóxido, el peróxido de hidrógeno, los radicales hidroxilo, el oxígeno singlete y los radicales peróxido lipídicos subproductos de la vida aeróbica, produciendo alteraciones

en la permeabilidad de la membrana celular, fenómenos de mutaciones, edema, carcinogénesis y muerte celular (Dunaway, et al., 2018).

La radiación ultravioleta UVA produce cambios en el colágeno, altera la vascularización, induce reacciones de fotosensibilidad y deshidratación, generando piel seca y poco elástica. Adicionalmente, produce la activación de metaloproteinasas y aumento dramático en la producción de especies oxígeno reactivas (EOR) que resulta en estrés oxidativo (Figura 2-4) (Solano, 2020) que a su vez, estimula la liberación de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento (específicamente el factor activador de proteína 1 y el factor nuclear B) y de proteasas que degradan el colágeno y fibras de elastina de la matriz extracelular conduciendo a fotoenvejecimiento (Castaño - Amores, et al., 2018).

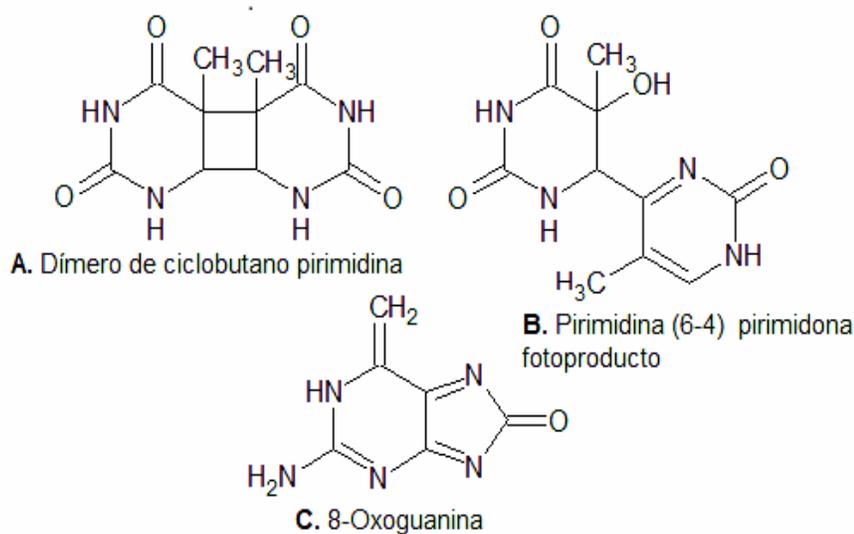


**Figura 2 - 4.** Efectos de la radiación ultravioleta en la piel. Representación simplificada de los efectos de RUV (UVA y UVB) en queratinocitos epidérmicos, además la formación de especies oxígeno reactivas (Solano, 2020).

Además, a través de la oxidación de proteínas celulares, lípidos y bases del ADN induce cambios epigenéticos como la transformación de la 8-dihidroxi-2-deoxiguanosina que altera genes de supresión tumoral como el p53 y la metilación del ADN posiblemente generadores de cáncer (Zorrilla - García, et al., 2004; Dunaway, et al., 2018), también

inducen la activación de vías de señalización que afectan la transcripción génica, el ciclo celular, la proliferación y la apoptosis.

La radiación UVB produce alteraciones de ADN celular por la formación de dímeros de pirimidina ciclobutano y glicoles de timina, atribuyéndosele efectos de inmunosupresión, además de las transversiones de T - G del intermedio oxidativo 8-oxo-desoxiguanina (8-oxo-dG) (Figura 2-5) que causan principalmente fotocarcinogénesis (Aguilera - Arjona, et al., 2013). La radiación UVC por el contrario tiene poder germicida y eritematógico, provoca descamación, eliminando las capas protectoras ya melanizadas, sin embargo, esta radiación es filtrada casi en su totalidad por la atmósfera de la Tierra, por lo que no se le atribuye efectos nocivos para la salud de los organismos vivos en general. Cabe mencionar que, en los organismos fotosintéticos, el exceso de radiación UVA y UVB causa daños en el aparato fotosintético mediante la fotoinhibición (Giraldo, et al., 2014).



**Figura 2 - 5.** Estructura química de las bases nitrogenadas del ADN alteradas por efecto de la radiación UV (Dunaway, et al., 2018).

Otros estudios afirman que las alteraciones por estrés oxidativo promueven la mayoría de las carcinogénesis y, por lo tanto, la regulación de los niveles de ERO es crítica para el mantenimiento de la homeostasis normal de la piel (Solano, 2020).

### **2.3.1 Papel de los antioxidantes en la prevención y tratamiento del cáncer de piel**

La reducción del estrés oxidativo por radiación ultravioleta se puede lograr en dos niveles: disminuyendo la exposición a dicha radiación y/o aumentando los niveles de defensa antioxidante para eliminar las especies reactivas (Godic, et al., 2014).

Cuando se habla de la defensa antioxidante se hace referencia al sistema de protección del metabolismo, que está constituido por un grupo de sustancias que, al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente el estrés oxidativo (Halliwell, 2012). Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas que se encuentran en las células vivas: proteínas, lípidos, hidratos de carbono y ácidos nucleicos.

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar, interactúan más rápido con los radicales libres del oxígeno en formación y las especies reactivas del oxígeno en un determinado microambiente, que puede ser la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular (Venero - Gutiérrez, 2002).

Los antioxidantes se pueden clasificar en enzimáticos y no enzimáticos. Por ejemplo la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y citocromo-oxidasa, son antioxidantes enzimáticos que a su vez son endógenos pues se biosintetizan en el organismo mientras que sustancias como la vitamina A, C, E, carotenoides, flavonoides, antraquinonas, entre otros, son ejemplos de antioxidantes no enzimáticos que a su vez pueden ser endógenos o exógenos suministrados en la dieta (Zorrilla - García, et al., 2004; Kranner, et al., 2005).

Los mecanismos de acción de un antioxidante son: a) atrapamiento de radicales libres y/o interrupción de reacciones en cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización de radicales libres (Avello, et al., 2006); b) sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas funcionalmente vitales o importantes en el metabolismo, minimizando el daño oxidativo; c) quelación de metales libres en el medio celular que desencadenen la formación de especies reactivas (Avello, et al., 2006; Rodríguez - Perón, et al., 2001; Nishigori, et al., 2004).

Dentro de los mecanismos endógenos de protección que tiene la piel para contrarrestar el estrés oxidativo producidos por la RUV, está en primer lugar la melanina un agente redox producido por los melanocitos que absorbe los rayos UV, considerándose entonces la primera línea de defensa frente al daño del ADN en la superficie de la piel, eliminando indirectamente las especies oxígeno reactivas formadas durante el estrés oxidativo inducido por los diferentes componentes de la RUV. Las cantidades de melanina en la piel dependen del fototipo por lo cual, la melanina endógena en ocasiones no es suficiente para proteger o prevenir totalmente el daño, por lo tanto, el uso de fotoprotectores y/o antioxidantes complementarios son esenciales para la fotoprotección de la piel (Solano, 2020).

Se ha encontrado que varios productos de origen natural exhiben una potente capacidad antioxidante que contrarresta el estrés oxidativo inducido por la RUV en la piel. Estos productos ejercen sus efectos beneficiosos a través las vías mencionadas propiciando un mayor interés en el área de las ciencias cosméticas y farmacéuticas (Solano, 2020).

### **2.3.2 Protectores solares como agentes preventivos de cáncer de piel**

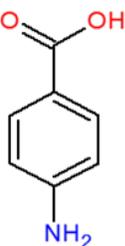
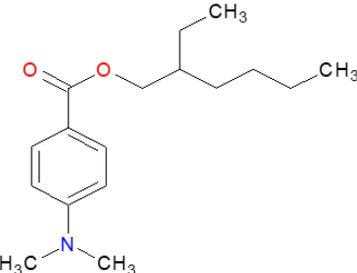
La piel está expuesta continuamente, a diversos factores ambientales y patógenos, entre los que encontramos radiación ultravioleta, constituyéndose en la principal barrera de protección en contra de estos (Wulf, et al., 2004). Si bien la capa de ozono estratosférico filtra los rayos UVC más dañinos, la piel debe generar diversos mecanismos para la protección en contra de la radiación UVA y UVB, como, por ejemplo, el aumento del grosor de la capa córnea, que desvía aproximadamente el 5 % de la RUV que incide sobre la piel. A nivel epidérmico contiene sustancias como el ácido urocánico, la melanina y el triptófano que son los principales fotoprotectores endógenos, siendo la melanina el factor de protección más importante debido a su alta capacidad de absorción de la RUV, y la responsable del bronceado de la piel (Lang, 2006).

En la mayoría de los fototipos, la melanina endógena no es suficiente para una protección total, especialmente en exceso de RUV. Por lo tanto, las moléculas fotoprotectoras deben agregarse a los protectores solares comerciales para completar la capacidad de absorción de rayos UV y aumentar la fotoprotección intrínseca del pigmento natural cutáneo (Godic, et al., 2014).

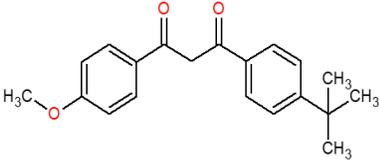
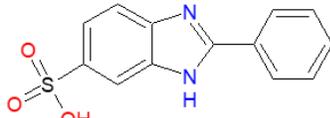
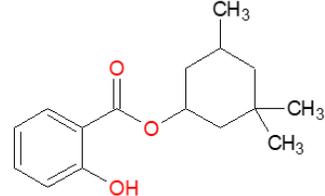
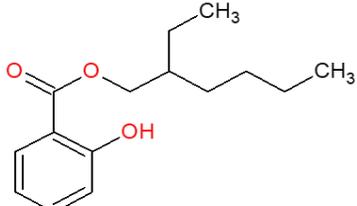
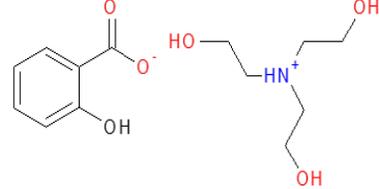
En la actualidad la protección de los seres humanos ante la excesiva radiación UV, está orientada, en un primer nivel de protección, al uso de barreras físicas, como por ejemplo, prendas de vestir adecuadas, gafas de sol con filtros, sombreros, sombrillas, ventanas con vidrios polarizados, entre otras, aunque estas siguen siendo de uso cotidiano, no son tan efectivas para contrarrestar los daños de la RUV (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2014), por lo que se emplean como segundo nivel de protección, productos fotoprotectores aceptados por entidades reguladoras que son agentes que tienen la finalidad de proteger la estructura y preservar la función de la piel humana contra el daño actínico. Estos contienen compuestos activos inorgánicos y/o orgánicos que actúan como pantallas físicas o filtros químicos (Mejía - Giraldo, et al., 2014).

Estos compuestos actúan fundamentalmente de dos formas, desviando o reflejando la radiación ultravioleta o por el contrario absorbiéndola. Estas sustancias también tienen un rango de operación de acuerdo con la longitud de onda, trabajando en el UVA o UVB (Tabla 2-1) y algunos de ellos abarcan la región infrarroja (Mishra, et al., 2011).

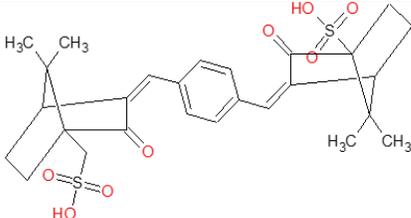
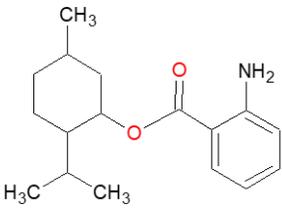
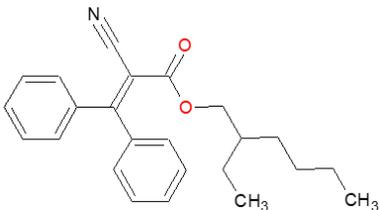
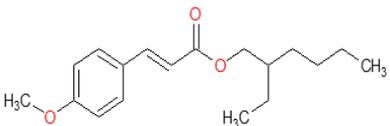
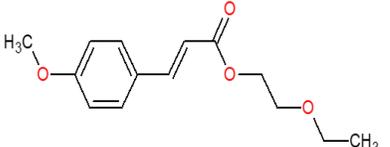
**Tabla 2 - 1.** Filtros UV orgánicos e inorgánicos actualmente aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos para uso y venta libre.

Ingrediente activo		Concentración máxima permitida (%)	Cobertura espectral	
Orgánicos	Derivados del ácido amino benzoico	 ácido <i>p</i> -aminobenzoico (PABA)	15	UVB
		 Padimate O (2-etilhexil 4-(dimetilamino)-benzoato)	8	UVB

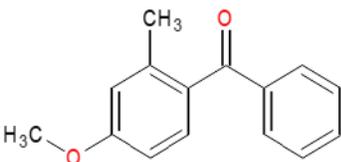
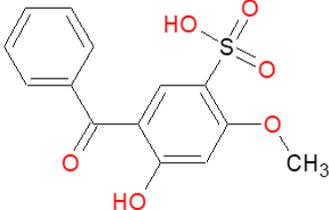
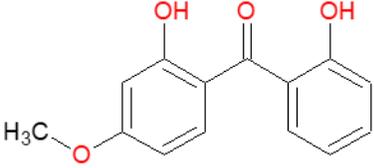
**Tabla 2 - 2.** (continuación) Filtros UV orgánicos e inorgánicos actualmente aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos para uso y venta libre.

	Ingrediente activo	Concentración máxima permitida (%)	Cobertura espectral
Derivados del dibenzoilmetano	 <p>Avobenzona (4-tert-butil-4'-metoxi-dibenzoilmetano)</p>	3	UVA I
Derivados de benzimidazol	 <p>Ensulizol (ácido 2-fenil-5-benzimidazol sulfónico)</p>	4	UVB
Derivados del salicilato	 <p>Homosalato (benzoato de 2-hidroxi-3,3,5-trimetilciclohexílico)</p>	15	UVB
	 <p>Octisalato (octil salicilato)</p>	5	UVB
	 <p>Trolamina salicilato (2-hidroxi-benzoato de tris(2-hidroxi-etil) amonio)</p>	12	UVB

**Tabla 2 - 3.** (continuación) Filtros UV orgánicos e inorgánicos actualmente aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos para uso y venta libre.

	Ingrediente activo	Concentración máxima permitida (%)	Cobertura espectral
Derivados de bencilideno alcanfor	 <p>Ecamsule (ácido tereftilideno dicanforsulfónico)</p>	3	UVA II
Derivados de antranilato	 <p>Meradimate ((1 R, 2 S, 5 R) -2-isopropil-5-metilciclohexil 2-aminobenzoato)</p>	5	UVA II
Derivados de cinnamato	 <p>Octocrieno Ester 2-etilhexílico del ácido 2-ciano-3,3-difenilacrilico)</p>	10	UVB
	 <p>Octinoxato (octil 4-metoxicinamato)</p>	7.5	UVB
	 <p>Cinoxato (3- (4-metoxifenil) propenoato de 2-etoxietilo)</p>	3	UVB

**Tabla 2 - 4.** (continuación) Filtros UV orgánicos e inorgánicos actualmente aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos para uso y venta libre.

		Ingrediente activo	Concentración máxima permitida (%)	Cobertura espectral
	Derivados de benzofenona	 <p>Oxibenzona (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona; benzofenona-3)</p>	6	UVB y UVA II
		 <p>Sulisobenzona (benzofenona-4)</p>	10	UVB y UVA II
		 <p>Dioxibenzona (2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona; benzofenona-8)</p>	3	UVB y UVA II
Inorgánicos	Óxido	Dióxido de Titanio	25	UVB y UVA II
		Óxido de Zinc	25	UVB, UVA II y UVA I

A pesar de que los fotoprotectores comerciales han ayudado a contrarrestar los efectos nocivos de la RUV, en las últimas décadas han sido foco de controversia, pues el cáncer de piel sigue en aumento aun con el uso de ellos, además de que se les ha asociado con problemas dérmicos por su uso excesivo (Rai, et al., 2012). Por ejemplo, algunos de los filtros UV de naturaleza orgánica pueden ser fotoinestables promoviendo la formación de fotoproductos que alteran su espectro de absorbancia y merman su capacidad de absorción de la luz. Además, pueden generar dermatitis (Wong, et al., 2011; Saewan, et al., 2015). Otros estudios reportan riesgo en su uso, ya que pueden conducir a la disminución de los niveles de vitamina D en niños y adultos mayores por disminuir su

biosíntesis cutánea a partir de la provitamina D3 que es inducida por la radiación UVB (Maza Ramos, et al., 2015).

En cuanto los filtros físicos que actúan formando una barrera o pantalla que refleja o desvía la radiación solar, su uso es más amplio y con pocas restricciones ya que pueden proporcionar protección frente a los UVA, UVB, luz visible e infrarroja. Además, es más raro que originen reacciones de tipo alérgico o irritativo, sin embargo, poseen problemas de dispersión homogénea de la luz, efecto “mimo” en la piel por su aplicación y no son resistentes al agua entorpeciendo su efectividad (Giraldo, et al., 2014). Estos son partículas minerales que necesitan una capa de aplicación gruesa y se encuentran menos difundidos en el mercado, las sustancias más habituales empleadas son el dióxido de titanio y el óxido de zinc, otras menos frecuentes como el carbonato de calcio y magnesio, el óxido de magnesio y el cloruro de hierro (Duro - Mota, et al., 2003).

Con base en el consenso emergente de que la fotoprotección de amplio espectro diaria, durante todo el año, es una estrategia clave y eficaz que asegura la prevención y reducción de los efectos nocivos por exposición a la RUV, se ha dirigido mucho esfuerzo hacia la identificación, el desarrollo y la optimización de fotoprotectores tópicos o sistémicos que prevengan y atenúen el daño solar. Teniendo como objetivo principal en ellos, una mayor absorbancia con una cobertura espectral ampliada UVA/UVB, optimización de la fotoestabilidad de los cromóforos UV activos y finalmente un prolongado tiempo de residencia en la piel con mínima penetración (Garrote, et al., 2008).

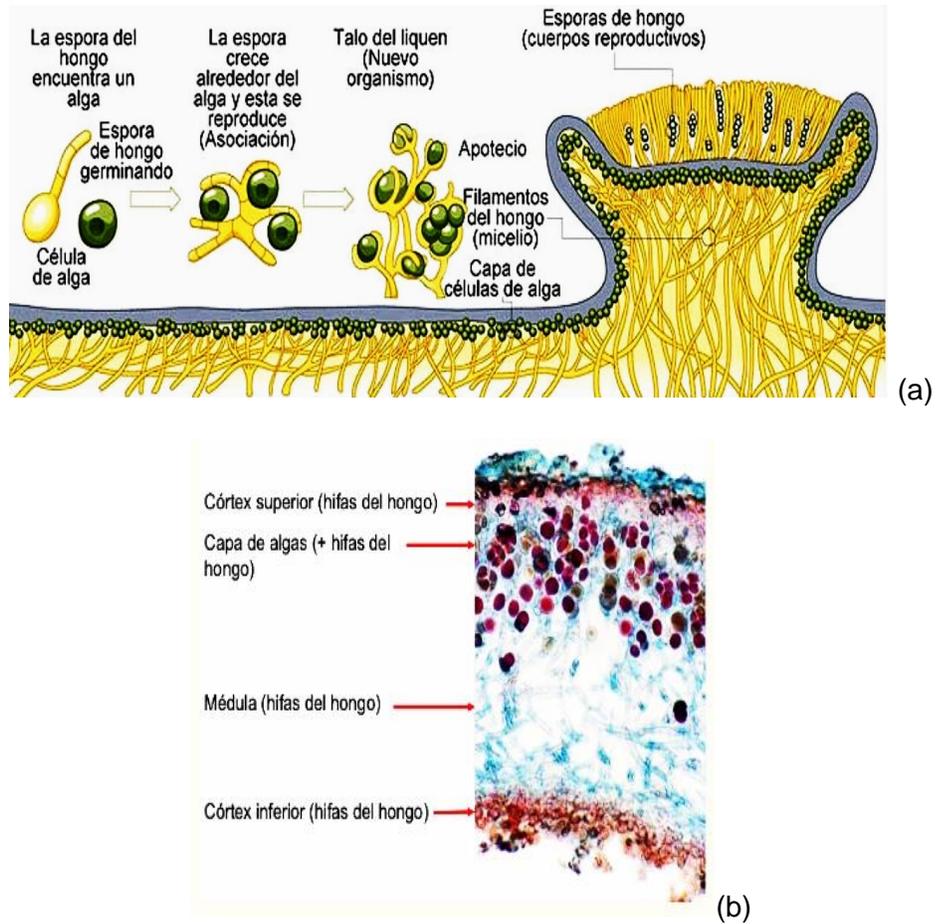
Adicionalmente los nuevos fotoprotectores deberían incluir moléculas con propiedades antioxidantes, con el fin de incrementar el umbral antioxidante del organismo para responder al estrés oxidativo generado por RUV (Rodríguez - Perón, et al., 2001). Las sustancias antioxidantes más utilizadas en preparados destinados a la piel son el ácido ascórbico representante de las moléculas hidrofílicas de carácter antioxidante. Gracias a su potencial redox, participa en la regeneración del derivado de vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) desde su forma oxidada; proceso que ocurre en la interfase de la membrana hidrolipídica cuando se genera un radical libre y tocoferol que finalmente actúan como coadyuvantes de la actividad fotoprotectora (Castaño - Amores, et al., 2018).

## 2.4 Hongos liquenizados

Los hongos liquenizados (HL) son organismos únicos generados a partir de la asociación simbiótica mutualista entre uno o varios micobiontes heterótrofos, generalmente de tipo Ascomicetos (y en pocas ocasiones Basidiomicetos, Deuteromicetos, Mastigomicetos o Mixomicetos) y un fotobionte (alga clorofícea o cianofícea) (Spribille, et al., 2016). Dicha asociación da origen a un cuerpo liquénico o talo con características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas definidas, que los hace organismos especiales en la flora del mundo. En este mutualismo, el hongo genera los mecanismos necesarios para la protección del alga, entre ellos, la biosíntesis de metabolitos secundarios, además de ser el que propicia la reproducción; mientras el organismo fotosintético proporciona al hongo alimento, vitaminas y una fuente de carbono para la biosíntesis de dichos metabolitos secundarios (Nash, 2008).

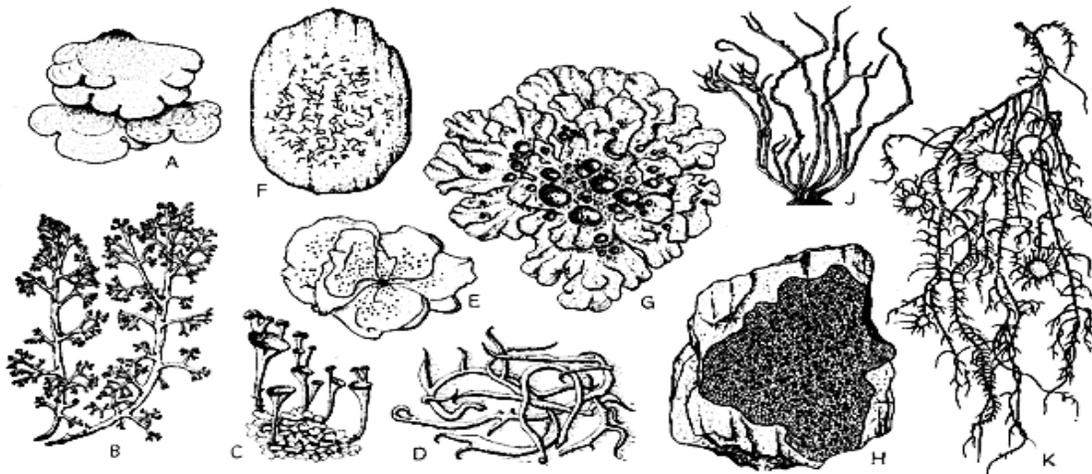
Anatómicamente el cuerpo vegetativo del hongo liquénico o talo está constituido en su mayor parte por tejido fúngico (hifas) que rodean las células algales como se observa en la Figura 2-6. Cuando el hongo construye la mayor parte de los tejidos estructurales y forma una serie de capas bien definidas (córtez superior, médula y córtex inferior) además de que las células del alga están rodeadas por las hifas formando una capa (capa algal) por debajo del córtex superior, se conocen como hongos liquenizados heterómeros. Por otro lado, cuando los fotobiontes no forman una capa y está distribuida por toda la sección del cuerpo vegetativo del talo se conocen como hongos liquenizados homómeros (Lara - Carrio, 2015).

Su reproducción puede ser sexual o asexual, siendo el viento, el agua o los animales los principales vectores de dispersión. La reproducción sexual se produce mediante esporas que dispersa únicamente el micobionte y que de una vez necesitan ser incorporadas al fotobionte para establecer la simbiosis (Walser, et al., 2005).



**Figura 2 - 6.** a) Proceso de formación de un hongo liquenizado. b) Sección transversal del cuerpo vegetativo (Lara - Carrio, 2015).

Los talos liquénicos son la característica morfofisiológica que diferencia a estos organismos de los hongos no liquenizados, clasificándolos en: crustáceos (talo en forma de costra); escamosos (forma de escamas) compuestos o mixtos (formados por dos tipos de talos: uno principalmente crustáceo o escamoso y raramente foliáceo, y uno secundario de tipo fruticuloso o foliáceo); fruticoso (talos ramificados en forma de pequeños arbustos) y foliáceos o foliosos (talos en forma laminar) (Figura 2-7). Estos últimos, alcanzan mayor grado de complejidad porque su talo puede ser homómero o heterómero, conduciendo a una enorme diversidad de formas, organización y tamaño (Barreno - Rodríguez, et al., 2003).



**Figura 2 - 7.** Tipos de talos. A: escamoso; B-D-K-J: fruticoso; E-G: foliosos; F-H: crustáceos y C: compuestos (Aguirre, 2006).

La mayoría de los HL son terrestres, aunque algunos habitan cerca de las caídas de agua e incluso dentro de ella. Su tamaño varía mucho, desde pocos milímetros hasta varios centímetros. Su crecimiento es bastante lento, debido a las condiciones medioambientales, la baja tasa fotosintéticas y a la naturaleza genética, en ocasiones este disminuye cuando se encuentran en cultivo (Chaparro De Valencia, et al., 2002).

Los HL crecen sobre diferentes sustratos tanto naturales como artificiales dado su alto grado de adaptación a las condiciones ecológicas extremas, entre ellas: incidencia de alta radiación ultravioleta, estrés oxidativo, climas extremos (frio o calor), diferentes altitudes, presencia o ausencia de agua. Esto los ha convertido en una forma de vida predominante en el 8 % de la superficie terrestre, en especial en zonas bastante inhóspitas como los polos y las regiones de alta montaña, por ello se consideran organismos extremófilos y son considerados como colonizadores de ecosistemas (Barreno - Rodríguez, et al., 2003; Nash, 2008).

En la actualidad se han identificado más de 20000 mil especies de líquenes en el mundo, los cuales cumplen importantes funciones como mantener y evaluar el equilibrio en diferentes ecosistemas terrestres e incluso acuáticos, por ejemplo, participan en la regulación del ciclo del agua y de la atmósfera por su alta capacidad de almacenar agua, son vitales para la fijación del nitrógeno atmosférico; junto al musgo, son considerados los primeros organismos en colonizar la roca e iniciar procesos de erosión (formación del suelo), son bioindicadores de la calidad del aire, entre otras funciones biológicas (Bernal,

et al., 2016). Además, ayudan en la degradación de las rocas, preparación de sustrato para el crecimiento de distintas plantas (vasculares y no vasculares) y principal fuente de alimento de algunas especies de animales (Asplund, et al., 2017).

### 2.4.1 Hongos liquenizados en Colombia

El número total de especies de HL en Colombia es alrededor de 3600, siendo uno de los países con mayor riqueza en estos organismos en el mundo, con menos de la mitad (1674) catalogadas (Lücking , et al., 2009b). La mayoría de las especies se registraron en los Andes, mientras que el Caribe colombiano sigue siendo poco estudiados. Entre 1990 y 2015, 54 de 470 trabajos sobre la diversidad biológica del Caribe colombiano se centraron en la composición florística de los bosques estacionales secos, y entre ellos, solo cuatro se centraron en HL (Aldana - Domínguez, et al., 2017). El único inventario reciente de HL en la región reportó 215 especies de cinco localidades en los departamentos de La Guajira, Cesar, Atlántico y Córdoba. Para Atlántico, con base en ese estudio y el catálogo de plantas y HL de Colombia, se conocen 27 especies, en contraste con más de 700 para Cundinamarca. En una evaluación de briofitas y HL potencialmente amenazados en Colombia (Aguirre, 2006), cinco especies se encuentran en peligro crítico para el Caribe, pero solo de la Sierra Nevada de Santa Marta, sin considerar los HL de bosque seco (Sipman, et al., 2008).

Se reconocen 70 familias de las cuales tres son representativas del sistema geográfico andino la *Parmeliaceae*, *Graphidaceae* y *Physciaceae* que constituyen cerca de la tercera parte de la riqueza de HL reportada hasta el momento. De estas familias la *Parmeliaceae* y *Physciaceae* están presentes en ecosistemas de páramo con unas 75 y 12 especies respectivamente (Aguirre, 2006). Sin embargo, el páramo contiene la quinta parte de los hongos liquénicos reportados para el territorio nacional, variando la distribución de las familias debido al nivel altitudinal, por ejemplo, el porcentaje de riqueza de la familia *Parmeliaceae* es más del 25 % en la región de paramo, patrón similar es observado para la familia *Cladoniaceae* y *Lobariaceae*, mientras que para la familia *Lecanoraceae* el porcentaje de riqueza disminuye. Para los géneros se observa un aumento de la riqueza de especies de *Cladonia* y de *Hypotrachyna* en regiones altas y disminución para las especies del género *Parmotrema* (Rincón - Espitia, et al., 2011) como algunos ejemplos cercanos.

El páramo de Sumapaz es el más grande del planeta, que además de ser una de las fronteras naturales de la capital colombiana hacia el sur oriente, es una de las principales fuentes hídricas del país pues las características de este ecosistema lo convierten en una fábrica de agua de importancia crucial. Es además uno de los Parques Nacionales Naturales de Colombia, condición que refuerza su importancia y la necesidad de la protección y conservación de este imponente escenario natural, pues además de la belleza de sus paisajes de páramo andino es hogar de especies únicas de fauna y flora. Se ubican por lo general, desde altitudes de aproximadamente 2700 m s. n. m. hasta los 4000 m s. n. m.

El ecosistema de páramo entonces es considerado de gran diversidad en HL, que aun ha sido poco explorado. Hasta la fecha se describen al menos 264 especies de hongos liquenizados en páramos y todavía se informan nuevas especies. Este ecosistema se considera un punto de acceso único para la biodiversidad de especies que se desarrollan en regiones de gran altitud distinguiéndose por las variaciones extremas de temperatura diaria, suelos ácidos y pobres en nutrientes, lluvias intensas y alta radiación UV (Lücking, et al., 2019).

## 2.4.2 Usos tradicionales

Estos organismos han sido utilizados por el ser humano desde la antigüedad, civilizaciones como la China, la egipcia y otras comunidades europeas los consumían en sus diferentes dietas, ejemplo de ello está la *Thamnolia vermicularis* usada en China para la preparación de “snow tea” o té de nieve, llamado de esa forma por el color blanco del liquen, *Parmotrema perlatum*, géneros de *Cetrariastrum*, *Ramalina* y *Usnea* utilizadas como especias por los asiáticos. Animales como los renos y caribúes consumen a las especies *Cladonia alpestris*, *C. arbuscula* y *C. rangiferina* como fuente de carbohidratos durante el invierno por su elevado contenido de polisacáridos (Illana - Estebes, 2012).

Además, son fuente de colorantes debido a que sus metabolitos poseen alta afinidad para teñir fibras naturales, especies como *Roccella sp*, *Xanthoparmelia chlorochroa* y hoy en día utilizados en el papel indicador por su respuesta a los cambios de pH (Upreti, et al., 2015). Especies como *Evernia prunastri* y *Pseudevernia furfurácea* han sido utilizadas como fijadores en perfumería y como ingredientes de desodorantes, champús, jabones y

cremas dentales, dada su capacidad antioxidante y antimicrobiana (Müller, 2001; Brodo, et al., 2001)

Muchas de las especies liquénicas han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional, para tratamiento de padecimientos como la dispepsia, trastornos respiratorios, renales, cardiovasculares, dermatológicos y algunas infecciones. Por ejemplo, *Usnea barbata* y otras especies de este género se han empleado para enfermedades del cabello y como antipirético. Por su parte, *Lobaria pulmonaria* y *Parmelia sulcata* para enfermedades pulmonares y *Peltigera aphtosa* y *Ramalina conduplicans* para tratar aftas y como vermífugos. De igual modo, *Parmelia saxatilis* para la epilepsia, *Letharia vulpina* para los malestares estomacales entre otros cientos de aplicaciones (Illana - Estebes, 2012).

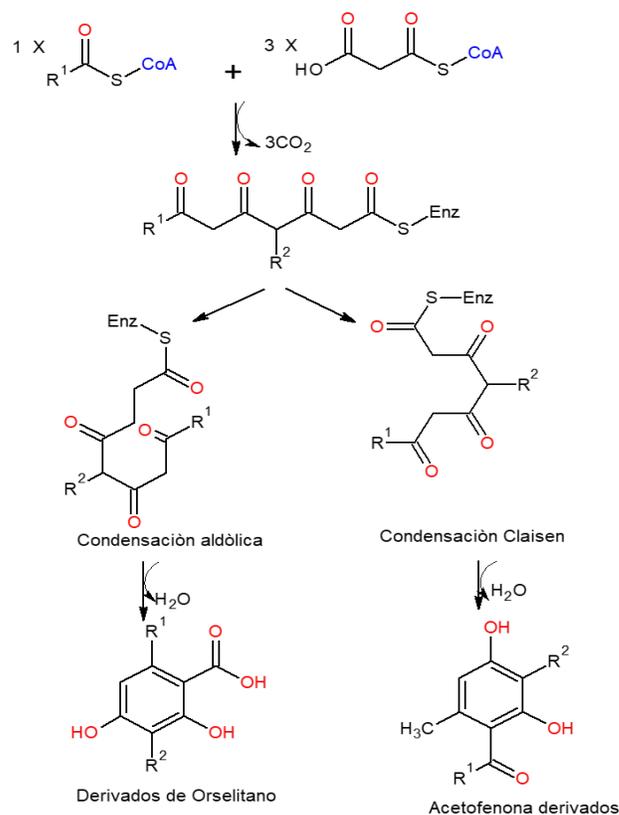
Adicionalmente los HL tienen un importante papel como bioindicadores de lectura inmediata de la contaminación medioambiental, de los cambios climáticos y de la estabilización del suelo, dada su capacidad de acumulación de diversos contaminantes y su resistencia o sensibilidad ante muchos de éstos (Hawksworth, et al., 2005). Se han realizado muchos trabajos acerca de este tema en regiones templadas, pero tan solo en algunos pocos casos las técnicas empleadas en este tipo de estudios han sido utilizadas en los trópicos. La mayor parte de las investigaciones realizadas en los trópicos hasta la fecha, se relacionan con la contaminación ambiental y perturbaciones forestales, pero estas han sido ejecutadas tan solo en algunos pocos lugares, y permanecen aún sin realizar en la mayoría de las regiones tropicales (Ranković, 2015).

### **2.4.3 Metabolitos secundarios de los hongos liquenizados y sus propiedades biológicas**

Los hongos liquenizados producen dos grupos principales de metabolitos: primario (intracelular) y secundario (extracelular), estos últimos son llamados sustancias liquénicas o liquenoquímicos y son propiamente biosintetizados por el micobionte a través de diversas rutas metabólicas, siendo la más destacada la ruta del acetato-polimalonato (Figura 2-8) (Calcott, et al., 2018). Dichas sustancias se acumulan principalmente en las zonas externas de la pared de las hifas de la medula, el córtex o la capa externa del fotobionte, encontrándose en forma cristalina o en sólidos amorfos, la mayoría son incoloras. Hasta el momento se han aislado más de 1000 sustancias liquénicas, su biosíntesis es compleja

y está influenciada de modos diversos por factores ambientales, como la luz, la exposición a los rayos UV, la altitud, las fluctuaciones de temperatura y la estacionalidad (Raggio, et al., 2010).

En general, los hongos liquenizados se caracterizan por poseer un metabolismo secundario muy activo, cuyos productos son principalmente compuestos fenólicos, obtenidos por diversas vías, como las del polimalonato (fenólicos monoaromáticos, dépsidos, dépsidonas y dépsonas), shikimato (ciclo péptidos y derivados del ácido pulvínico) y mevalonato (diterpenos, triterpenos y esteroides) (Figura 2-9), la cantidad de metabolitos secundarios sintetizados varían habitualmente entre el 0.1 % y el 10 %, pero a veces hasta el 30 % del peso seco del talo (Wolfgang , et al., 2011). Las clasificaciones de las sustancias liquénicas basadas en rutas bioquímicas permiten conocer ciertos mecanismos de adaptación/respuesta lo que presenta gran interés no solo dentro del conocimiento de la bioquímica evolutiva de estos organismos, sino también en la biotecnología, el campo farmacéutico y otros, dadas sus propiedades biológicas (Boustie, et al., 2005).



**Figura 2 - 8.** Ruta sintética de los policétidos (Calcott, et al., 2018).

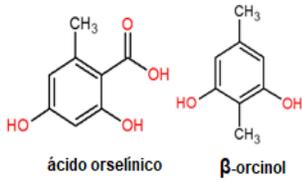
Las sustancias liquénicas son un conjunto muy heterogéneo de sustancias específicas dada su biosíntesis restringida a cada especie, presentan una alta diversidad estructural y actividades biológicas, lo que constituye un carácter importante en la taxonomía actual de los hongos liquenizados (Barreno - Rodríguez, et al., 2003; Gómez - Serranillo, et al., 2014).

Las funciones de las sustancias liquénicas varían y no están totalmente establecidas, pero se estima que son utilizadas como mecanismo de adaptación y protección hacia el entorno por ejemplo en contra de la ingesta por animales funcionando como insecticida o anti herbívoros, en su mayoría son sustancias tóxicas, actúan como antimicrobiano del talo contra bacterias, musgos y otros hongos, además cumplen funciones fisiológicas como aumentar la permeabilidad de las algas para la absorción de agua y nutrientes o como fitotóxicos y hay evidencia de que la producción de ciertos metabolitos estimulada por las condiciones ambientales como radiación UV protegen al talo liquénico frente al estrés oxidativo y los contaminantes (Brodo, et al., 2001; Aguirre, 2006).

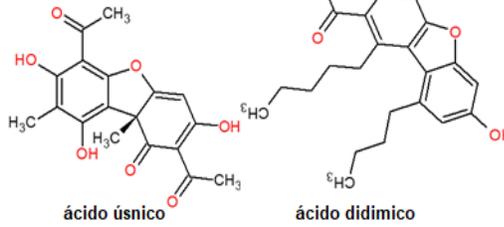
Por otra parte, los metabolitos primarios como aminoácidos, proteínas, polialcoholes y polisacáridos utilizados en las funciones metabólicas directas cobran importancia taxonómica en los hongos liquenizados debido a su restricción a especies en específico, algunos ejemplos son los polisacáridos galactomanosa, liquenina y la isoliquenina (Gómez - Serranillo, et al., 2014; Mitrović, et al., 2011; Woranovicz - Barreira, et al., 1999).

Las investigaciones *in-vitro* e *in-vivo* centradas en los líquenes en especial sobre sus propiedades bioactivas, han logrado identificar que muchos de las sustancias liquénicas presentan gran variedad de actividades biológicas, especialmente para el tratamiento de diversas enfermedades, reportando acción para la protección gastrointestinal, problemas respiratorio, como antivirales, antibacterianas, antimicóticas, antiproliferativas, fotoprotectoras entre otras, además su efecto benéfico generado por el consumo de compuestos polifenólicos, fundamentado en su capacidad para secuestrar radicales libres actuando como (antioxidante), justifica los efectos cardiovasculares y sus acciones vasodilatadores, vaso protectoras, antitrombóticas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias, antiapoptóticas, antitumorales y antipiréticas (Boustie, et al., 2005; Ranković, 2015).

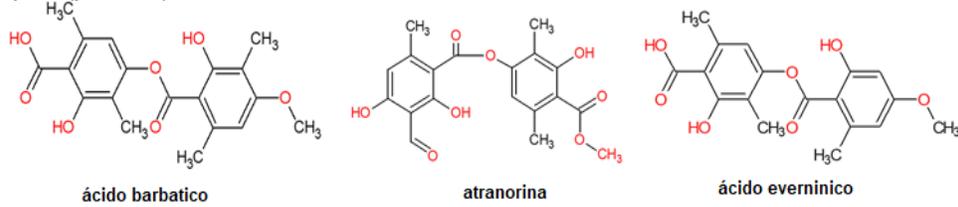
Compuestos monofenólicos



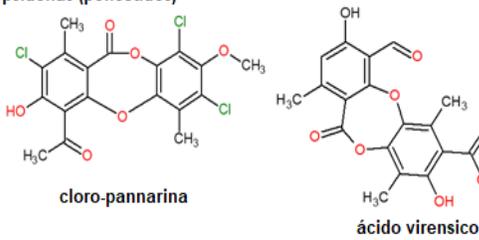
Dibenzofuranos y ácido úsnico



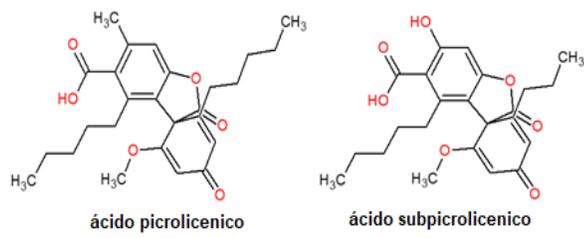
Dépsidos (policétidos)



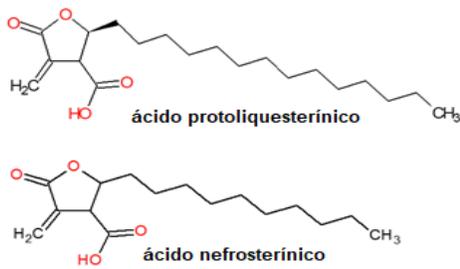
Depsidonas (policétidos)



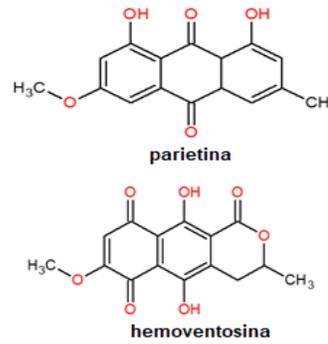
Dépsonas (policétidos)



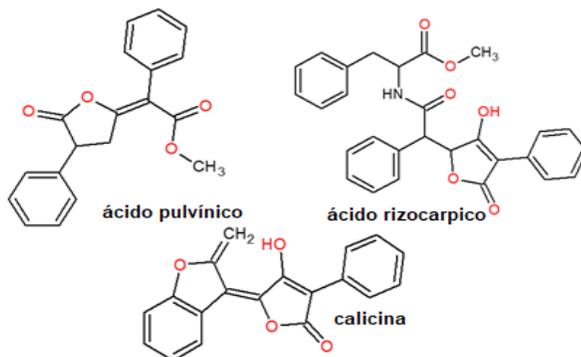
Lactonas



Quinonas



Derivados de ácido pulvínico



**Figura 2 - 9.** Estructuras típicas de los metabolitos secundarios de hongos liquenizados (Wolfgang , et al., 2011).

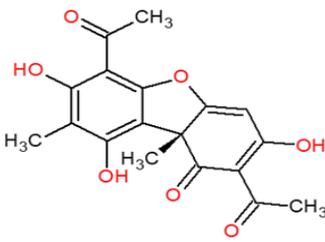
### 2.4.4 Actividad antioxidante y fotoprotectora de liquenoquímicos

En los últimos años, numerosos estudios señalan la importancia de los líquenes en la neutralización de radicales libres por diversos mecanismos de acción. Ya que estos son ricos en metabolitos secundarios, principalmente de tipo fenólico, que a su vez son bien conocidos por sus propiedades antioxidantes (Behera, et al., 2006; Konasíc, et al., 2011). Se han evaluado más de 75 especies, con más de 65 metabolitos aislados en busca de esta actividad, de las cuales la familia Parmeliaceae es la mejor estudiada, ya que es una de las más abundantes y extendidas (White, et al., 2014).

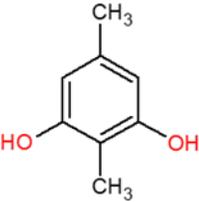
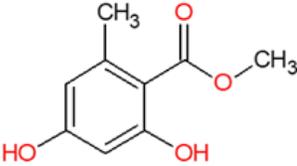
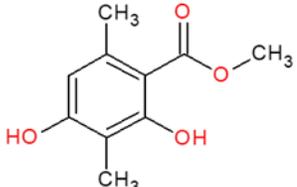
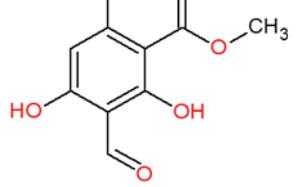
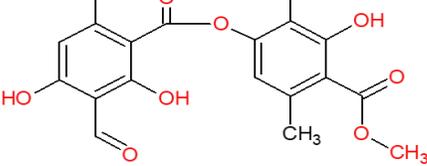
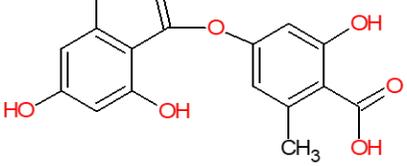
Por otra parte, la capacidad antioxidante aumenta en los líquenes que se encuentran expuestos a condiciones ambientales adversas, por ejemplo, alta irradiación y condiciones de sequedad o humedad como el caso de aquellos que se desarrollan en alta montaña o polos. Dicha actividad generada en esas condiciones es de importancia, ya que durante ciertos tipos de agresiones a los tejidos vivos se dan procesos de estrés oxidativo que acentúan los daños causados al organismo (Luo, et al., 2009).

Las sustancias liquénicas con mayor cantidad de estudios referentes a la actividad antioxidante son dibenzofuranos como el ácido úsnico; dépsidos como la atranorina, cloroatranorina, ácido evernínico, el ácido difractaico, ácido descarboxithamnolico y el ácido lecanórico; dépsidonas como el ácido estíctico, ácido lobárico, ácido protocetrárico, ácido fumarprotocetrarico, ácido estíctico, ácido salazínico y ácido fisódico; compuestos fenólicos simples como el metil orselinato y el ácido orselínico, el hematomato de metilo, el orcinol y el metil  $\beta$ -orselinato, ejemplo de estos se encuentran en la Tabla 2-2 (Fernández - Moriano, et al., 2015).

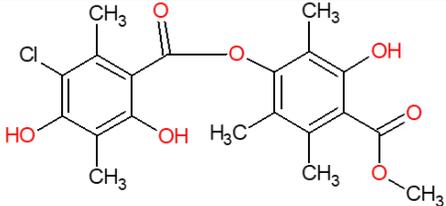
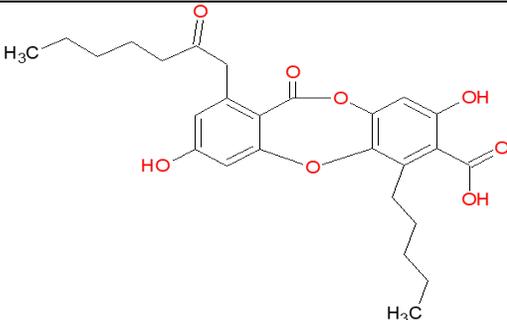
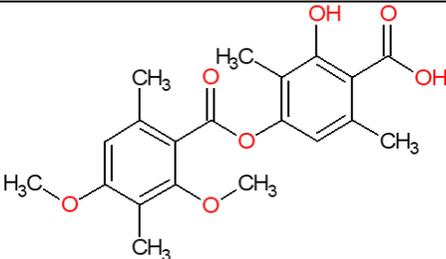
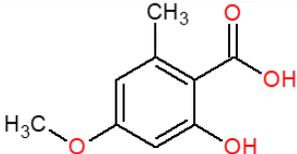
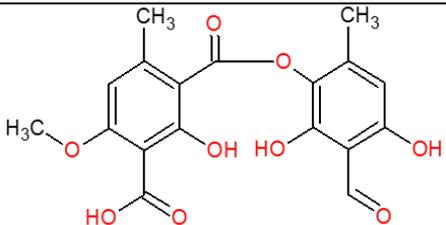
**Tabla 2 - 5.** Sustancias liquénicas con capacidad antioxidante.

Estructura	Mecanismo de acción	Referencia
 <p style="text-align: center;">ácido úsnico</p>	<p>Neuroprotector <i>in vitro</i> aumentando la supervivencia de células expuestas a daño oxidativo por peróxido de hidrógeno. Presenta reactividad frente a estrés por ozono y posee propiedades captadoras de radicales libres.</p>	<p>(De Paz, et al., 2010; Valencia - Islas, et al., 2007)</p>

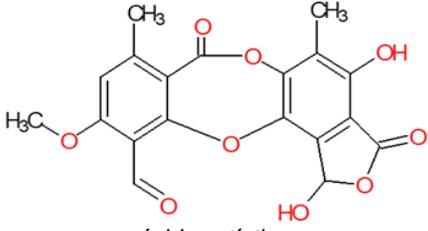
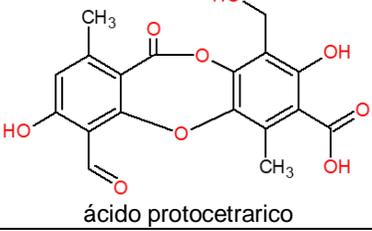
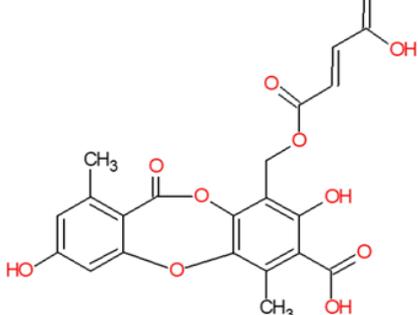
**Tabla 2 - 6.** (continuación). Sustancias liquénicas con capacidad antioxidante.

Estructura	Mecanismo de acción	Referencia
 <p>orcinol</p>	<p>Ensayos <i>in vitro</i> muestran que es un potente eliminador de NO, indicando propiedades captadoras de radicales libres.</p>	<p>(Thadhani, et al., 2011)</p>
 <p>metil orselinato</p>	<p>Inhíbe peroxidación de lípidos <i>in vitro</i>.</p>	<p>(Jayaprakasha, et al., 2000)</p>
 <p>ácido atrárico</p>	<p>Inhíbe peroxidación de lípidos <i>in vitro</i>.</p>	<p>(Güvenç, et al., 2012)</p>
 <p>hematomato de metilo</p>	<p>Posee poder captador de radicales libres, inhibidor de peroxidación de lípidos, poder reductor férrico, así como citoprotector de queratinocitos y de ADN frente a daño oxidativo.</p>	<p>(Thadhani, et al., 2011; Perico - Franco, et al., 2015a)</p>
 <p>atranorina</p>	<p>Posee poder captador de radicales libres, es un citoprotector y prooxidante. Aumenta la supervivencia de células expuestas a peróxido de hidrógeno, genera aumento en la peroxidación lipídica.</p>	<p>(Melo, et al., 2011; Valencia - Islas, et al., 2007)</p>
 <p>ácido lecanórico</p>	<p>Posee poder captador de radicales libres</p>	<p>(Thadhani, et al., 2011; Prashith Kekuda, et al., 2009)</p>

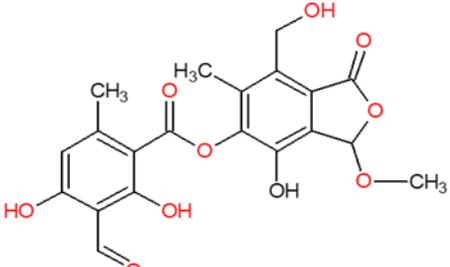
**Tabla 2 - 7.** (continuación). Sustancias líquénicas con capacidad antioxidante.

Estructura	Mecanismo de acción	Referencia
 <p style="text-align: center;">cloroatranorina</p>	<p>Posee poder captador de radicales libres. Presenta reactividad frente a estrés por ozono.</p>	<p>(Valencia - Islas, et al., 2007)</p>
 <p style="text-align: center;">ácido fisódico</p>	<p>Posee propiedades antioxidantes <i>in vitro</i>. A través de la eliminación de radicales y poder reductor.</p>	<p>(Konasić, et al., 2011)</p>
 <p style="text-align: center;">ácido difractaico</p>	<p>Inhibe la infiltración de neutrófilos en tejido mucoso gástrico mediante la disminución de factores prooxidantes ensayos <i>in vivo</i> y aumento las enzimas antioxidantes.</p>	<p>(Bayir, et al., 2006)</p>
 <p style="text-align: center;">ácido evernínico</p>	<p>Posee poder captador de radicales libres y reductor férrico.</p>	<p>(Konasić, et al., 2011; Tomovic, et al., 2019; Argüello - Galindo, 2019)</p>
 <p style="text-align: center;">ácido descarboxithamnólico</p>	<p>Posee poder captador de radicales libres y reductor férrico.</p>	<p>(Diaz - Santos, 2008)</p>

**Tabla 2 - 8.** (continuación). Sustancias liquénicas con capacidad antioxidante.

Estructura	Mecanismo de acción	Referencia
 <p>ácido estictico</p>	<p>Neuroprotector <i>in vitro</i> aumentando supervivencia de células expuestas a daño oxidativo por peróxido de hidrógeno.</p>	<p>(De Paz, et al., 2010)</p>
 <p>ácido salazínico</p>	<p>Neuroprotector <i>in vitro</i> aumentando la supervivencia de células expuestas a daño oxidativo por peróxido de hidrógeno. Presenta reactividad frente a estrés por ozono.</p>	<p>(De Paz, et al., 2010; Valencia - Islas, et al., 2007)</p>
 <p>ácido norstictico</p>	<p>Posee propiedades antioxidantes <i>in vitro</i>. A través de la captación de radicales libres, la captación de radical superóxido y el poder reductor.</p>	<p>(Ranković, 2015; Manojlovic, et al., 2012)</p>
 <p>ácido protocetrarico</p>	<p>Posee propiedades antioxidantes <i>in vitro</i>. A través de la captación de radicales libres, la captación de radical superóxido y el poder reductor.</p>	<p>(Manojlovic, et al., 2012)</p>
 <p>ácido fumarprotocetrarico</p>	<p>Posee poder captador de radicales libres y reductor férrico.</p>	<p>(Kosanić, et al., 2014)</p>

**Tabla 2 - 9.** (continuación). Sustancias liquénicas con capacidad antioxidante.

Estructura	Mecanismo de acción	Referencia
 <p style="text-align: center;">hypotrachyna B</p>	<p>Posee poder captador de radicales libres.</p>	<p>(Leal, et al., 2018)</p>

Debido a las diversas adaptaciones de los hongos liquenizados a una amplia variedad de condiciones extremas, especialmente a la radiación ultravioleta, estos organismos han desarrollado diferentes mecanismos de fotoprotección, como son la dispersión de la luz, la detección de radiación, la disipación térmica, la activación de la defensa antioxidante y de macromoléculas, además de la reparación de la membrana, que dependen en gran medida de la anatomía y morfología del talo vegetativo (Nguyen, et al., 2013). Uno de los mecanismos más importantes en la protección de los HL es la producción de compuestos capaces de absorber radiación UV, dentro de los cuales están los compuestos fenólicos (dépsidonas, despídos, difenil éteres), antraquinonas, xantonas o derivados de la ruta del ácido shikímico (calicina, micosporinas, scytonemina) depositándose en las hifas, ya sea en la corteza superior o en la médula interna y con una mayor acumulación en las partes superiores del talo (Boustie, et al., 2005).

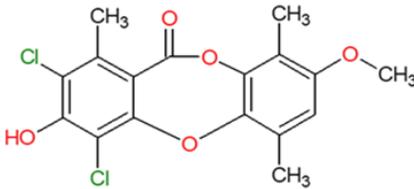
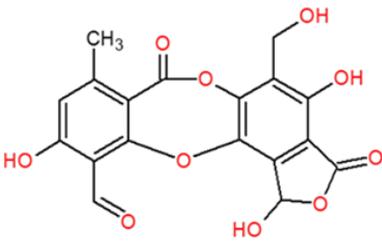
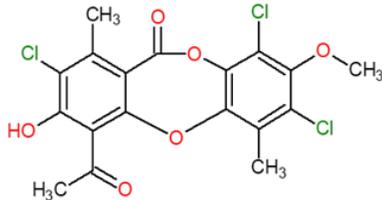
Los compuestos con propiedades fotoprotectoras de los HL comparten funciones duales ya que no solo cumplen funciones de protección contra la radiación UVB si no también contrarrestan el daño foto oxidativo. Ejemplo de ellas están las antraquinonas que absorben en el rango UVB, además las xantonas y los derivados del ácido pulvínico que son protectores UVA, dentro de los filtros UV más estudiados en los hongos liquenizados esta atranorina, la panarina y sus compuestos clorados, el ácido úsnico, parietina y la calicina (un derivado del ácido pulvínico) como se aprecia en la Tabla 2-3 (Boustie, et al., 2005).

De todos los compuestos evaluados se destaca la calicina por su potencial fotoprotector, debido a su relativa fotoestabilidad y a su carencia en producir fotodaño directo. Estos a menudo se cristalizan en la superficie de las hifas, generando la primera línea de defensa

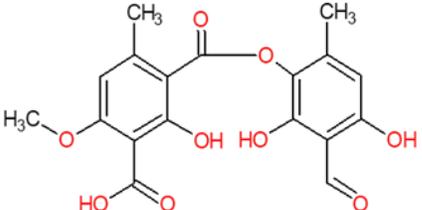
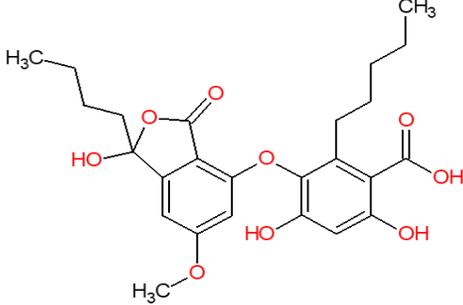
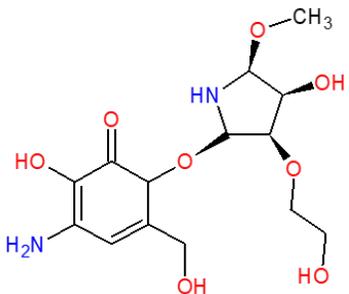
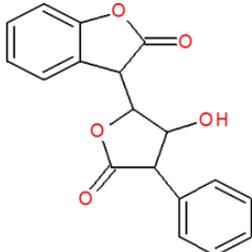
contra la RUV (Nguyen, et al., 2013). Los hongos en simbiosis con cianobacterias han demostrado la biosíntesis de sustancia con propiedades fotoprotectoras, es el caso de las micosporinas o aminoácidos tipo micosporina o sytonemina una alternativa prometedora en el empleo de compuestos de absorción de UV naturales, las cuales son moléculas pequeñas, incoloras, no cargadas, solubles en agua que presentan una alta fotoestabilidad (Cruz Jiménez, 2018).

Cabe resaltar que, en los últimos años, diferentes estudios se han centrado en la actividad fotoprotectora de las sustancias liquénicas, mencionan así una variedad de compuestos con dicha propiedad (Rojas, et al., 2015; Lohézic Le Dèvehat, et al., 2013; Cruz Jiménez, 2018; Ranković, 2015).

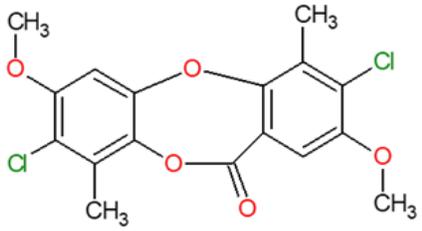
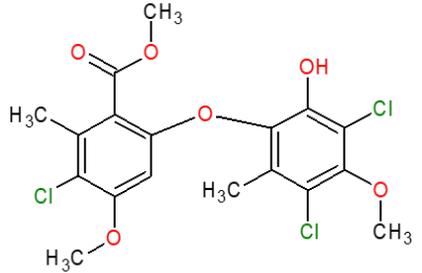
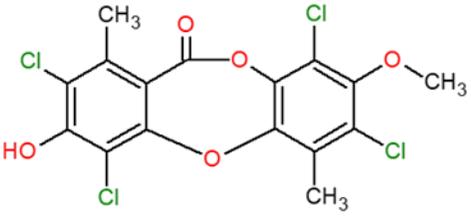
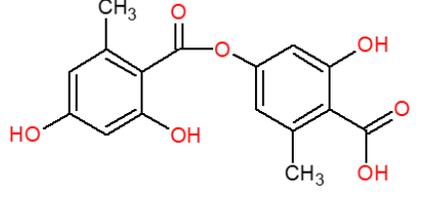
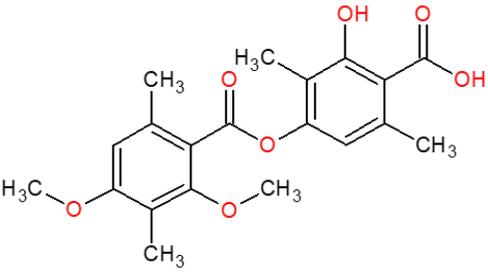
**Tabla 2 - 10.** Sustancias liquénicas con capacidad fotoprotectora.

Compuesto	Referencia
<b>Protección frente a la radiación UVA</b>	
 <p style="text-align: center;">vicanicina</p>	(Boehm, et al., 2009)
 <p style="text-align: center;">ácido salazínico</p>	(Le Dèveha, et al., 2013)
 <p style="text-align: center;">1-cloropannarina</p>	(Boehm, et al., 2009; Rancan, et al., 2002)

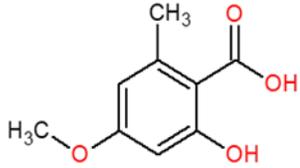
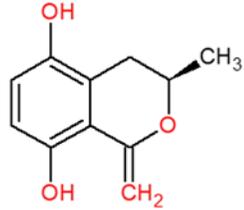
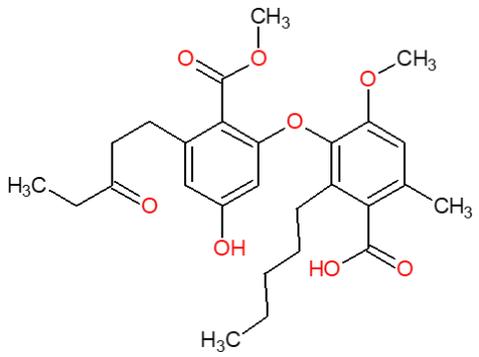
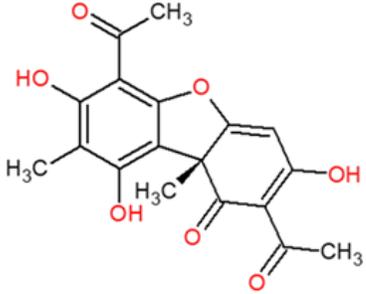
**Tabla 2 - 11.** (continuación). Sustancias liquénicas con capacidad fotoprotectora.

Compuesto	Referencia
<b>Protección frente a la radiación UVA</b>	
 <p>ácido descarboxithamnólico</p>	(Rojas, et al., 2015)
 <p>lobarina</p>	(Ismed, et al., 2012)
<b>Protección frente a la radiación UVB</b>	
 <p>collemina A</p>	(Torres, et al., 2004)
 <p>calicina</p>	(Boehm, et al., 2009)

**Tabla 2 - 12.** (continuación). Sustancias líquénicas con capacidad fotoprotectora.

Compuesto	Referencia
<b>Protección frente a la radiación UVB</b>	
 <p style="text-align: center;">scencidina</p>	(Milot, et al., 2012)
 <p style="text-align: center;">buellina</p>	(Milot, et al., 2012)
 <p style="text-align: center;">diploicina</p>	(Milot, et al., 2012)
 <p style="text-align: center;">ácido girofórico</p>	(Varol, et al., 2015)
 <p style="text-align: center;">ácido difractaico</p>	(Nguyen, et al., 2013)

**Tabla 2 - 13.** (continuación). Sustancias liquénicas con capacidad fotoprotectora.

Compuesto	Referencia
<b>Protección frente a la radiación UVB</b>	
 <p style="text-align: center;">ácido evernínico</p>	(Nguyen, et al., 2013; Argúello - Galindo, 2019)
 <p style="text-align: center;">(3R)-5-hidroximelleina</p>	(Zhao, et al., 2017)
<b>Protección frente a la radiación UVA/UVB</b>	
 <p style="text-align: center;">ácido epiforelico II</p>	(Boehm, et al., 2009; Rancan, et al., 2002)
 <p style="text-align: center;">ácido úsnico</p>	(Boehm, et al., 2009; Rancan, et al., 2002; Varol, et al., 2015; Rojas, et al., 2015)

## 2.5 *Everniastrum cirrhatum*



Figura 2 -10. *Everniastrum cirrhatum* (André , 2007).

### 2.5.1 Taxonomía

El género *Everniastrum* posee 7 especies: *E. catawbiense* (Degel.) Hale, *E. cirrhatum* (Fr.) Hale, *E. columbiense* (Zahlbr.) Hale, *E. fragile* Sipm. spec. nov., *E. planum* Sipm. spec. nov., *E. sorocheilum* (Vain.) Hale y finalmente el *E. vexans* (Zahlbr.) Hale.

*E. cirrhatum* (Fr.) Hale se encuentra en la División: Ascomycota, Subdivisión: Pezizomycotina, Clase Lecanoromycetes, Orden: Lecanorales, Familia: Parmeliaceae y Género: *Everniastrum*. Es conocido también como *Cetrariastrum cirrhatum*, *Parmelia cirrhatum*, *Hypotrachyna cirrhatum* y *P. vermicularis* Vain.

*E. cirrhatum* (Fr.) es un HL folioso con apariencia fruticulosa, que se caracteriza por lóbulos lineales y laciniados de color gris, regularmente ramificado de forma dicotómica, generalmente en espiral o incluso subtubular, su talo esta disminuido y está ligeramente unido al sustrato y colgando en la naturaleza, sus apicales tienen unas dimensiones 2 - 6 mm de ancho y 10 cm de largo como se observa en la Figura 2-10. Los apotecios en forma de copa con disco fuertemente cóncavo que se vuelven lamínales después de 0.5 cm de ancho, los márgenes son inflexos con cilios de color negro y las esporas son grandes (Aguirre, 2006).

El alga en asociación es *Trebouxie*, alga unicelular de un color verde intenso, provista de un inmenso cloroplasto, redondeada con paredes gruesas de 5-9 nanómetros de diámetro (Lima - Gerlanch, et al., 2013).

## 2.5.2 Hábitat y distribución

La especie está ampliamente distribuida en Europa, Asia-tropical, América del Norte (incluyendo México), América del sur, Oceanía e islas del pacífico (Melanesia, Micronesia y Polinesia), en zonas tropicales montañosas, aunque algunas de las especies están restringidas a zonas de neotrópico, referenciado por El *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF) (Figura 2-11). La mayoría de las especies que existen en Colombia se encuentran alrededor de los 3000 y 3500 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m), proceden de la Cordillera Oriental (Cocuy a Sumapaz), la Cordillera Central (Ruiz y Tolima), cerca de Ecuador la altitud es menor y probablemente la especie está muy extendida todo por los andes colombianos (Sipman, 1980).



**Figura 2 - 11.** Ubicación Geográfica del *Everniastrum cirrhatum* (EOL, 2015; GBIF, 2013). En color amarillo y anaranjado, se indica su ubicación.

Todas las especies de *Everniastrum* se encuentran generalmente entre cojines gruesos de briófitas, en lugares abiertos, en suelo y rocas, pero también como epífita en troncos, en sitios bastante húmedos, donde prevalecen la niebla y la lluvia durante la mayor parte del año. En Colombia tales sitios, se encuentran en bosques y páramos andinos superiores. Por otro lado, la morfología del talo es un rasgo adaptativo de estos taxones, dadas las condiciones medioambientales en las que crecen, ya que los lóbulos estrechos y ciliados mejoran la evaporación, permitiendo así el líquen se seque periódicamente, mientras que la reducción de rizinas podría ser visto como un impedimento para la absorción de agua del sustrato (Yanez - Ayabaca, 2009).

### 2.5.3 Usos tradicionales y propiedades medicinales

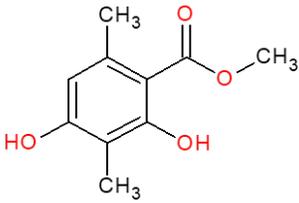
En los usos y conocimiento tradicionales que se le han dado al *Everniastrum cirrhatum* ha sido considerado como alimento empleándose como aromatizante, especia y acompañante de diversos platillos en diferentes comunidades (Upreti, et al., 2015). También ha sido empleado con fines culturales en rituales o sacrificios y se evidencia valor de lecho, valor estético y decorativo y valor etnoveterinario desde milenios (Devkota, et al., 2017).

En la medicina tradicional se utiliza por su capacidad astringente, resolvente, laxante, carminativo y afrodisíaco, útil en el sangrado de heridas y moretones. También se ha empleado para tratamiento de la lepra, la bronquitis y la salivación excesiva, además, se le atribuyen propiedades antisépticas, antibacterial, antifúngicas, cardio protectoras, antiobesidad, anticancerígenas y antioxidantes (Pol, et al., 2017; Devkota, et al., 2017; Kumar, et al., 2014).

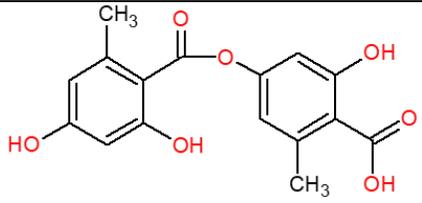
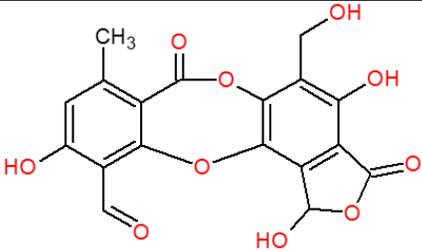
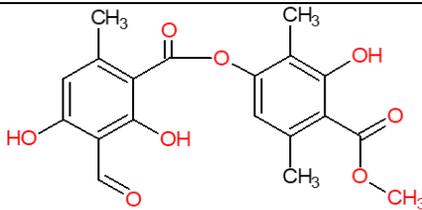
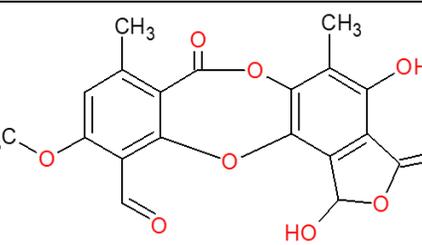
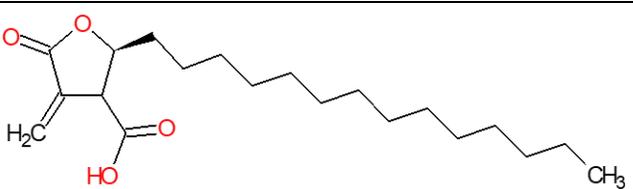
### 2.5.4 Sustancias aisladas y reportadas

Para la familia Parmeliaceae a la cual pertenece la especie *Everniastrum cirrhatum* se han reportado compuestos principales corticales correspondientes: atranorina, cloroatranorina, ácido úsnico e isoúsnico y liquexantonas, existen evidencias que estos compuestos tienen un papel en la protección de la capa algal de la simbiosis contra la radiación solar. Algunas especies como la *Parmelina swinscowii* (Hale) han reportado la presencia de ácido lobárico (Sipman, 1980). Para la especie *Everniastrum cirrhatum* se han reportan pocos compuestos dentro de ellos, los mayoritarios como el ácido salazínico, al ácido estíctico, la atranorina y en menor cantidad el ácido girofórico, ácido protoliquesterínico y el ácido atrárico como se observa en la Tabla 2-4 (Shukla, et al., 2016).

**Tabla 2 - 14.** Metabolitos secundarios reportados para *Everniastrum cirrhatum*.

Estructura	Referencia
 <p style="text-align: center;">ácido atrárico</p>	(Khanuja Singh, et al., 2005)

**Tabla 2 - 15.** (continuación). Metabolitos secundarios reportados para *Everniastrum cirrhatum*.

Estructura	Referencia
 <p style="text-align: center;">ácido girofórico</p>	<p>(Shukla, et al., 2016; Sipman, 1980)</p>
 <p style="text-align: center;">ácido salazínico</p>	<p>(Prashith Kekuda, et al., 2011; Shah, 2014)</p>
 <p style="text-align: center;">atranorina</p>	<p>(Prashith Kekuda, et al., 2011; Shah, 2014)</p>
 <p style="text-align: center;">ácido estíctico</p>	<p>(Sipman, 1980)</p>
 <p style="text-align: center;">ácido protoliquesterínico</p>	<p>(Prashith Kekuda, et al., 2011; Shah, 2014)</p>

### 3. Hipótesis

Considerando que las especies: *Everniastrum cirrhatum*, *Peltigera neopolydactyla* y *Sticta humboldtii* son líquenes que crece en el páramo de Sumapaz, ecosistema sometido constantemente a condiciones ambientales extremas incluida la alta radiación ultravioleta, es de esperar que sean fuentes de compuestos antioxidantes y/o fotoprotectores con posible utilidad para la prevención de cáncer de piel.

## 4. Materiales y métodos

El trabajo fitoquímico se realizó en el laboratorio 319 del Departamento de Farmacia y los ensayos de actividad antioxidante y fotoprotectora en el laboratorio 126 del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia. Este trabajo fue financiado por la Dirección de Investigación y Extensión de la Sede Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, bajo el proyecto Hermes: 35978.

### 4.1 Selección de la especie objeto de estudio

#### 4.1.1 Recolección

Los hongos liquenizados *Peltigera neopolydactyla*, *Everniastrum cirrhatum* y *Sticta humboldtii*, fueron recolectados en el Parque Natural Sumapaz bajo las directrices técnicas del OtroSi No.4 del Contrato Marco de Acceso de Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No.121 del 22 de enero de 2016 suscrito ante el Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible y la Universidad Nacional de Colombia. En la Tabla 4-1 se presenta los datos de recolecta.

**Tabla 4 - 1.** Datos de recolección del material liquénico objeto de estudio.

Especie	<i>Everniastrum cirrhatum</i>	<i>Peltigera neopolydactyla</i>	<i>Sticta humboldtii</i>
Lugar	Parque Nacional Natural Sumapaz. Laguna de Chisacá Localidad 20 Sumapaz, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, Colombia.		
Coordenadas geográficas	04° 07.574´ N 074° 14.801´ O	04° 09.233´ N 074° 14.353´ O	04° 07.920´ N 074° 14.697´ O
Sustrato	Corteza	Musgo	Corteza
Vegetación asociada	Musgo y hepáticas		
Altitud (m s.n.m)	3832	3700	3834
Temperatura ambiental promedio (°C)	2 a 8		
Recolectores	José L. Rojas y Norma A. Valencia		
No COL	609190	609191	609192

## **4.1.2 Operaciones previas a la preparación de extractos**

El material recolectado se lavó con agua destilada y se limpió manualmente, retirando musgos, hepáticas, plantas o cortezas que le sirven como sustrato. Una vez limpio, se colocó en charolas y se secó en estufa de aire circulante (no mayor de 45 °C; 5 días). El material seco se fragmentó en molino de discos hasta obtener un polvo fino.

## **4.1.3 Extracción en pequeña escala**

Una porción (10 g) del hongo liquenizado pulverizado se extrajo con acetona por maceración asistida por ultrasonido (1 h) a temperatura ambiente. Los extractos resultantes se filtraron y concentraron a presión reducida en rota evaporador, obteniéndose los extractos secos.

## **4.1.4 Evaluación preliminar de la actividad antioxidante**

### **4.1.4.1 Cuantificación del poder captador de radicales libres**

Con la finalidad de seleccionar al hongo liquenizado que sería objeto de estudio, los extractos acetónicos obtenidos en pequeña escala de las diferentes especies fueron sometidos a la cuantificación de su poder captador de radicales libres en el modelo del radical DPPH•, de acuerdo con la metodología de Brand Williams, et al., 1995, tal y como se describe en la sección 4.3.2.1.

## **4.1.5 Evaluación preliminar de la actividad fotoprotectora**

### **4.1.5.1 Cuantificación de la actividad fotoprotectora frente a la radiación UVB a través del factor de protección solar (FPS)**

De manera adicional, a los extractos acetónicos se les evaluó su actividad fotoprotectora determinando su Factor de Protección Solar (FPS) mediante la técnica espectrofotométrica de Mansur, et al., 1986, tal y como se describe en la sección 4.3.3.1

## **4.2 Estudio químico de la especie objeto de estudio**

### **4.2.1 Procedimientos generales experimentales**

Para la obtención y purificación de los compuestos se emplearon métodos fitoquímicos convencionales de cromatografía en columna (CC) abierta y tipo flash; cromatografía en

capa fina (CCD) analítica y preparativa (CCDP); cristalización y recristalización. La CC abierta fue realizada sobre gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm, Merck). La cromatografía en capa delgada se llevó a cabo sobre cromatofolios de aluminio (gel de sílice 60 F 254, 0.25 mm, Merck) y la CCD preparativa se realizó sobre cromatoplasmas de vidrio cubiertas por gel de sílice (60 F 254, Merck) hechas a mano. El monitoreo del fraccionamiento y separación se verificó por cromatografía CCD mientras que la pureza de los compuestos se verificó por cromatografía CCD uní y bidimensional en al menos 3 sistemas de elución diferentes y por el punto de fusión. Los agentes reveladores utilizados fueron: luz UV ( $\lambda$  254 nm), yodo sublimado; ácido sulfúrico (10 % más calentamiento a 100 °C); solución de vainillina (1 %) en ácido orto-fosfórico y resorcinol según la necesidad. En la Tabla 4-2 se presentan las fases móviles utilizadas para la elución de las CCD (Huneck, 1999; Orange, et al., 2001).

**Tabla 4 -2.** Sistemas de elución para cromatografía en capa delgada para liquenoquímicos.

Sistema	Disolventes	Proporción
Fase A	tolueno:dioxano:ácido acético	90:25:4
Fase C	tolueno:ácido acético	185:15
Fase G	tolueno:acetato de etilo:ácido fórmico	139:83:8
Fase P*	cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua	50:20:17: 5:5
Fase Q*	acetona:diclorometano:metanol	4:4:1
Fase S*	H <sub>2</sub> O:n-butanol:ácido acético	5:12:3

\*Nombres opcionales para las fases utilizadas.

Los puntos de fusión fueron determinados en un fusiómetro Büchi SMP-20 y no están corregidos. Los espectros de infrarrojo (IR) se tomaron en pastilla de bromuro de potasio (KBr) en un espectrofotómetro infrarrojo compacto basado en transformadas de Fourier IRAffinity-1S (Shimadzu) y fueron procesados mediante el programa IRsolution. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno y de carbono se adquirieron en un espectrofotómetro Bruker Avance 400, empleando como referencia tetrametilsilano (TMS) y alguno de los siguientes disolventes deuterados: CHCl<sub>3</sub> (99.8 atom % d<sub>6</sub>) y DMSO (99.8 atom % d<sub>6</sub>). Los espectros fueron procesados mediante el programa MestreNOVA V6.0.2-5475 en versión de prueba (Mestrelab Research, 2009).

Los reactivos empleados fueron grado analítico: ácido acético (AcOH), ácido fórmico (HCOOH) y al igual que los disolventes: cloroformo (CHCl<sub>3</sub>, 99.0 %), éter etílico (99.7 %), dioxano (99.2 %), metanol (MeOH, 99.5 %) (Merck); acetato de etilo (AcOEt, 99.5 %), diclorometano (DCM), 99.0 %, *n*-hexano (*n*-hex, 95.0 %), tolueno (tol, 99.5 %) (Mallinckrodt), acetona (Me<sub>2</sub>CO, 99.0 %) y etanol (EtOH, 96.0 %). Los reactivos empleados para las pruebas de coloración del talo liquénico con fines de confirmación taxonómica que, a su vez indicativo de la presencia de diversos grupos liquénicos, se muestran en la Tabla 4-3.

**Tabla 4 - 3.** Reactivos de coloración para talo liquénico con fines de identificación taxonómica (Orange, et al., 2001).

Reactivo	Composición	Coloración positiva	Grupo de liquenoquímicos presente
C	Solución acuosa saturada de hipoclorito de sodio	rosado, rojas, naranjas o verdes	Cromonas, xantonas dibenzofuranos y dépsidos
K	Solución acuosa de hidróxido de potasio (10-25 %)	amarillo hasta el rojo o pardo.	Dépsidos, dépsidonas y quinonas
Pd	p-fenilendiamina (1 g), sulfito de sodio (10 g), agua (100 mL) y detergente líquido comercial (40 gotas).	amarilla que se torna rojizo	Dépsidos y dépsidonas
FeCl <sub>3</sub>	Solución de cloruro férrico	café intenso	OH fenólico.

#### **4.2.2 Confirmación de la identidad taxonómica de la especie objeto de estudio**

Una vez seleccionado el *Everniastrum cirrhatum* como especie objeto de estudio, su identidad taxonómica fue corroborada empleando las claves taxonómicas de Sipman, et al., 1982 determinando la consistencia de las características morfológicas, anatómicas y químicas del talo con las indicadas en claves. Este proceso fue realizado por el MSc. Roberto Dávila Villamizar, director de la Fundación para el Estudio de la Biodiversidad en Colombia (FUNBIOCOL) (Tabla 4-4). Cabe mencionar, que una muestra de referencia del hongo liquenizado reposa en el Herbario Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia con el número COL 609190.

**Tabla 4 - 4.** Características morfológicas y de coloración de talo de *Everniastrum cirrhatum* para confirmación de su identidad taxonómica.

 <p style="text-align: center;"><i>Everniastrum cirrhatum</i> (André , 2007)</p>			
<b>Morfología</b>		Liquen foliáceo, cortícola, de talo aplanado y ramificado dicotómicamente, corteza superior de color blanco, variablemente isidiada, con o sin cilios marginales, su corteza inferior marrón o negras, con o sin rizinas. Sus apotecios poco frecuentes, esporas elipsoidales.	
<b>Taxónomo</b>		MSc. Roberto Dávila	
<b>Pruebas de coloración del talo</b>		Reactivos: K <sup>+</sup> Pd <sup>+</sup> FeCl <sub>3</sub> <sup>+</sup>	
<b>Familia</b>	Parmeliaceae	<b>Especie</b>	<i>Everniastrum cirrhatum</i> (Fr.) Hale ex Sipman

### 4.2.3 Extracción a mayor escala del hongo liquenizado objeto de estudio

*Everniastrum cirrhatum* (100 g) seco y molido se extrajo con acetona por maceración asistida por ultrasonido (8 ciclos x 1 h) a temperatura ambiente. El extracto resultante se filtró y concentró a presión reducida en rota evaporador, obteniéndose el extracto seco color gris-verdoso (11.436 g).

### 4.2.4 Fraccionamiento del extracto

El extracto acetónico de *E. cirrhatum* (9.436 g) se sometió a partición liquido-liquido utilizando disolventes de baja, media y alta polaridad. Inicialmente se suspendió en agua (500 mL) y se extrajo sucesivamente con *n*-hexano (3 x 200 mL), éter etílico (3 x 200 mL) y acetato de etilo (3 x 200 mL). Las fases fueron evaporadas al vacío dando lugar a la fase de *n*-hexano (FI), éter etílico (FII) y acetato de etilo (FIII). La fracción acuosa se evaporó y se lavó por suspensión con acetona, filtrando al vacío dando lugar al filtrado que constituyó

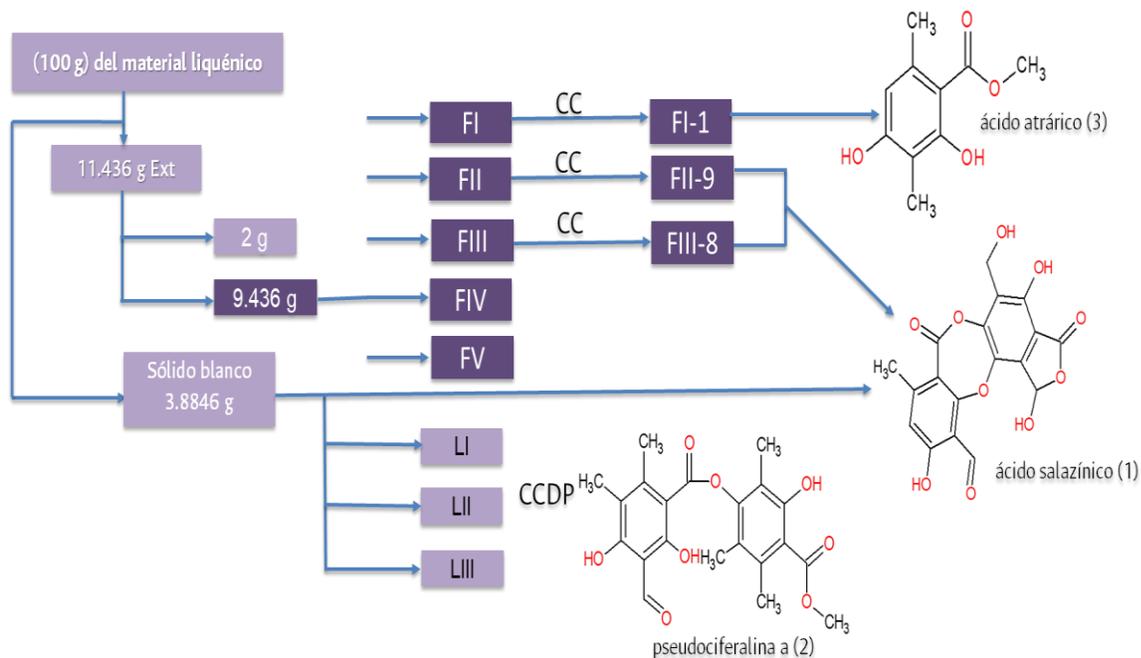
la fracción acetónica (FIV) y a la fase acuosa (FV) que quedó retenida en el filtro. (Tabla 4-5)

**Tabla 4 - 5.** Fraccionamiento primario por partición líquido-líquido del extracto acetónico de *Everniastrum cirrhatum*.

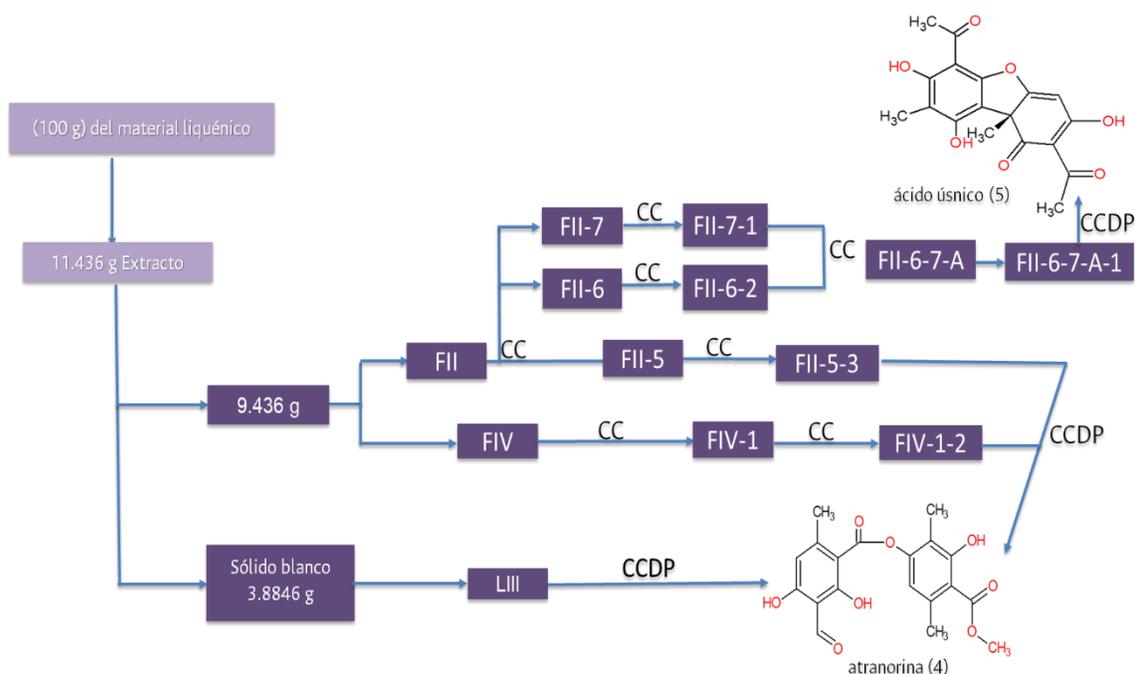
Disolvente	Peso final (g)
FI	0.1550
FII	0.9886
FIII	0.4156
FIV	0.4617
FV	0.8036

#### 4.2.5 Aislamiento y purificación de compuestos

En las figuras 4-1a y 4-2a, se muestra el esquema de aislamiento y purificación de compuestos llevado a cabo en este trabajo.



**Figura 4 - 1<sup>a</sup>.** Aislamiento y purificación de compuestos de *E. cirrhatum*.



**Figura 4 - 2ª.** Aislamiento y purificación de compuestos de *E. cirrhatum*.

#### 4.2.5.1 Obtención de ácido salazínico (1)

Durante la extracción, precipitó un sólido color grisáceo (3.8846 g) que se lavó por suspensión y posterior filtración con  $\text{CHCl}_3$  (10 mL),  $\text{AcOEt}$  (10 mL) y  $\text{DCM}$  (10 mL). Los líquidos de lavado se evaporaron a sequedad dando origen a tres fracciones de lavado: LI (10 mg), LII (58.9 mg) y LIII (149.0 mg), respectivamente. El sólido resultante (S) (3.1966 g), se recrystalizó con una mezcla  $\text{Me}_2\text{CO}:\text{H}_2\text{O}$  (2:1) conduciendo a la obtención de un sólido amorfo de color blanco (3.1366 g), medianamente soluble en  $\text{Me}_2\text{CO}$  y totalmente soluble  $\text{DMSO}$ . Pf. ( $^\circ\text{C}$ ): 255 (descomposición). IR (KBr)  $V_{\text{max}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3576 y 3298 (OH), 1774 (C=O), 1743 (C=O), 1662 (C=C), 1558 (C=C), 1438 (C=C), 1261 (C-O), 1199 (C-O), 1080 (C-O); RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ ) (ppm): 2.45 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -9), 4.65 (2H, s,  $-\text{CH}_2$ -8'), 6.81 (1H, s, H-5), 6.88 (1H, s, H-9'), 8.30 (1H, s, OH-8'), 10.44 (1H, s, CHO-8); RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ ) (ppm): C-1: 112.4, C-2: 164.0, C-3: 111.1, C-4: 164.4, C-5: 117.8, C-6: 152.75, C7:160.7, C-8: 198.2, C-9: 21.8, C-1': 111.1, C-2': 153.2, C-3': 123.8, C-4': 148.5, C-5': 138.4, C-6': 137.7, C-7': 166.4, C-8': 53.1, C-9': 95.3. (Espectros 9-1 a 9-3, Anexo). Esta sustancia fue identificada como ácido salazínico por comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados por la literatura (Huneck, 1999; Eifler - Lima, et al., 2000).

Mayor cantidad de ácido salazínico se obtuvo de la siguiente manera: La fracción primaria etérea (FII) (0.9886 g) fue sometida a CC abierta sobre gel de sílice (50 g) eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de *n*-hex:tol (100:0 → 0:100), tol:CHCl<sub>3</sub> (100:0 → 0:100), CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (100:0 → 0:100), AcOEt:DCM (100:0 → 0:100), DCM:Me<sub>2</sub>CO (100:0 → 0:100), Me<sub>2</sub>CO:MeOH (100:0 → 0:100), MeOH (100), obteniéndose 183 fracciones (2.0 mL) (Tabla 4-6), que fueron agrupadas en 9 fracciones combinadas, según su similitud en CCD en fase móvil C y G.

**Tabla 4 - 6.** Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción primaria etérea (FII).

Fase móvil	Proporción	Fracción	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -hex	100	1-5	1-12	FII-1	16.1
<i>n</i> -hex:tol	50:50	6-30			
<i>n</i> -hex:tol	25:75	31-43			
tol	100	44-50	13-18	FII-2	6.5
tol:CHCl <sub>3</sub>	50:50	51-56	19-38	FII-3	16.4
CHCl <sub>3</sub>	100	57-76	39-42	FII-4	23.5
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	50:50	77-99	43-64	FII-5	15.6
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	25:75	100-116			
AcOEt	100	117-127	65-82	FII-6	175.9
AcOEt:DCM	50:50	128-134			
AcOEt:DCM	25:75	135-143			
DCM	100	144-150	83-104	FII-7	123.0
DCM:MeOH	50:50	151-158	105-132	FII-8	328.0
DCM:MeOH	25:75	159-165	133-183	FII-9	166.5
MeOH	100	166-183			

De manera paralela, la fracción primaria de acetato de etilo FIII (0.4156 g) se sometió a CC tipo flash sobre gel de sílice (20.75 g), eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de *n*-hex:tol (100:0 → 0:100), tol:AcOEt (100:0 → 0:100), AcOEt:DCM (100:0 → 0:100), DCM:Me<sub>2</sub>CO (100:0 → 0:100), Me<sub>2</sub>CO:MeOH (100:0 → 0:100) y MeOH (100), obteniéndose 113 fracciones (100 mL), que fueron agrupadas en 10 fracciones combinadas (Tabla 4-7), según su similitud en CCD en fase móvil C y G.

**Tabla 4 - 7.** Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción primaria de acetato de etilo (FIII).

Fase móvil	Proporción	Fracción	Fraciones combinadas	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -hex	100	1-4	1-8	FIII-1	18.5
<i>n</i> -hex:tol	50:50	5-8			
<i>n</i> -hex:tol	30:60	9-13	9-25	FIII-2	13.5
<i>n</i> -hex:tol	25:75	14-17			
tol	100	18-28			
tol:AcOEt	60:30	29-34	26-29	FIII-3	6.8
tol:AcOEt	25:75	35-45	30-37	FIII-4	9.6
AcOEt	100	46-49	38-49	FIII-5	25.6
AcOEt:DCM	60:30	50-57			
AcOEt:DCM	25:75	58-71	50-64	FIII-6	21.8
DCM	100	72-75			
DCM:Me <sub>2</sub> CO	60:30	76-79	65-71	FIII-7	12.3
DCM:Me <sub>2</sub> CO	25:75	80-88			
Me <sub>2</sub> CO	100	89-98	72-79	FIII-8	116.4
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	60:30	99-103	80-89		
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	25:75	104-108	90-95		
			96-99		
MeOH	100	109-113	100-105	FIII-9	48.9
			106-113	FIII-10	65.4

La reunión y recristalización posterior de las fracciones FII-9 (166.5 mg) (Tabla 4-6) y FIII-8 (116.4 mg) (Tabla 4-7) de mezcla Me<sub>2</sub>CO:H<sub>2</sub>O (2:1) condujo a la obtención de una mayor cantidad de ácido salazínico (200.0 mg) (Figura 4-1a).

#### 4.2.5.2 Obtención de la pseudocifelarina A (2)

El residuo del lavado LII (58.9 mg) se sometió a cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) sobre gel de sílice en fase C (Figura 4-1a). Este proceso condujo a la obtención de un sólido amorfo de coloración rosado (18.4 mg) medianamente soluble en CHCl<sub>3</sub> y AcOEt y altamente soluble en DCM. Pf (°C): 162-164. IR (KBr)  $V_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2924 (H-C, sp<sup>3</sup>), 1654 (C=O), 1577 (C=C), 1438 (C=C o CH<sub>3</sub>), 1253 (C-O), 1172 (C-O), 1118 (C-O), 1076 (C-O); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub>) (ppm): 2.09 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8'), 2.11 (3H, s, CH<sub>3</sub>-10'), 2.21 (3H, s, CH<sub>3</sub>-10), 2.50 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9'), 2.73 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9), 4.01 (3H, s, 7-COOCH<sub>3</sub>), 10.40 (1H, s, CHO-8), 11.14 (1H, s, HO-2'), 12.41 (1H, s, HO-2), 13.10 (1H, s, HO-4). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub>): C-1: 102.8, C-2: 166.9, C-3: 107.9, C-4: 166.1, C-5: 118.2, C-6: 151.5, C-7: 169.7, C-8: 193.7, C-9: 10.8, C-10: 13.2, C-1': 116.1, C-2': 158.9, C-3': 111.8, C-4': 150.1, C-5': 120.5, C-6': 137.6, C-7': 172.1, C-8': 9.7, C-9': 18.9, C-10': 20.5, C-7-COOMe: 52.3. (Espectros 9-5 a 9-7 Anexo). Esta sustancia fue identificada como

pseudocifelarina A por comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados por la literatura (Huneck, 1984; Huneck, 1999).

#### 4.2.5.3 Obtención del ácido atrárico (3)

La fracción primaria de *n*-hexano (FI) (0.155 g) se sometió a CC abierta sobre gel de sílice (8.0 g) eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de *n*-hex:tol (100:0 → 0:100), tol:CHCl<sub>3</sub> (100:0 → 0:100), CHCl<sub>3</sub>:AcOEt (100:0 → 0:100), AcOEt:DCM (100:0 → 0:100), DCM:Me<sub>2</sub>CO (100:0 → 0:100) y Me<sub>2</sub>CO-MeOH (100:0 → 0:100), obteniéndose 185 fracciones (2.5 mL), que fueron agrupadas en 8 fracciones combinadas (Tabla 4-8), según su similitud en CCD en sistemas C y G.

**Tabla 4 - 8.** Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción FI.

Fase móvil	Proporción	Fracción	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -hex	100	1-5	1-44	FI-1	41.2
<i>n</i> -hex:tol	80:20	6-10			
<i>n</i> -hex:tol	70:30	11-24			
<i>n</i> -hex:tol	50:50	25-34			
<i>n</i> -hex:tol	30:70	35-39			
<i>n</i> -hex:tol	20:80	40-44			
tol	100	45-49	45-71	FI-2	7.0
tol:CHCl <sub>3</sub>	80:20	50-57	72-79	FI-3	20.2
tol:CHCl <sub>3</sub>	50:50	58-64			
tol:CHCl <sub>3</sub>	30:70	65-71			
tol:CHCl <sub>3</sub>	10:90	72-79	80-89	FI-4	16.1
CHCl <sub>3</sub>	100	80-88	90-106	FI-5	33.4
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	80:20	89-97			
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	70:30	98-107			
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	50:50	108-116	107-120	FI-6	6.5
AcOEt	100	117-122	121-149	FI-7	10.0
AcOEt:DCM	70:30	123-128			
AcOEt:DCM	50:50	129-136			
AcOEt:DCM	30:70	137-146	150-185	FI-8	17.5
DCM	100	147-153			
DCM:Me <sub>2</sub> CO	50:50	154-160			
Me <sub>2</sub> CO	100	161-167			
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	50:50	168-174			
MeOH	100	175-185			

La fracción FI-1 (41.2 mg) se sometió a CCD preparativa en sistema *n*-hex:CHCl<sub>3</sub> (10:90). Este proceso permitió obtener un sólido cristalino color amarillo claro (9.64 mg), soluble en CHCl<sub>3</sub>, AcOEt y DCM. Pf (°C): 130-132 °C. IR (KBr)  $V_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2924 (C-H sp<sup>3</sup>), 1639 (C=O), 1600 (C=C), 1500 (C=C), 1450 (C-H sp<sup>3</sup>), 1273 (C-O), 1195 (C-O), 1161 (C-O), 1111 (C-O), 1033 (C-O); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub>) (ppm): 2.12 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8), 2.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9), 3.94 (3H, s, -COOCH<sub>3</sub>), 6.23 (1H, s, H-5), 12.05 (1H, s, OH-2). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub>) (ppm): C-1: 105.2, C-2: 158.1, C-3: 108.5, C-4: 163.1, C-5: 110.5, C-6: 140.1, C-7: 172.6, C-8: 7.6, C-9: 24.0, -COOCH<sub>3</sub>: 51.7. (Espectros 9-10 a 9-12 Anexo). Esta sustancia fue identificada como ácido atrárico por comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura (Huneck, 1999; Ahad, et al., 1991). Adicionalmente, la fracción FII-5-2 contuvo mayor cantidad de este compuesto (1.96 mg) (Tabla 4-11), (Figura 4-1a).

#### 4.2.5.4 Obtención de la atranorina (4)

El residuo del lavado LIII (149.0 mg) se sometió a cromatografía en capa fina preparativa (CCDP) en sistema C, obteniéndose un sólido cristalino incoloro (85.7 mg); medianamente soluble en CHCl<sub>3</sub>, AcOEt y altamente soluble en DCM. Pf (°C): 176-178. IR (KBr)  $V_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2931 (H-C sp<sup>3</sup>), 1654 (C=O), 1581 (C=C), 1450 (C=C o CH<sub>3</sub>), 1408 (C=C o CH<sub>3</sub>), 1357 (CH<sub>3</sub>), 1273 (C-O), 1168 (C-O), 1107 (C-O), 1076 (C-O); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub>) (ppm): 2.12 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8'), 2.71 (6H, s, CH<sub>3</sub>-9, CH<sub>3</sub>-9'), 4.0 (3H, s, 7'-COOCH<sub>3</sub>), 6.43 (1H, s, H-5), 6.54 (1H, s, H-5'), 10.38 (1H, s, CHO-8), 11.95 (1H, s, HO-2'), 12.52 (1H, s, HO-2), 12.57 (1H, s, HO-4). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub>) (ppm): C-1: 102.8, C-2: 169.1, C-3: 108.5, C-4: 167.0, C-5: 112.8, C-6: 152.4, C-7: 169.7, C-8: 193.8, C-9: 25.5, C-1': 116.8, C-2': 162.8, C-3': 110.3, C-4': 152.0, C-5': 116.0, C-6': 139.8, C-7': 172.2, C-8': 23.8, C-9': 9.3, C-7'-COOCH<sub>3</sub>: 52.3. (Espectros 9-14 a 9-16 Anexo). Esta sustancia fue identificada como atranorina por comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados por la literatura (Huneck, 1999; Nasser, et al., 2009).

Cantidad adicional de atranorina se obtuvo de la siguiente manera: La fracción primaria acetónica FIV (0.4617 g) se sometió CC tipo flash sobre gel de sílice (16.0 g), eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de *n*-hex:tol (100:0 → 0:100), tol:AcOEt (100:0 → 0:100), AcOEt:DCM (100:0 → 0:100), DCM:Me<sub>2</sub>CO (100:0 → 0:100), Me<sub>2</sub>CO:MeOH (100:0 → 0:100), MeOH (100) obteniéndose 118 fracciones (2.5 mL), que fueron agrupadas en 11 fracciones combinadas (Tabla 4-9), según su similitud en CCD en fase móvil C y G.

**Tabla 4 - 9.** Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción primaria acetónica (FIV).

Fase móvil	Proporción	Fracción	Fraciones combinadas	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -hex	100	1	1-18	FIV-1	27.1
<i>n</i> -hex:tol	25:75	2-16			
tol:AcOEt	50:50	17-37	19-26	FIV-2	16.0
Tol:AcOEt	25:75	38-54	27-29	FIV-3	16.4
AcOEt	100	55-72	30-39	FIV-4	27.7
AcOEt:DCM	75:25	73-76	40-59	FIV-5	98.8
AcOEt:DCM	50:50	77-80	60-69	FIV-6	52.9
AcOEt:DCM	25:75	81-85			
DCM	100	86-89			
Me <sub>2</sub> CO	100	90-93	70-79	FIV-7	15.5
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	50:50	94-97	80-85	FIV-8	10.26
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	75:25	98-102	86-90	FIV-9	12.6
			91-96	FIV-10	15.8
MeOH	100	103-118	97-118	FIV-11	25.6

La fracción FIV-1 (27.1 mg) se sometió a CC abierta sobre gel de sílice (1.5 g), eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de disolventes *n*-hex:CHCl<sub>3</sub> (100:0 → 0:100) y DMC:Me<sub>2</sub>CO (100:0 → 0:100) (Tabla 4-10), obteniéndose 14 fracciones (1 mL), que se reunieron en 4 fracciones combinadas según su similitud en CCD en sistema C y G.

**Tabla 4 - 10.** Cromatografía en columna abierta sobre de gel de sílice de la fracción FIV-1.

Fase móvil	Proporción	Fracción	Fraciones combinadas	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	75:25	1-6	1-3	FIV-1-1	0.9
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	50:50	7-8	4-8	FIV-1-2	23.1
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	25:75	9-10	9-11	FIV-1-3	0.85
CHCl <sub>3</sub>	100	11			
DCM	100	12	12-14	FIV-1-4	0.95
Me <sub>2</sub> CO	100	13-14			

La CCDP de la fracción FIV-1-2 (23.1 mg) en sistema *n*-hex:AcOEt:HCOOH (34:4:1) permitió la obtención de cantidad adicional de atranorina (10.5 mg). Por otro lado, la fracción secundaria FII-5 (15.6 mg) proveniente del fraccionamiento de la fracción primaria etérea FII (Tabla 4-6), se sometió a CC sobre gel de sílice (1.0 g), eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de disolventes *n*-hex:tol (100:0 → 0:100), tol:AcOEt (100:0 → 0:100), AcOEt:DMC (100:0 → 0:100) y DCM:Me<sub>2</sub>CO (100:0 → 0:100) (Tabla 4-11),

obteniéndose un total de 30 fracciones (1 mL), que se reunieron en 6 fracciones combinadas según su similitud en CCD fase móvil C y G.

**Tabla 4 - 11.** Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción FII-5.

Fase móvil	Proporción	Fracción	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -hex	100	1-3	1	FII-5-1	1.35
<i>n</i> -hex:tol	50:50	4-6	2-5	FII-5-2	1.96
<i>n</i> -hex:tol	25:75	7-9	6-18	FII-5-3	4.0
tolueno	100	10-12			
tol:AcOEt	50:50	13-15			
AcOEt	100	16-20	19-20	FII-5-4	1.24
DCM:Me <sub>2</sub> CO	50:50	21-25	21-23	FII-5-5	1.49
Me <sub>2</sub> CO	100	26-30	24-30	FII-5-6	1.59

A partir de la fracción FII-5-3 (4.0 mg) se obtuvo más atranorina (2.4 mg) por purificación mediante CCDP en sistema C (Figura 4-2a).

#### 4.2.5.5 Obtención de ácido úsnico (5)

La fracción FII-6 (175.86 mg) (Tabla 4-6) se sometió a CC abierta sobre gel de sílice (9.0 g), eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de disolventes *n*-hex:tol (100:0 → 0:100), tol:AcOEt (100:0 → 0:100), AcOEt:DMC (100:0 → 0:100), DMC:Me<sub>2</sub>CO (100:0 → 0:100) y Me<sub>2</sub>CO:MeOH (100:0 → 0:100) (Tabla 4-12), obteniéndose 105 fracciones (2.0 mL), que se reunieron en 8 fracciones combinadas según su similitud en CCD en sistema C y G.

**Tabla 4 - 12.** Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción FII-6.

Fase móvil	Proporción	Fracción	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -hex	100	1-4	1-24	FII-6-1	5.5
<i>n</i> -hex:tol	50:50	5-16			
<i>n</i> -hex:tol	25:75	17-23	26-30	FII-6-2	120.3
tolueno	100	24-32			

**Tabla 4 - 13** (continuación). Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción FII-6.

Fase móvil	Proporción	Fracción	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
tol:AcOEt	50:50	33-40	31-57	FII-6-3	2.3
tol:AcOEt	25:75	41-45			
AcOEt	100	46-49	58-63	FII-6-4	3.5
AcOEt:DCM	50:50	50-53			
AcOEt:DCM	25:75	54-58	64-76	FII-6-5	2.5
DMC	100	59-63			
DCM:Me <sub>2</sub> CO	50:50	64-76	77-90	FII-6-6	2.8
DCM:Me <sub>2</sub> CO	25:75	77-81			
Me <sub>2</sub> CO	100	82-87	91-101	FII-6-7	3.4
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	50:50	88-94			
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	25:75	95-99	102-105	FII-6-8	2.9
MeOH	100	100-105			

Asimismo, la fracción FII-7 (123 mg) (Tabla 4-6) se sometió a CC tipo flash sobre gel de sílice (6.5 g), eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de disolventes *n*-hex:tol (100:0 → 0:100), AcOEt:DCM (100:0 → 0:100), DMC:Me<sub>2</sub>CO (100:0 → 0:100), Me<sub>2</sub>CO:EtOH (100:0 → 0:100) (Tabla 4-13), obteniéndose 76 fracciones (2.5 mL), que se reunieron en 5 fracciones combinadas según su similitud en CCD en sistema C, G y Q.

**Tabla 4 - 14.** Cromatografía en columna abierta sobre de gel de sílice de la fracción FII-7.

Fase móvil	Proporción	Fracción	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -hex:tol	50:50	1-9	1-54	FII-7-1	59.4
<i>n</i> -hex:tol	25:75	10-19			
tolueno	100	20-22			
AcOEt	100	23-27			
AcOEt:DCM	50:50	28-32	55-58	FII-7-2	8.4
AcOEt:DCM	25:75	33-38			
DCM	100	39-42	59-67	FII-7-3	15.2
DCM:Me <sub>2</sub> CO	50:50	43-47			
DMC:Me <sub>2</sub> CO	25:75	48-52	68-70	FII-7-4	3.4
Me <sub>2</sub> CO	100	53-57			
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	50:50	58-67	71-76	FII-7-5	6.8
MeOH	100	68-76			

Las fracciones FII-6-2 (120.3 mg), FII-7-1 (59.4 mg) (Tablas 4-12 y 4-13, respectivamente) se reunieron y sometieron a CC tipo flash sobre gel de sílice (9.0 g), eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de disolventes *n*-hex:tol (100:0 → 0:100), tol:AcOEt (100:0 → 0:100), AcOEt:DMC (100:0 → 0:100), DMC:Me<sub>2</sub>CO (100:0 → 0:100) y Me<sub>2</sub>CO:MeOH (100:0 → 0:100) (Tabla 4-14) obteniéndose 113 fracciones (3 mL), que se reunieron en 7 fracciones combinadas según su similitud en CCD con sistema C y G.

**Tabla 4 - 15.** Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la reunión de fracciones FII-6-2 y FII-7-1.

Fase móvil	Proporción	Fracción	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -hex	100	1-16	1-43	FII-6-7-A	139.8
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	90:10	17-23			
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	75:25	24-28			
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	60:30	29-33			
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	50:50	34-38			
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	25:75	39-43			
CHCl <sub>3</sub>	100	44-48	44-51	FII-6-7-B	8.8
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	90:10	49-53			
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	75:25	54-58			
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	50:50	59-63			
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	30:60	64-68	52-59	FII-6-7-C	1.6
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	25:75	69-71			
AcOEt	100	73-77	60-74	FII-6-7-D	1.8
DMC	100	78-82			
DMC:Me <sub>2</sub> CO	75:25	83-87	75-84	FII-6-7-E	2.9
DMC:Me <sub>2</sub> CO	50:50	88-92			
Me <sub>2</sub> CO	100	93-97	85-91	FII-6-7-F	2.4
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	70:30	98-102			
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	50:50	103-107	92-98	FII-6-7-G	1.7
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	30:70	108-110	99-113	FII-6-7-H	3.8

La fracción FII-6-7-A (139.8 mg) se sometió a CC tipo flash sobre gel de sílice (7.0 g), eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de disolventes *n*-hex:CHCl<sub>3</sub> (100:0 → 0:100), CHCl<sub>3</sub>:DMC (100:0 → 0:100), DMC:Me<sub>2</sub>CO (100:0 → 0:100) y Me<sub>2</sub>CO:MeOH (100:0 → 0:100) (Tabla 4-15), obteniéndose 127 fracciones (2 mL), que se reunieron en 9 fracciones combinadas según su similitud en CCD con sistema C y G.

**Tabla 4 - 16.** Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción FII-6-7-A.

Fase móvil	Proporción	Fracción	Fracciones combinadas	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -hex	100	M-1	1-11	FII-6-7-A-1	25.5
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	70:30	2-7			
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	50:50	8-13	12-23	FII-6-7-A-2	31.5
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	60:30	14-19			
<i>n</i> -hex:CHCl <sub>3</sub>	10:90	20-25	24-43	FII-6-7-A-3	45.6
CHCl <sub>3</sub>	100	26-31			
CHCl <sub>3</sub> :DMC	90:10	32-37	44-60	FII-6-7-A-4	8.4
CHCl <sub>3</sub> :DMC	70:30	38-43			
CHCl <sub>3</sub> :DMC	50:50	44-49	61-66	FII-6-7-A-5	2.5
CHCl <sub>3</sub> :DMC	10:90	50-55			
DMC	100	56-61	67-72	FII-6-7-A-6	3.5
DMC:Me <sub>2</sub> CO	90:10	62-66			
DMC:Me <sub>2</sub> CO	70:30	67-72	73-77	FII-6-7-A-7	1.5
DMC:Me <sub>2</sub> CO	50:50	73-78			
DMC:Me <sub>2</sub> CO	30:70	79-84	78-85	FII-6-7-A-8	1.8
DMC:Me <sub>2</sub> CO	10:90	85-90			
Me <sub>2</sub> CO	100	91-96	86-97	FII-6-7-A-9	1.5
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	90:10	97-101			
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	70:30	102-107	98-127	FII-6-7-A-10	6.6
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	50:50	108-113			
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	30:70	114-119			
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	10:90	120-126			
MeOH	100	127			

La fracción FII-6-7-A-1 (25.5 mg) se sometió a cromatografía de capa fina preparativa eluyendo en sistema *n*-hex:CHCl<sub>3</sub> (10:90) (Figura 4-2a), dando lugar a un sólido de color amarillo (4.6 mg) soluble en CHCl<sub>3</sub>, AcOEt y DCM. Pf (°C): 210 - 220. IR (KBr)  $V_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3425 (OH), 1735 y 1627 (C=O), 1377 (C=C o CH<sub>3</sub>), 1288 (C-O). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub>): 1.79 (3H, s, CH<sub>3</sub>-13), 2.14 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 2.69 (3H, s, CH<sub>3</sub>-15), 2.71 (3H, s, CH<sub>3</sub>-17), 6.01 (1H, s, H-4), 11.06 (1H, s, OH-10), 13.34 (1H, s, OH-8). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub>): C-1: 197.6, C-2: 105.2, C-3: 191.7, C-4: 98.3, C-5: 179.4, C-6: 155.2, C-7: 101.1, C-8: 163.9, C-9: 109.3, C-10: 157.5, C-11: 103.9, C-12: 59.1, C-13: 32.1, C-14: 200.3, C-15: 27.8, C-16: 201.7, C-17: 31.2 y C-18: 7.5 (Espectros 9-19 a 9-21 Anexo). Esta sustancia

fue identificada como ácido úsnico por comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados en literatura (Huneck, 1999; Diaz - Santos, 2008).

## 4.3 Estudio biológico

### 4.3.1 Procedimientos generales

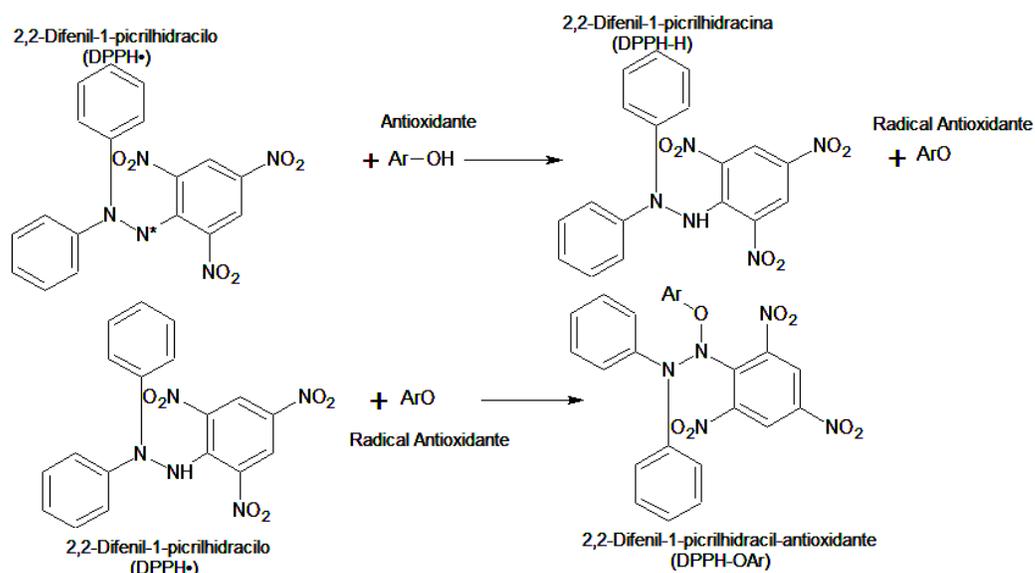
Para los ensayos de actividad antioxidante y fotoprotectora se emplearon los siguientes reactivos: ácido gálico (98.0 %, Merck), butilhidroxitolueno (BHT) (99.0 %, Sigma Aldrich), 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) (90.0 %, Sigma Aldrich), ácido linoleico (99.0 %, Sigma Aldrich), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (99.3 %, Mallinckrodt), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (99.6 %, Mallinckrodt), tween 20 (95.0 %, PanReac), tiocianato de amonio (99.0 %, Merck), cloruro ferroso (99.0 %, JT Baker), cloruro férrico (98.0 %, Merck), K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>) (94.0 %, PanReac), etanol absoluto (PanReac), ácido clorhídrico (37.0 %, JT Baker), ácido tricloroacético (99.5 %, Merck). Como patrones fotoprotectores se emplearon: tinosorb S, ácido 2-fenil-5-bencimidazol sulfónico y avobenzona, donados por la industria.

Para las medidas de absorbancia, se utilizó un espectrofotómetro marca Shimadzu (Modelo: UV-1700. PharmaSpec).

### 4.3.2 Actividad Antioxidante

#### 4.3.2.1 Poder captador de radicales libres DPPH•

El poder captador de radicales libres del extracto acetónico, compuestos aislados de *Everniastrum cirrhatum* y antioxidantes control: BHT y ácido gálico, se evaluó en el modelo del radical libre DPPH•, de acuerdo con la metodología descrita por Brand Williams, et al., 1995. La capacidad captadora del radical libre DPPH• del extracto, como de los compuestos evaluados, se expresó en términos de la concentración efectiva cincuenta (CE<sub>50</sub>), definida como la concentración de extracto o antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial del radical libre DPPH• en un 50 %. Una vez tuvo lugar la reacción entre el antioxidante y el radical libre DPPH•, de acuerdo con la reacción general descrita en la Figura 4-3 la concentración de este último disminuyó, hasta alcanzar un valor constante en un estado particular, denominado estado estacionario.



**Figura 4 - 3.** Representación de la reacción general entre el radical libre DPPH• y un antioxidante.

Para evaluar la concentración de DPPH•, fue necesario construir una curva de calibración a partir de medidas de absorbancia de disoluciones stock de DPPH• en etanol (10 – 100  $\mu\text{M}$ ), leídas a una longitud de onda de 515 nm (longitud de máxima absorción del radical libre DPPH•) (ecuación 4.1).

$$Abs_{515\text{ nm}} = 9.55 * 10^{-3} [DPPH^{\bullet}] + 1.21 * 10^{-2} \quad ec. 4.1$$

El avance de la reacción fue monitoreado a partir del seguimiento de la disminución de la concentración del radical DPPH• en función del tiempo, la concentración fue cuantificada espectrofotométricamente, a partir de medidas de absorbancia, determinadas a intervalos de tiempo de 30 minutos, hasta alcanzar el estado estacionario.

Para la determinación de la  $CE_{50}$ , del extracto acetónico, compuestos aislados como patrones antioxidantes evaluados, se prepararon disoluciones de concentración conocida de cada uno de estos (Extracto: 500 mg/L; compuestos: 40.0 a 6200.0  $\mu\text{M}$ ) como del radical DPPH• (~ 100.0  $\mu\text{M}$ ). Los experimentos se desarrollaron, permitiendo que la reacción se llevara a cabo mediante la mezcla de cada una de las disoluciones de antioxidante evaluado y radical DPPH• en diferentes relaciones de concentración (mg extracto / mg DPPH• o [antioxidante] / [DPPH•]), previamente establecidas, para cada sistema estudiado. Para cada sistema objeto de estudio se evaluaron como mínimo diez relaciones de concentración.

Para cada relación de concentración del sistema evaluado, se determinó la variación de la concentración de DPPH• vs tiempo hasta alcanzar un valor constante. A partir de la concentración inicial de DPPH• y su valor a un tiempo particular, para cada sistema y relación de concentración estudiada, se determinó el porcentaje remanente de DPPH• en función del tiempo (ecuación 4.2):

$$\% \text{ Remanente DPPH}^\bullet = \frac{[\text{DPPH}^\bullet]_t}{[\text{DPPH}^\bullet]_0} \times 100 \quad \text{ec. 4.2}$$

Donde:

[DPPH•]<sub>t</sub>: Concentración remanente de DPPH• al reaccionar con muestra al tiempo t.

[DPPH•]<sub>0</sub>: concentración de DPPH• inicial en el tiempo cero.

El comportamiento de la variación del % remanente de DPPH• vs tiempo, para cada sistema estudiado, permitió establecer el % remanente de DPPH• en el estado estacionario para cada relación de concentración evaluada.

Con este último valor y la relación de concentración: mg extracto / mg DPPH• o relación molar: [antioxidante] / [DPPH•] para cada sistema evaluado, se construyó una segunda gráfica que permitió determinar CE<sub>50</sub>.

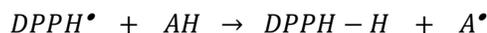
La concentración efectiva cincuenta, representa una medida del poder captador de radicales libres de un antioxidante. Un menor valor de CE<sub>50</sub>, es indicativo de un mayor poder captador de radicales libres, asociado al empleo de una menor cantidad de muestra, para disminuir en un 50 % la concentración inicial del radical DPPH•.

#### **4.3.2.2 Reactividad de los compuestos aislados como agentes captadores de radicales libres**

La reactividad de cada uno de los compuestos aislados de *Everniastrum cirrhatum* y antioxidantes control: BHT y ácido gálico, como captadores del radical libre DPPH•, se evaluó a partir de la constante de velocidad de reacción de segundo orden ( $k_2$ ), determinada experimentalmente a una temperatura controlada de 25.0 °C ± 0.1 °C, tomando como sistema de reacción: compuesto - radical DPPH•, de acuerdo con la metodología descrita por Rojas, et al., 2015.

Para ello, se permitió que tuviera lugar la reacción entre cada uno de los compuestos aislados y el radical libre DPPH• en solución de etanol, a la temperatura de estudio. El

avance de la reacción de reducción del DPPH• (Figura 4-4), fue monitoreado a partir de la disminución de la concentración de DPPH• en función del tiempo, evaluada como se mencionó anteriormente, cada 6 minutos, durante un periodo de dos horas.



**Figura 4 - 4.** Reacciones generales del radical libre DPPH• con un antioxidante y un radical libre.

AH: corresponde al antioxidante.

R•: corresponde al radical.

Estudios previos han permitido establecer de manera general, que la cinética que siguen estas reacciones es de segundo orden, (Rojas, et al., 2015; Suja, et al., 2004; Espín, et al., 2000), de acuerdo con esto, la ley de velocidad resultante está dada según la reacción 4.3:

$$-\frac{d[DPPH^{\bullet}]}{dt} = k_2 \times [AH]_0 \times [DPPH^{\bullet}]_t \quad \text{ec. 4.3}$$

En donde:  $[AH]_0$  representan la concentración inicial de antioxidante,  $[DPPH^{\bullet}]_t$  la concentración de radical DPPH• a un tiempo t y  $k_2$ , corresponde a la constante velocidad de segundo orden ( $M^{-1} \cdot s^{-1}$ ) determinada a la temperatura de trabajo.

La reacción entre cada compuesto y el DPPH• tuvo lugar a diferentes relaciones de concentración  $[AH]_0 / [DPPH^{\bullet}]_0$ , asegurando que la concentración inicial de DPPH• fuera mucho menor que la del compuesto ( $[DPPH^{\bullet}]_0 \ll [AH]_0$ ). Bajo estas condiciones, es posible asegurar que la reacción de segundo orden para estos sistemas siga una cinética de pseudo-primer orden de acuerdo con los fundamentos básicos de la cinética química. Las mismas consideraciones han sido asumidas por otros autores (Leal, et al., 2018; Rojas, et al., 2015; Valencia - Islas, et al., 2007; Espín, et al., 2000), lo que permite establecer las siguientes ecuaciones de velocidad para la reacción de pseudo-primer orden:

$$[DPPH^{\bullet}]_t = [DPPH^{\bullet}]_0 e^{-k_{obs}t} \quad \text{ec. 4.4}$$

$$\ln[DPPH^{\bullet}]_t = \ln[DPPH^{\bullet}]_0 - k_{obs}t \quad \text{ec. 4.5}$$

Donde:

$k_{obs}$  ( $s^{-1}$ ), corresponde a la constante de velocidad experimental de *pseudo*-primer orden.  
 $t$  (s), corresponde al tiempo de reacción asociado a una concentración de DPPH<sup>•</sup> en el instante  $t$ .

El comportamiento del Ln [DPPH<sup>•</sup>] en función del tiempo (s) (ecuación 4.5), se ajusta a una línea recta, en donde  $k_{obs}$ , corresponde a la pendiente en dicho ajuste para cada uno de los sistemas objeto de estudio (compuesto: DPPH<sup>•</sup>) a la temperatura del ensayo.

La ley de velocidad para esta reacción de pseudo-primer orden, se puede plantear según la ecuación 4.6:

$$-\frac{d[DPPH^{\bullet}]}{dt} = k_{obs} \times [DPPH^{\bullet}]_t = k_2 \times [AH]_0 \times [DPPH^{\bullet}]_t \quad ec. 4.6$$

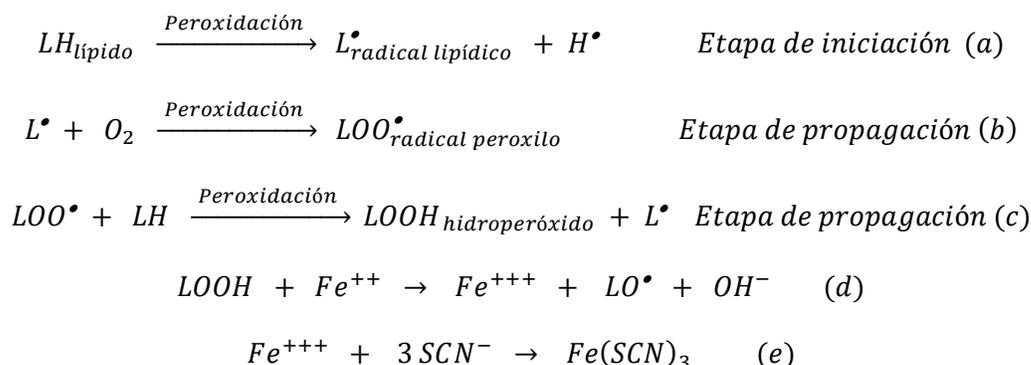
Expresión de donde se calculó  $k_2$  ( $M^{-1} \cdot s^{-1}$ ), constante cinética de segundo orden, a partir de  $k_{obs}$ . y de la concentración inicial de antioxidante  $[AH]_0$ , considerada para fines prácticos constante bajo las condiciones de la reacción.

El valor de  $k_2$ , se reportó como el promedio de dos determinaciones realizadas de manera independiente. La magnitud en los valores de  $k_2$ , a una misma temperatura son un indicativo de la reactividad de cada compuesto frente al radical DPPH<sup>•</sup> y por ende un indicativo de su capacidad captadora de radicales libres.

#### 4.3.2.3 Inhibición de la peroxidación lipídica

El poder inhibitor de la peroxidación lipídica del extracto acetónico, compuestos aislados de *Everniastrum cirrhatum* y antioxidantes control: BHT y ácido gálico, se evaluó en el modelo del ácido linoleico, de acuerdo con la metodología descrita por Mitsuda, et al., 1966, introduciendo algunas modificaciones.

La Figura 4-5, describe la reacción entre el hidroperóxido (compuesto formado durante el proceso de peroxidación lipídica que sufre el ácido linoleico a las condiciones del ensayo) y el ion ferroso ( $Fe^{++}$ ) para dar origen al ion férrico, al radical peróxilo respectivo y al ion hidróxido. A su vez se muestra la reacción entre el ion férrico  $Fe^{+++}$  (producto de la reacción de oxidación del ion ferroso  $Fe^{++}$  en presencia de hidroperóxido) con tiocianato de amonio, para dar origen al complejo coloreado tiocianato de hierro III, mismo que puede ser cuantificado espectrofotométricamente ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ . Absorción 500,0 nm).



**Figura 4 - 5.** Reacciones asociadas al proceso de peroxidación lipídica (a, b y c) y cuantificación de hidroperóxidos (LOOH) formados (d y e).

De acuerdo a las reacciones involucradas (Figura 4-5), durante el proceso de peroxidación lipídica que sufre un lípido, la presencia de un agente inhibidor de la peroxidación lipídica, en una mezcla de reacción bajo las condiciones del ensayo, evitaría o disminuiría la formación de hidroperóxido (LOOH) en dicho proceso, ocasionando una baja concentración de complejo formado, y por ende, valores más bajos de absorbancia, frente a los mostrados por el control (mezcla de reacción sin inhibidor) a las mismas condiciones del ensayo.

Para dar inicio al ensayo de poder inhibidor de la peroxidación lipídica; inicialmente se prepararon disoluciones stock de cada una de las sustancias a evaluar (50, 100, 200 y 500 ppm) en etanol. Posteriormente, en un frasco ámbar, 0.250 mL de estas disoluciones, se mezclaron con 1.0 mL de buffer de fosfatos (0.2 M a pH 7.0) y 1.25 mL de emulsión de ácido linoleico (tween 20, 0.02 M; ácido linoleico, 0.02 M; buffer de fosfatos, 0.2 M a pH 7). Adicionalmente, se prepararon 3 blancos control (misma mezcla de reacción, pero sin la adición de sustancias a evaluar). Las mezclas resultantes, se pusieron en incubación en un baño termostático, a una temperatura controlada de  $37.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Transcurridas las primeras 24 horas de reacción, se tomó 0.100 mL de cada una de las disoluciones incubadas y de manera independiente se mezclaron con 4.7 mL de etanol (75.0 % v/v), 0.100 mL de tiocianato de amonio (30.0 % p/v) y 0.100 mL de cloruro ferroso ( $FeCl_2$ , 1.0 % p/v ; HCl, 3.5 % p/v). La disolución resultante se mantuvo en agitación, y transcurridos 30 min se leyó su absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. El anterior proceso se repitió a las 48 horas de iniciada la reacción.

A partir de estas lecturas se determinó el % de inhibición de peroxidación del ácido linoleico (% IPAL) de acuerdo con la ecuación 4.7:

$$\% IPAL = \left(1 - \frac{A_m}{A_b}\right) \times 100 \quad ec. 4.7$$

Donde:

$A_m$ : Absorbancia de la muestra.

$A_b$ : Absorbancia del blanco.

El valor % IPAL, se reportó como el promedio de dos o tres determinaciones realizadas de manera independiente. El % IPAL, permite evaluar la capacidad inhibidora de una sustancia para impedir la peroxidación de lípidos, en términos porcentuales, valores próximos a 100 % , indican un mayor poder inhibidor de la peroxidación de lípidos de la sustancia evaluada.

#### 4.3.2.4 Poder reductor férrico

El poder reductor férrico (PRF) del extracto acetónico, compuestos aislados de *Everniastrum cirrhatum* y antioxidantes control: BHT y ácido gálico, se evaluó de acuerdo con la metodología descrita por Oyaizu,1986 introduciendo algunas modificaciones. En este modelo, el PRF de una sustancia mide la capacidad de esta, para reducir el ion férrico ( $Fe^{+++}$ ) a ion ferroso ( $Fe^{++}$ ). Producto de esta reducción bajo las condiciones del ensayo, dan origen a la formación de un complejo coloreado, azul de Turnbull, el cual puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 700 nm (longitud de máxima absorción del complejo).

Para la determinación del PRF; inicialmente se prepararon disoluciones stock de cada una de las sustancias a evaluar (25, 50, 100 y 250 ppm) en etanol. Posteriormente, en un frasco ámbar, 1.0 mL, de cada una de estas disoluciones, se mezclaron con 2.0 mL de buffer de fosfatos (0.2 M a pH 6.6) y 2.0 mL de disolución de ferricianuro de potasio ( $K_3Fe(CN)_6$ , 1.0 % p/v). Las mezclas resultantes, fueron encubadas en un baño termostático (Temperatura,  $25.0\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$  ; 20 min). Transcurrido este tiempo, a cada una de las mezclas de reacción se les adiciono 2.0 mL de ácido tricloroacético (10 % p/v) y de la disolución resultante, se tomó una alícuota (2.5 mL) que se mezcló con agua destilada (2.5 mL) y  $FeCl_3$  (0.5 mL, 0.1 %) y una vez homogenizada se le determinó su absorbancia ( $\lambda$  700 nm). Incrementos en la absorbancia de la mezcla de reacción están asociados a mayor

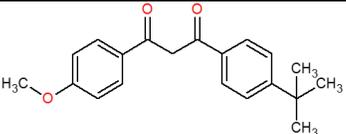
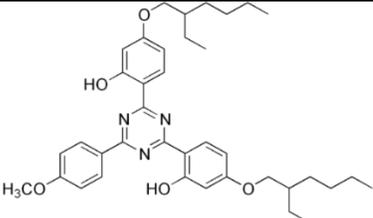
formación del complejo azul de Turnbull, indicando un aumento en el poder reductor de iones férricos y por ende mayor actividad antioxidante. El PRF, se reportó como el promedio de dos o tres determinaciones realizadas de manera independiente.

### 4.3.3 Actividad Fotoprotectora

#### 4.3.3.1 Determinación del efecto fotoprotector *in vitro* frente a la radiación UVB a partir del factor de protección solar (FPS) *in vitro*

El factor de protección solar (FPS) del extracto acetónico, compuestos aislados de *Everniastrum cirrhatum* y fotoprotectores control: avobenzona (filtro UVA), el ácido 2-fenil-5-bencimidazol-sulfónico (AFBS / filtro UVB) y tinosorb s (filtro UVA/UVB) (Tabla 4-16), se determinó *in-vitro* de acuerdo con la metodología descrita por Mansur, et al., 1986. Este factor es usado para estimar la capacidad fotoprotectora de una sustancia, para ser usada como filtro solar frente a la radiación UVB, relacionando la absorbancia de la sustancia cuando está sometida a dicha radiación ( $\lambda$  290 a 320 nm) con el efecto eritematoso causado por la misma.

**Tabla 4 - 17.** Filtros utilizados como patrones en los ensayos de actividad fotoprotectora

Ingrediente activo	Concentración máxima permitida (%)	Cobertura espectral
 <p>Avobenzona</p>	3	UVA
 <p>Tinosorb S</p>	10	UVB y UVA
 <p>ácido 2-fenil-5-bencimidazol sulfónico</p>	8	UVB

Para la determinación de FPS, se prepararon por triplicado disoluciones de las sustancias a evaluar (10, 50, 100 y 200 ppm) en etanol, posteriormente a cada una de estas disoluciones se le realizó un barrido espectrofotométrico en el rango de longitud de onda entre 290 y 320 nm, en intervalos de medición de 5 nm en celdas de cuarzo (1 cm) utilizándose como blanco EtOH.

A partir de las lecturas de absorbancia de las disoluciones, se determinó el FPS a partir de la ecuación 4.8, como resultado del promedio de tres replicas realizadas de manera independiente.

$$FPS = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad ec. 4.8$$

Donde:

EE = factor de eritema.

I = factor de intensidad solar.

Abs = absorbancia del protector solar.

CF = factor de corrección = a 10.

El producto  $EE(\lambda) \times I(\lambda)$  es una constante normalizada, cuyos valores han sido determinados previamente por Sayre, et al., 1979 a la longitud de onda entre (290 y 320 nm) (Tabla 4-17). El FPS, resulta del "cociente entre la mínima cantidad de energía necesaria para producir eritema mínimamente detectable (dosis mínima eritema: MED) en piel con fotoprotección y la energía requerida para producir la MED sin la aplicación del fotoprotector".

**Tabla 4 - 18.** Constantes normalizadas (Sayre, et al., 1979).

$\lambda$ (nm)	290	295	300	305	310	315	320
$EE(\lambda) \times I(\lambda)$	0.0150	0.0817	0.2874	0.3278	0.1864	0.0839	0.0180

De acuerdo con el valor de FPS los fotoprotectores se pueden clasificar según la (Food and Drug Administration, 2011) en diferentes niveles de fotoprotección: FPS de 2 a 12: bajo; FPS de 12 a 30: moderado; FPS superior a 30: alta protección frente a radiación UVB.

#### 4.3.3.2 Determinación del efecto fotoprotector frente a la radiación UVA a partir de la longitud de onda crítica ( $\lambda_{crit.}$ )

La determinación de la longitud de onda crítica ( $\lambda_{crit.}$ ) del extracto acetónico, compuestos aislados de *E. cirrhatum* y fotoprotectores control: avobenzona (filtro UVA), el ácido 2-fenil-5-bencimidazol-sulfónico (AFBS / filtro UVB) y tinosorb s (filtro UVA-UVB), se determinó *in vitro* de acuerdo con el método espectrofotométrico de Diffey, et al., 2000, tomando como base la metodología descrita por Millot, et al., 2009, incluyendo algunas modificaciones. La longitud de onda crítica ( $\lambda_{crit.}$ ), es un parámetro representativo de efecto fotoprotector de una sustancia frente a la radiación UVA y se define como la longitud de onda por debajo de la cual un filtro solar absorbe el 90 % de la radiación solar en el rango de 290 a 400 nm.

Para su determinación se preparó por triplicado disoluciones de las sustancias a evaluar a (10, 50, 100 y 200 ppm) en etanol. Posteriormente cada una de estas disoluciones, fueron sometidas a un barrido espectrofotométrico en el rango 290 y 400 nm en intervalos de 1 nm, en celdas de cuarzo (1 cm) utilizándose como blanco EtOH.

Con los datos de absorbancia obtenidos en función de longitud de onda, se evaluó el área bajo la curva en el intervalo de 290 a 400 nm según ecuación 4.9, de donde se calculó  $\lambda_{crit.}$ , siendo este el valor donde se alcanzó el 90 % del área bajo la curva (Food and Drug Administration, 2011). La  $\lambda_{crit.}$  se presenta como el resultado del promedio de tres réplicas independientes.

$$\int_{290 \text{ nm}}^{\lambda_{crit}} Abs(\lambda) d\lambda = 0,9 \times \int_{290 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} Abs(\lambda) d\lambda \quad ec. 4.9$$

Donde, Abs corresponde a la absorbancia de la muestra evaluada.

Según la FDA (Food and Drug Administration, 2011), los fotoprotectores son clasificados en una escala de 0 a 4 según su valor de  $\lambda_{crit.}$ : 0 si  $\lambda_{crit} < 325$  nm; 1 si  $325 \leq \lambda_{crit} < 335$ ; 2 si  $335 \leq \lambda_{crit} < 350$ ; 3 si  $350 \leq \lambda_{crit} < 370$ ; 4 si  $370 < \lambda_{crit.}$  Entre mayor sea la longitud de onda crítica, mayor es la capacidad fotoprotectora de la sustancia frente a la radiación UVA.

Para considerar si un filtro solar puede ser utilizado como fotoprotector de amplio espectro, es decir si posee capacidad fotoprotectora frente a radiación UVB como radiación UVA, se deben cumplir con dos requisitos: poseer FPS mayor 15 y  $\lambda_{crit.}$  mayor a 370 nm.

### 4.3.3.3 Determinación del efecto fotoprotector frente a la radiación UVA y UVB a partir del Factor UVA/UVB (UV-r\*)

La relación UVA/UVB (UV-r\*) es un parámetro de fotoprotección que permite evaluar la capacidad fotoprotectora de una sustancia en contra de radiación UVA y/o en contra de radiación UVB, este parámetro se determinó de acuerdo con la metodología de Springsteen, et al., 1999. Para calcular UV-r\*, se deben evaluar las áreas bajo la curva de los espectros de absorbancia vs longitud de onda en los rangos de longitud de onda entre 290-320 nm y entre 320–400 nm para cada una de las disoluciones evaluadas utilizando la ecuación 4.10.

$$\text{Relación UV} - r^* = \frac{\int_{320 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} \text{Abs}(\lambda) d\lambda}{\int_{290 \text{ nm}}^{320 \text{ nm}} \text{Abs}(\lambda) d\lambda} \quad \text{ec. 4.10}$$

El valor obtenido de UV-r\*, del extracto acetónico, compuestos aislados de *Everniastrum cirrhatum* y fotoprotectores control, resultó del promedio de tres determinaciones realizadas de manera independiente.

Los valores de UVA-r\*, permiten estimar específicamente el grado de protección de los fotoprotectores frente a la radiación UVA puntuándolos del siguiente modo: 0.0 < 0.2 “no protegen”; 0.2 < 0.4 “moderada”; 0.4 < 0.6 “buena”; 0.6 < 0.8 “superior” y 0.8 ≥ “máximo” (Springsteen *et al.*, 1999).

### 4.3.4 Determinación preliminar del carácter lipofílico y la posible permeabilidad dérmica de los compuestos aislados mediante el cálculo del coeficiente de reparto (P) y la energía libre de Gibbs de transferencia

El coeficiente de reparto (P) de las sustancias liquénicas aisladas se determinó teóricamente, este parámetro fisicoquímico, permite determinar el grado de lipofilia o la solubilidad relativa de una molécula, en un sistema de dos fases inmiscibles que se encuentran en equilibrio (Rubio , et al., 2009). De modo que se pueda inferir el carácter lipofílico de un compuesto con actividad antioxidante y/o fotoprotectora en un entorno biológico, en este caso la epidermis, órgano que posee una gran cantidad de lípidos y que es destino de dichas sustancias, además de la posibilidad que dichas sustancias pueden ser utilizadas en formulaciones tópicas u orales.

Este factor se define como el cociente o la razón de las concentraciones en un sistema en equilibrio de un soluto disuelto en un sistema bifásico usualmente *n*-octanol y agua de forma experimental (Silverman, et al., 2014), expresado mediante la ecuación 4.11:

$$P = \frac{C_o}{C_w} \quad \text{ec. 4.11}$$

Donde:

$C_o$ , corresponde a la concentración de un soluto en la fase orgánica

$C_w$ , corresponde a la concentración del mismo soluto en la fase acuosa.

Esta expresión constituye un modelo indicativo para representar el reparto de un principio activo en la piel, que está constituida por barreras hidrofílicas y lipofílicas.

El carácter lipofílico de los compuestos aislados de *Everniastrum cirrhatum* se determinó *in silico* calculando su coeficiente de partición (P) en el sistema 1-octanol-agua usando los programas computacionales ACD/ChemSketch, Molinspiration (Ertl, et al., 2000) y Virtual Computational Chemistry Laboratory de libre acceso (Ghose, et al., 1987).

La energía libre de Gibbs de transferencia  $\Delta \bar{G}_{0 \rightarrow W}^{\theta}$ , energía asociada al proceso del paso de un mol de compuesto desde la fase acuosa a la fase orgánica en un sistema que se encuentra en equilibrio a una temperatura dada, es una medida que permite establecer la viabilidad termodinámica de ese proceso a través de difusión pasiva, calculada a partir del coeficiente de partición P (ecuación 4.12):

$$\Delta \bar{G}_{0 \rightarrow W}^{\theta} = - RT \ln P \quad \text{ec. 4.12}$$

Donde: R corresponde a la constante universal de los gases (8.314 J / mol<sup>-1</sup> \* K<sup>-1</sup>), T a la temperatura absoluta en kelvin y P al coeficiente de reparto.

Valores de negativos  $\Delta \bar{G}_{0 \rightarrow W}^{\theta}$  es indicio de la favorabilidad termodinámica del proceso, indicativo de la permeabilidad dérmica de las sustancias liquenicas por medio de difusión pasiva.

## 4.4 Análisis estadístico

Los resultados de las propiedades estudiadas en la presente investigación se presentan como el promedio de dos o tres determinaciones, evaluadas de manera independiente, con su respectiva desviación estándar. Con el fin de establecer diferencias estadísticamente significativas en las propiedades evaluadas, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) por una vía, complementada con una prueba de Tukey. Se consideraron diferencias significativas a un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Selección de la especie *Everniastrum cirrhatum* (Fr.) Hale ex Sipman

La especie objeto de estudio se seleccionó tomando como base los resultados del tamizaje de la actividad antioxidante *in vitro* (poder captador de radicales libres) y fotoprotectora (cuantificación de la actividad fotoprotectora frente a la radiación UVB a través del factor de protección solar) de los extractos acetónicos de los hongos liquenizados *Everniastrum cirrhatum*, *Peltigera neopolydactyla* y *Sticta humboldtii* permitiendo evidenciar a *Everniastrum cirrhatum* (Fr.) Hale ex Sipman como especie promisoría para la obtención de compuestos con propiedades antioxidantes y fotoprotectoras. De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de tamizaje la *Peltigera neopolydactyla* posee un  $CE_{50}$  (mg muestra / mg DPPH•) de 6.4 y FPS 15; la *Sticta humboldtii*  $CE_{50}$  0.75 y FPS 15 y finalmente el *Everniastrum cirrhatum*  $CE_{50}$  0.48 y FPS > 20, siendo esta última la especie más prometedora como agente antioxidante y fotoprotectora.

Asimismo, se consideró que al ser una especie de hongo liquenizado que habita en el páramo, ecosistema de alta montaña (3500 - 4700 m s.n.m.) que a su vez está sometido a condiciones ambientales extremas, entre ellas, de radiación UV, existe mayor probabilidad que dicho organismo se encontrara adaptado a las condiciones propias del ecosistema, mediante la biosíntesis de sustancias con propiedades fotoprotectoras y/o antioxidantes (Nguyen, et al., 2013), dándonos indicio de que pudiera ser una fuente idónea de dichos agentes.

### 5.2 Estudio químico del hongo liquenizado *Everniastrum cirrhatum*

#### 5.2.1 Aislamiento de las sustancias líquénicas

El material líquénico pulverizado, se extrajo por maceración asistida por ultrasonido con acetona hasta agotamiento. El extracto resultante, se sometió a fraccionamiento primario por partición líquido-líquido como se indicó en la sección experimental (punto 4.3.4) dando lugar a 5 fracciones primarias (FI, FII, FIII, FIV y FV).

Durante el proceso de extracción, precipitó un sólido que se filtró al vacío y luego se lavó por suspensión, de manera sucesiva, con disolventes de distinta polaridad (*n*-hexano, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt y DCM) dando lugar a 3 líquidos de lavado (LI, LII y LIII). Posteriormente, el sólido lavado, se recristalizó de mezcla acetona:agua (2:1) dando lugar al ácido salazínico (**1**). Cantidad adicional de este compuesto se obtuvo a partir de la fracción primaria etérea (FII) que fue sometida a CC abierta como se indicó en la sección experimental (punto 4.2.5.1) generando 9 fracciones secundarias combinadas (FII-1 a FII-9). De manera paralela, la fracción primaria FIII, proveniente de la partición con acetato de etilo, se sometió a CC abierta como se indicó en la sección experimental (punto 4.2.5.1) generando 10 fracciones secundarias combinadas (FIII-1 a FIII-10). La reunión y recristalización posterior de las fracciones FIII-8 y FII-9 condujo a la obtención de **1**.

Por otro lado, el residuo del lavado LII se sometió a cromatografía en capa fina preparativa (CCDP) como se indicó en la sección experimental (punto 4.2.5.2) conduciendo a la obtención de pseudocifelarina A (**2**).

La fracción primaria de *n*-hexano (FI) se sometió a CC abierta como se indicó en la sección experimental (punto 4.2.5.3) generando 8 fracciones secundarias combinadas (FI-1 a FI-8). La CCDP de la fracción FI-1 (punto 4.2.5.3), condujo a la obtención de ácido atrárico (**3**). De manera adicional, la fracción terciaria FII-5-2 resultó ser este mismo compuesto.

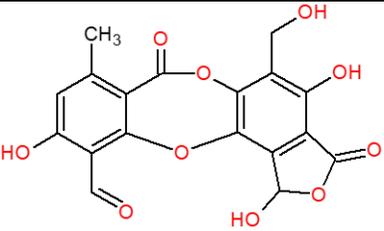
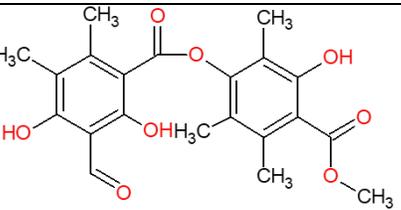
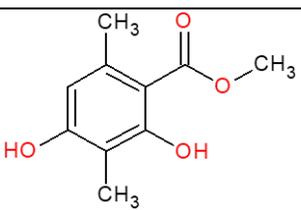
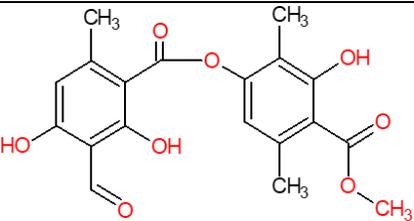
La CCDP del líquido de lavado LIII sección experimental (punto 4.2.5.4), condujo a la obtención de atranorina (**4**). Cantidad adicional de este compuesto se obtuvo de la fracción primaria acetónica FIV que se sometió a CC abierta (punto 4.2.5.4) dando lugar a 11 fracciones combinadas (FIV-1 a FIV-11). Luego, la fracción FIV-1 se sometió a CC abierta obteniéndose 4 fracciones combinadas (FIV-1-1 a FIV-1-4) y a través de CCDP de la fracción FIV-1-2 se obtuvo **4**. De manera adicional, la CC abierta de la fracción secundaria FII-5 (punto 4.2.5.4), dio lugar a 6 fracciones combinadas (FII-5-1 a FII-5-6) y a partir de la fracción FII-5-3 por CCDP se obtuvo también **4**.

Las fracciones secundarias FII-6 y FII-7 se sometieron por separado a CC abierta como se indicó en la sección experimental (punto 4.2.5.5) dando lugar a 8 (FII-6-1 a FII-6-8) y 5 (FII-7-1 a FII-7-5) fracciones combinadas, respectivamente. Las fracciones FII-6-2 y FII-7-1 (59.4 mg) se reunieron y sometieron a CC abierta obteniéndose 7 fracciones combinadas (FII-6-7-A a FII-6-7-H). La fracción FII-6-7-A se sometió a CC abierta dando lugar a 9

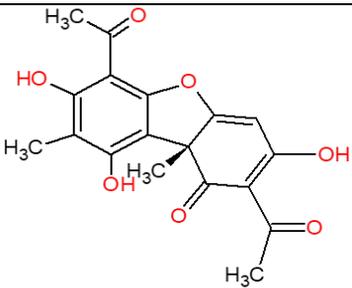
fracciones combinadas (FII-6-7-A-1 a FII-6-7-A-9); la CCDP de la fracción FII-6-7-A-1 sección experimental (punto 4.2.5.5) condujo a la obtención de ácido úsnico (5).

El estudio químico de *E. cirrhatum* condujo a la obtención de los compuestos: ácido salazínico (1), pseudocifelarina A (2), ácido atrárico (3), atranorina (4) y ácido úsnico (5) (Tabla 5-1). El compuesto 1 resultó ser el más abundante en el hongo liquenizado seguido de 4, 2, 3 y 5. Cabe mencionar, que los compuestos 2 y 5, son por primera vez reportados para esta especie y el género en este estudio.

**Tabla 5 - 1.** Compuestos aislados del hongo liquenizado *Everniastrum cirrhatum*.

Compuesto	Peso (mg)	% de rendimiento*	Origen
 <p>ácido salazínico (1)</p>	3366.0	3.37	Sólido precipitado durante la extracción, FII-9 y FIII-8
 <p>pseudocifelarina A (2)</p>	18.4	0.018	LII
 <p>ácido atrárico (3)</p>	11.6	0.012	FI-1 y FII-5-2
 <p>atranorina (4)</p>	98.6	0.099	LIII, FIV-1-2 y FII-5-3

**Tabla 5 - 2.** (continuación) Compuestos aislados del hongo liquenizado *Everniastrum cirrhatum*.

Compuesto	Peso (mg)	% de rendimiento*	Origen
 <p>ácido úsnico (5)</p>	4.6	0.0046	FII-6-7-a-1

\* El rendimiento se expresa como un porcentaje en masa de compuesto aislado respecto del material liquenico seco de partida (100 g).

## 5.2.2 Caracterización estructural de los compuestos aislados

Los compuestos aislados y purificados en este estudio fueron sometidos a la determinación de sus constantes físicas y datos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en modalidad uní y bidimensional, a fin de llevar a cabo su caracterización estructural y corroboración de su identidad. Sus datos espectroscópicos se compararon con los reportados en la literatura *inter alia* (Huneck, 1999; Perico - Franco, et al., 2015a; Rojas, et al., 2015).

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos **1** a **5** concuerdan con las descritas en la literatura para el ácido salzínico (**1**) (Eifler - Lima, et al., 2000), pseudocifelarina A (Huneck, 1984), ácido atrarico (**3**) (Ahad, et al., 1991), atranorina (**4**) (Nasser, et al., 2009) y ácido úsnico (**5**) (Diaz - Santos, 2008), respectivamente.

### 5.2.2.1 Ácido salazínico (1)

En el espectro de absorción al infrarrojo ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Figura 9-1, Anexo) se aprecian bandas indicativas de la presencia de grupos hidroxilo asociados (3576), aromaticidad (1558 y 1438), estiramiento  $\text{C}=\text{O}$  posiblemente de carbonilo de aldehído (1662), bandas características de aldehído en (2850 y 2958), estiramientos  $\text{C}=\text{O}$  entre (1774 y 1743) así como también estiramientos  $\text{C}-\text{O}$  entre (1141 y 1080).

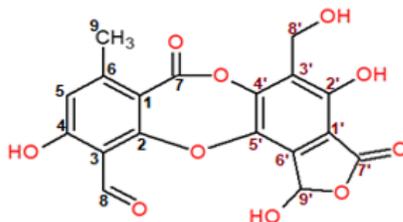
Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Tabla 5-2; Figura 9-2, Anexo) mostró cinco señales simples correspondientes a un metilo, un metileno y tres metinos. El metilo ( $\delta$  2.46, H-9) se encuentra unido a un anillo aromático (A), mientras que el metileno ( $\delta$  4.65, H-8') y uno de los metinos ( $\delta$  6.81, OH-9') que se encuentra oxigenado, dado su valor de desplazamiento

químico, correspondientes al metileno base del alcohol sobre el anillo aromático B y al metino de una lactona. Los metinos en  $\delta$  6.88 (H-5) y 10.44 (H-8) confirmaron aromaticidad y un formilo en **1**, respectivamente.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabla 5-2; Figura 9-3, Anexo) estableció la presencia de dieciocho carbonos diferentes en **1**. Sus desplazamientos químicos confirmaron la presencia de un metilo sobre anillo aromático ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  21.8/2.46 (C-9)), un metileno ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  53.2/4.65 (C-8')), y un metino de hemiacetal ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  95.5/6.81 (C-9')); un formilo ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  198.2/10.46 (C-8)); un carbonilo de éster ( $\delta_{\text{C}}$  160.8 (C-7) y doce carbonos aromáticos ( $\delta_{\text{C}}$  166.4 a 110.2) de los cuales, uno está sin sustituir ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  117.9/6.88 (C-5)) y once son cuaternarios, de los cuales, a su vez, cinco están oxigenados tomando como base el valor de su desplazamiento químico ( $\delta_{\text{C}}$  164.5, 148.5, 138.5, 164.1, 153.2). Esto último, indicó la presencia de dos anillos aromáticos polisustituídos en **1**.

A partir de las correlaciones H→C observadas en el espectro bidimensional HMBC (Figura 5-2; Figura 9-4, Anexo): a) H-5 ( $\delta$  6.81) con C-9 ( $\delta$  21.9), C-3 ( $\delta$  111.2), C-5 ( $\delta$  117.9), C-4 (164.5); b) H-8 ( $\delta$  10.44) con C-2 ( $\delta$  164.1), C-4 ( $\delta$  164.5) y C-8 (193.2); c) H-9 ( $\delta$  2.45) con C-1 ( $\delta$  112.4), C-6 ( $\delta$  152.7) y C-9 ( $\delta$  21.9); se dedujo un patrón de  $\beta$ -orcinol pentasustituído en el anillo A (Huneck, 1999).

De manera adicional, a partir de las correlaciones HMBC observadas entre los hidrógenos del metileno en  $\delta_{\text{H}}$  4.65 (H-8') con el carbono cuaternario en  $\delta_{\text{C}}$  123.9 (C-3'), así como con los dos carbonos aromáticos cuaternarios oxigenados en  $\delta_{\text{C}}$  148.6 (C-4') y  $\delta_{\text{C}}$  153.2 (C-2'), confirmaron la entidad benzilmetileno en el anillo B de **1**. Finalmente, las señales  $\delta_{\text{C}}$  111.1 (C-1') y 137.8 (C-6') (Tabla 5-2) fueron características para los carbonos restantes de fusionados a la lactona (Huynh, et al., 2016), mientras que la señal en  $\delta_{\text{C}}$  138.5 (C-5') mostró la presencia de un segundo grupo oxigenado en el anillo B unido mediante un enlace éter al anillo A. La unión entre los anillos aromáticos A y B se realiza a partir de enlace éster entre C-1 and C-4' de acuerdo con previos estudios (Huneck, 1999; Cordoba, 1975). A través del análisis descrito se determinó que **1** era el ácido salazínico previamente aislado de esta especie.



**Figura 5 - 1.** Estructura química del ácido salazínico (1)

**Tabla 5 - 3.** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido salazínico (1).

Posición	$\delta_C$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult.		HMBC	
	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>
1	112.4	111.9	-	-	-	C-5, C-9
2	164.1	163.9	-	-	-	C-5, C-9
3	111.2	110.3	-	-	-	C-5, C-8, C-4
4	164.5	164.9	12.05 (s, 1H-OH-4)	12.12 (s, 1H-OH-4)	-	C-5, C-9, C-4
5	117.9	117.5	6.88 (s, 1H)	6.80 (s, 1H)	C-9, C-4, C-3	C-9, C-8, C-4
6	152.7	152.8	-	-	-	C-9
7	160.8	160.0	-	-	-	C-5, C-9
8	193.2	193.5	10.46 (s, 1H)	10.50 (s, 1H)	C-2, C-4	C-5
9	21.9	21.9	2.46 (s, 3H)	2.47 (s, 3H)	C-1, C-6, C9	C-5
1'	111.1	109.6	-	-	-	-
2'	153.2	153.3	8.30 (s, 1H-OH-2')	8.53 (s, 1H-OH-2')	-	C-8'
3'	123.9	122.5	-	-	-	C-8'
4'	148.6	147.9	-	-	-	C-8'
5'	138.5	137.6	-	-	-	-
6'	137.8	137.5	-	-	-	-
7'	166.5	166.3	-	-	-	C-9'
8'	53.2	54.2	4.65 (s, 2H)	4.69 (s, 2H)	C-2', C-3', C4'	-
9'	95.5	95.2	6.81 (s, 1H)	6.85 (s, 1H)	-	-

<sup>a</sup> Tomado en DMSO  $d_6$  ( $^1H$ ; 400 MHz y  $^{13}C$  100 MHz). <sup>b</sup> Tomado en  $CHCl_3$ -DMSO  $d_6$  y  $Me_2CO$   $d_6$  (Eifler - Lima, et al., 2000; Huneck, 1999).

### 5.2.2.2 Pseudocifelarina A (2)

En el espectro de absorción al infrarrojo ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Figura 9-5, Anexo) se aprecian bandas indicativas de la presencia de grupos hidroxilo asociados (3433), bandas asociadas a aromaticidad (1577, 1438), estiramientos C=O posiblemente de grupo aldehído (1654), así como también de grupo éster (1253).

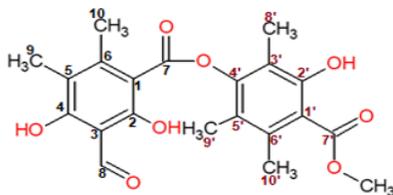
Su espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Tabla 5-3; Figura 9-6, Anexo) mostró seis singletes correspondientes a cinco metilos y un metoxilo. Dos metilos ( $\delta$  2.21, H-9 y 2.50, H-10) se encuentran unidos al anillo aromático A, mientras que un metoxilo ( $\delta$  4.01, C7-COOCH<sub>3</sub>) y tres metilos ( $\delta$  2.11, H-8'; 2.09, H-9' y 2.73, H-10') están en el anillo aromático B. Además, se evidencian tres señales de hidroxilos sobre anillo aromático dado su valor de desplazamiento químico ( $\delta$  13.10, OH-2; 12.41, OH-4; y 11.13, OH-2') y un formilo ( $\delta$  10.41, H-8).

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabla 5-3; Figura 9-7, Anexo) estableció la presencia de veintinueve señales de carbonos diferentes en **2**. Sus desplazamientos químicos confirmaron la presencia de cinco metilos sobre anillo aromático ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  10.8/2.21 (C-9)), ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  18.9/2.50 (C-10)), ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  9.8/2.11 (C-8')), ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  13.3/2.09 (C-9')), ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  20.5/2.73 (C-10')) y un metoxilo ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  52.35/4.01 (C7'-COOCH<sub>3</sub>)); un formilo ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  194.0/10.41 (C-8)); un carbonilo de éster ( $\delta_{\text{C}}$  169.8 (C-7)) y doce carbonos aromáticos cuaternarios ( $\delta_{\text{C}}$  102.9 a 171.0), de los cuales cuatro son oxigenados ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  166.9/13.10 (C-2)) ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  166.1/12.41 (C-4)) ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  158.9/11.13 (C-2')) y ( $\delta_{\text{C}}$  150.1 (C-4')).

A partir de las correlaciones H $\rightarrow$ C observadas en el espectro bidimensional HMBC (Tabla 5-3; Figura 9-8 y 9-9 Anexo): a) H-2 ( $\delta$  13.10) con C-1 ( $\delta$  102.8), C-2 ( $\delta$  166.9) y C-3 ( $\delta$  107.9); b) H-4 ( $\delta$  12.41) con C-3 ( $\delta$  107.9), C-4 ( $\delta$  166.1) y C-5 (118.2); c) H-8 ( $\delta$  10.41) con C-3 ( $\delta$  107.9), C-4 ( $\delta$  166.1) y C-8 (194.0); d) H-9 ( $\delta$  2.21) con C-4 ( $\delta$  166.1), C-5 ( $\delta$  118.2), C-6 ( $\delta$  151.5) y C-9 ( $\delta$  10.8); e) H-10 ( $\delta$  2.50) con C-1 ( $\delta$  102.8), C-5 ( $\delta$  118.2), C-6 ( $\delta$  151.5) y C-9 ( $\delta$  10.8); se dedujo el patrón de  $\beta$ -orcinol pentasustituido en el anillo A, con sustituciones similares en el anillo B (Huneck, 1999).

De manera adicional, a partir de las correlaciones HMBC observadas entre los hidrógenos del metilo en  $\delta_{\text{H}}$  2.11 (H-8') con el carbono cuaternario aromático oxigenado  $\delta_{\text{C}}$  150.1 (H-

4') indica la unido mediante un enlace éter al anillo A. A través del análisis descrito se determinó que **2** era la pseudociferalina A primera vez reportada para la especie.



**Figura 5 - 2.** Estructura química de la pseudociferalina A (**2**)

**Tabla 5 - 4.** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para la pseudociferalina A (**2**).

Posición	$\delta_C$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult.		HMBC			
	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>c</sup>		
1	102.8	102.9	-	-	-	-		
2	166.9	167.0	13.10 (s, 1H-OH-2)	-	C-1, C-3, C-2	C-1, C-3, C-2		
3	107.9	108.0	-	-	-	-		
4	166.1	166.1	12.41 (s, 1H-OH-4)	-	C-3, C-4, C-5	C-3, C-4, C-5		
5	118.2	118.2	-	-	-	-		
6	151.5	151.5	-	-	-	-		
7	169.8	169.7	-	-	-	-		
8	194.0	194.0	10.41 (s, 1H)	10.25 (s, 1H)	C4, C3, C8	C-3, C-4, C-5		
9	10.8	10.7	2.21 (s, 3H)	2.38 (s, 3H)	C-4, C-5, C-6, C9	C-4, C-5, C-6		
10	18.9	18.8	2.50 (s, 3H)	2.08 (s, 3H)	C-1, C-5, C-6, C10	C-1, C-5, C-6		
1'	116.0	116.2	-	-	-	-		
2'	158.9	159.0	11.13 (s, 1H-OH-2')	-	C1', C2'	-		
3'	111.9	111.9	-	-	-	-		
4'	150.1	150.1	-	-	-	-		
5'	120.5	120.5	-	-	-	-		
6'	137.6	137.6	-	-	-	-		
7'	171.0	172.1	-OMe 52.3	-COOMe 52.35	4.01 (s, 3H)	3.82 (s, 3H)	C7'	-
8'	9.8	9.7	2.11 (s, 3H)	2.05 (s, 3H)	C8', C3', C2'	-		

9'	13.3	19.2	2.09 (s, 3H)	2.13 (s, 3H)	C9', C6', C5', C4'	-
10'	20.5	20.4	2.73 (s, 3H)	2.05 (s, 3H)	C1', C5', C10'	-

<sup>a</sup> Tomado en CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H; 400 MHz y <sup>13</sup>C 100 MHz). <sup>b</sup> Tomado en CHCl<sub>3</sub>-DMSO d<sub>6</sub> (Huneck, 1984; Huneck, 1999).

### 5.2.2.3 Ácido atrárico (3)

En el espectro de absorción al infrarrojo (cm<sup>-1</sup>) (Figura 9-10, Anexo) se pueden apreciar bandas indicativas de la presencia de grupos hidroxilo asociados (3406), aromaticidad (1500 y 1450), estiramiento C=O para grupo aldehído (1729) y tensión C-O de enlace éster (1273).

El espectro de RMN <sup>1</sup>H de **3** (Tabla 5-4; Figura 9-11, Anexo), exhibió dos señales para los hidrógenos de los grupos metilos C-8 y C-9 sobre el anillo aromático ( $\delta$  2.12, 3H, s y 2.48, 3H, s), una señal para el éster metílico ( $\delta$  3.94, 3H, s), un hidrógeno aromático H-5 ( $\delta$  6.23, 1H, s) y de hidroxilo ( $\delta$  12.04, OH-2).

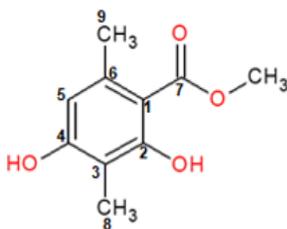


Figura 5 - 3. Estructura química del ácido atrárico (3)

Tabla 5 - 5. Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido atrárico (3).

Posición	$\delta_c$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult.		HMBC	
	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>
1	105.2	105.2	-	-	-	-
2	158.1	158.0	12.05 (s, 1H-OH-2)	12.04 (s, 1H-OH-2)	C-2, C-1, C-3, C-4	-
3	108.6	108.5	-	-	-	-
4	163.2	163.1	-	5.23 (s, 1H-OH-4)	-	C-3, C-5, C-4, C-8
5	110.6	110.5	6.23 (s, 1H)	6.20 (s, 1H)	C-5, C-9, C-1, C-2, C-3	C-6, C-9
6	140.1	140.2	-	-	-	-
7 -COOMe	172.6 51.8	172.6 51.8	- 3.94 (s, 3H)	- 3.92 (s, 3H)	- C-7	- C7

8	7.6	7.6	2.12 (s, 3H)	2.10 (s, 3H)	C-8, C-4, C-3, C-2	C-2, C3
9	24.1	24.1	2.48 (s, 3H)	2.45 (s, 3H)	C-9, C-1, C-5, C-6	C-1, C-5, C-6

<sup>a</sup> Tomado en CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H; 400 MHz y <sup>13</sup>C 100 MHz). <sup>b</sup> Tomado en CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub> (Huneck, 1999; Güvenç, et al., 2012).

El espectro de RMN <sup>13</sup>C (Tabla 5-4; Figura 9-12, Anexo) estableció la presencia de diez señales de carbonos diferentes en **3**. Sus desplazamientos químicos confirmaron la presencia de dos metilos sobre anillo aromático ( $\delta_C/\delta_H$  7.6/2.12 (C-8) y ( $\delta_C/\delta_H$  24.1/2.48 (C-9)); un metoxilo ( $\delta_C/\delta_H$  51.8/3.94 (C-7-COOCH<sub>3</sub>)) y un metino ( $\delta_C/\delta_H$  110.6/6.23 (C-5)); seis carbonos de anillo aromático de los cuales cinco son cuaternarios ( $\delta_C$  105.2 a 163.2), de los cuales dos están hidroxilos de acuerdo con su valor de desplazamiento químico ( $\delta_C/\delta_H$  158.1/12.05 (C-2)) y ( $\delta_C$  163.2 (C4)), cabe resaltar que esta señal es muy débil en el espectro por lo cual se infiere su presencia debido a el patrón orcinol de esta sustancia.

A partir de las correlaciones H→C observadas en el espectro bidimensional HMBC (Tabla 5-4, Figura 9-13 Anexo): a) H-2 ( $\delta$  12.05) con C-1 ( $\delta$  105.2), C-2 ( $\delta$  158.1), C-3 ( $\delta$  108.6) y C-4 ( $\delta$  163.2); b) H-5 ( $\delta$  6.23) con C-1 ( $\delta$  105.2), C-2 ( $\delta$  158.1), C-3 ( $\delta$  108.6), C-5 ( $\delta$  110.6) y C-9 ( $\delta$  24.1); c) -OCH<sub>3</sub> ( $\delta$  3.94) con C-7 ( $\delta$  172.6); d) H-8 ( $\delta$  2.12) con C-2 ( $\delta$  158.1), C-3 ( $\delta$  108.6), C-4 ( $\delta$  163.2) y C-8 ( $\delta$  7.6) y e) H-9 ( $\delta$  2.48) con C-9 ( $\delta$  24.1), C-1 ( $\delta$  105.2), C-5 ( $\delta$  110.6) y C-6 ( $\delta$  140.1) se confirmó el patrón de  $\beta$ -orcinol en el compuesto **3** y corroborándose la estructura del ácido atrárico, sustancia que ya ha sido aislada para esta especie (Khanuja Singh, et al., 2005).

#### 5.2.2.4 Atranorina (4)

En el espectro de absorción al infrarrojo (cm<sup>-1</sup>) (Figura 9-14, Anexo) se pueden apreciar bandas indicativas de la presencia de grupos hidroxilo asociados (3425), aromaticidad (1581, 1450, 1408), estiramiento C=O para grupo aldehído (1654) y tensión C-O de enlace éster (1273).

Su espectro de RMN <sup>1</sup>H (Tabla 5-5; Figura 9-15, Anexo) mostró siete singletes correspondientes a tres metilos, un metoxilo y tres metinos. Uno de los metilos ( $\delta$  2.71, H-9) se encuentra unido al anillo aromático A, mientras que un metoxilo ( $\delta$  4.01, C7-COOCH<sub>3</sub>) y dos metilos ( $\delta$  2.12, H-8' y 2.57, H-9') están en el anillo B. Además, se evidencian tres señales de hidroxilos sobre anillo aromático dado su valor de desplazamiento químico ( $\delta$

12.51, OH-2; 12.57, OH-4; y 11.96, OH-2'), dos metinos ( $\delta$  6.43, H-5 y 6.54, H-5') y un formilo ( $\delta$  10.38, H-8), respectivamente en 4.

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabla 5-5; Figura 9-16, Anexo) estableció la presencia de diecinueve señales de carbonos diferentes en 4. Sus desplazamientos químicos confirmaron la presencia de tres metilos sobre anillo aromático ( $\delta_C/\delta_H$  25.5/2.71 (C-9)), ( $\delta_C/\delta_H$  9.4/2.12 (C-8')), ( $\delta_C/\delta_H$  24.0/2.57 (C-9')) y un metoxilo ( $\delta_C/\delta_H$  52.3/4.01 (C7'-COOCH<sub>3</sub>)); un formilo ( $\delta_C/\delta_H$  193.8/10.38 (C-8)); dos carbonilos de éster ( $\delta_C$  169.7 (C-7)) y ( $\delta_C$  172.2 (C-7')), además de doce carbonos aromáticos ( $\delta_C$  102.9 a 172.2), de los cuales diez son cuaternarios, cuatro oxigenados ( $\delta_C/\delta_H$  169.1/12.52 (C-2)) ( $\delta_C/\delta_H$  167.5/12.57 (C-4)) ( $\delta_C/\delta_H$  162.9/11.96 (C-2')) y ( $\delta_C$  152.0 (C-4')) y dos son metinos ( $\delta_C/\delta_H$  112.9/6.43 (C-5)) y ( $\delta_C$  116.0/6.54 (C-5')).

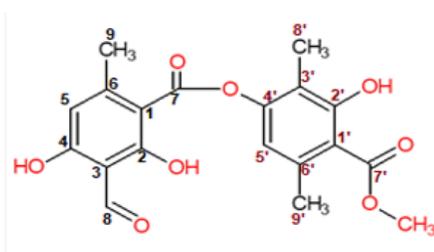


Figura 5 - 4. Estructura química de la atranorina (4)

Tabla 5 - 6. Datos de Resonancia Magnética Nuclear de la atranorina (4).

Posición	$\delta_C$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult.		HMBC	
	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>c</sup>
1	102.9	103.0	-	-	-	-
2	169.1	169.0	12.52 (s, 1H-OH-2)	12.51 (s, 1H-OH-2)	C-1, C-3, C-2	C1
3	108.6	108.7	-	-	-	-
4	167.5	167.5	12.57 (s, 1H-OH-4)	12.56 (s, 1H-OH-4)	C-3, C-5, C-4	C5, C4
5	112.9	112.8	6.43 (s, 1H)	6.40 (s, 1H)	C-9, C-1, C-3, C-4	C1, C3, C6
6	139.9	152.3	-	-	-	-
7	169.7	169.6	-	-	-	-
8	193.8	193.6	10.38 (s, 1H)	10.36 (s, 1H)	C-8, C-3, C-4, C-5	C2, C4
9	25.5	24.4	2.71 (s, 3H)	2.69 (s, 3H)	C-9, C-1, C-5, C7	-

1'	116.8	116.8	-		-	-
2'	162.9	162.8	11.96 (s, 1H-OH-2')	11.96 (s, 1H-OH-2')	C-3', C-1', C-4', C-2'	C1'
3'	110.3	110.4	-	-	-	-
4'	152.0	152.1	-	-	-	-
5'	116.0	116.0	6.54 (s, 1H)	6.51 (s, 1H)	C-9', C-3', C-1', C-4, C-6'	C1', C3', C9'
6'	152.4	139.8	-	-	-	-
7'	172.2 COOMe:52.3	172.1 52.2	- 4.01 (s, 3H)	- 3.99 (s, 3H)	C-7', C-3'	C7'
8'	9.4	9.4 ( $\delta$ 2.09 s, 3H)	2.12 (s, 3H)	-	C-8', C-4', C-1', C-2', C-3'	-
9'	24.0	23.8 ( $\delta$ 2.69 s, 3H)	2.57 (s, 3H)	-	C-9', C-6', C-5', C-1'	-

<sup>a</sup> Tomado en CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H; 400 MHz y <sup>13</sup>C 100 MHz). <sup>b</sup> Tomado en CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub> (Huneck, 1999; Perico Franco, 2011).

A partir de las correlaciones H→C observadas en el espectro bidimensional HMBC (Tabla 5-5; Figura 9-17 y 9-18, Anexo): a) H-2 ( $\delta$  13.10) con C-1 ( $\delta$  102.9), C-2 ( $\delta$  169.1) y C-3 ( $\delta$  108.6); b) H-4 ( $\delta$  12.41) con C-3 ( $\delta$  108.6), C-4 ( $\delta$  167.5) y C-5 (112.9); c) H-5 ( $\delta$  6.43) con C-1 ( $\delta$  102.9), C-3 ( $\delta$  108.6), C-4 (167.5) y C-9 (25.5.0); d) H-8 ( $\delta$  10.38) con C-3 ( $\delta$  108.6), C-4 ( $\delta$  167.5), C-5 (112.9) y C-8 (193.8); e) H-9 ( $\delta$  2.71) con C-1 ( $\delta$  102.9), C-5 ( $\delta$  112.9), C-7 ( $\delta$  169.7) y C-9 ( $\delta$  25.5); se dedujo el patrón de  $\beta$ -orcinol pentasustituido en el anillo A, con un patrón similar en el anillo B (Huneck, 1999).

De manera adicional, a partir de las correlaciones HMBC observadas entre los hidrógenos del metilo en  $\delta_H$  2.11 (H-8') con el carbono cuaternario aromático oxigenado  $\delta_c$  152.0 (H-4') indica la unión del anillo B mediante un enlace éter al anillo A. A través del análisis descrito se determinó que **4** era la atranorina, compuesto que ya ha sido aislado para esta especie.

### 5.2.2.5 Ácido úsnico (5)

En el espectro de absorción al infrarrojo (cm<sup>-1</sup>) (Figura 9-19, Anexo) se aprecian bandas indicativas de la presencia de grupos hidroxilo asociados (3425 y 2920.23), estiramiento =C-H aromático (2920), estiramiento de grupo C-O (1288 y 1192), además estiramiento C=O en (1627) posiblemente de cetona y en (1735) de lactona.

El espectro de RMN <sup>1</sup>H (Tabla 5-6; Figura 9-20, Anexo) presentó todas sus señales simples mostrando un total de siete hidrógenos en la molécula. Cuatro señales de metilo, uno sobre

anillo aromático ( $\delta$  2.14, H-18) y otro ( $\delta$  1.69, H-13) unido a un carbono alifático, dos señales ( $\delta$  2.69, H-15 y 2.71, H-17) pertenecen a grupos metilos unidos a carbonilos de cetona. Además, se aprecia un metino aromático ( $\delta$  6.01, H-4) e hidroxilos fenólicos ( $\delta$  11.06, OH-10 y 13.34, OH-8).

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Tabla 5-6; Figura 9-21, Anexo) presentó un total de dieciocho carbonos en **5**. Se encontraron cuatro carbonos de metilo ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  32.1/1.79 (C-13); 27.9/2.69 (C-15); 31.3/2.71 (C-17) y 7.5/2.14 (C-18)), un metino vinílico ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  59.1 (C-12)), tres carbonilos de cetona ( $\delta_{\text{C}}$  198.1 (C-1); 200.3 (C-14) y 201.8 (C-16)) y diez carbonos cuaternarios de los cuales cinco están oxigenados ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  191.7 (C-3); 179.4 (C-5); 155.2 (C-6); 163.9/13.34 (C-8) y 157.5/11.06 (C-10)).

Las correlaciones observadas en el espectro heteronuclear carbono-hidrógeno (HMBC, Figura 9-22, Anexos), muestran relación entre a) H-4 ( $\delta$  6.01) con C-2 ( $\delta$  105.3), C-4 ( $\delta$  98.3), C-5 ( $\delta$  179.4) y C-12 ( $\delta$  59.1); b) H-8 ( $\delta$  13.34) con C-7 ( $\delta$  101.6), C-8 ( $\delta$  163.9) y C-9 ( $\delta$  109.4); c) H-10 ( $\delta$  11.06) con C-9 ( $\delta$  109.4), C-10 ( $\delta$  157.5) y C-11 ( $\delta$  104.0); d) H-13 ( $\delta$  1.79) con C-1 ( $\delta$  198.1), C-5 ( $\delta$  179.4), C-11 ( $\delta$  104.0) y C-12 ( $\delta$  59.1); e) H-15 ( $\delta$  2.69) con C-2 ( $\delta$  105.3), C-14 ( $\delta$  200.3) y C-15 ( $\delta$  27.9); f) H-17 ( $\delta$  2.71) con C-7 ( $\delta$  101.6) y H-18 ( $\delta$  2.14) con C-8 ( $\delta$  163.9), C-9 ( $\delta$  109.4), C-10 ( $\delta$  157.5) y C-18 ( $\delta$  7.5), comparando con los datos de literatura, permitieron confirmar la estructura del ácido úsnico (Huneck & Yoshimura, 1996), sustancia reportada por primera vez para la especie.

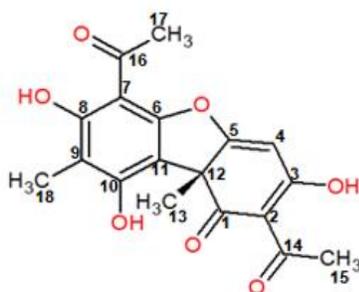


Figura 5 - 5. Estructura química del ácido úsnico (5)

**Tabla 5 - 7.** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para del ácido úsnico (5).

Posición	$\delta_c$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult.		HMBC	
	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>	Experimental <sup>a</sup>	Reportado <sup>b</sup>
1	198.1	198.0	-	-	-	C10
2	105.3	105.2	-	-	-	C4, C12
3	191.7	191.7	-	18.70 (s, 1H-OH-3)	-	C4
4	98.3	98.3	6.01 (s, 1H)	5.91 (s, 1H)	C12, C4, C2, C5	-
5	179.4	179.3	-	-	-	C4, C10
6	155.2	155.2	-	-	-	-
7	101.6	101.5	-	-	-	C7, C14
8	163.9	163.8	13.34 (s, 1H-OH-8)	13.3 (s, 1H-OH-8)	C7, C9, C8	C7, C15
9	109.4	109.3	-	-	-	C7, C9, C15
10	157.5	157.4	11.06 (s, 1H-OH-8)	11.0 (s, 1H-OH-8)	C11, C9, C10	C9, C15
11	104.0	103.9	-	-	-	C9, C10
12	59.1	59.0	-	-	-	C4, C7, C10
13	32.1	32.1	1.79 (s, 3H)	1.76 (s, 3H)	C12, C11, C5, C1	-
14	200.3	200.3	-	-	-	C12
15	27.9	27.9	2.69 (s, 3H)	2.65 (s, 3H)	C15, C14, C2	-
16	201.8	201.7	-	-	-	C14
17	31.3	31.2	2.71 (s, 3H)	2.67 s, 3H)	C7	-
18	7.5	7.5	2.14 (s, 3H)	2.10 (s, 3H)	C18, C9, C10, C8	-

<sup>a</sup> Tomado en CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H; 400 MHz y <sup>13</sup>C 100 MHz). <sup>b</sup> Tomado en CHCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub> (Huneck, 1999; Diaz - Santos, 2008).

## 5.3 Estudio de la actividad biológica del hongo liquenizado *Everniastrum cirrhatum*

### 5.3.1 Actividad antioxidante del extracto y liquenoquímicos de *E. cirrhatum*

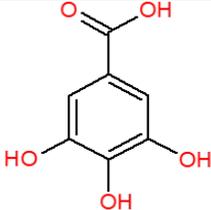
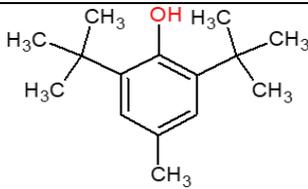
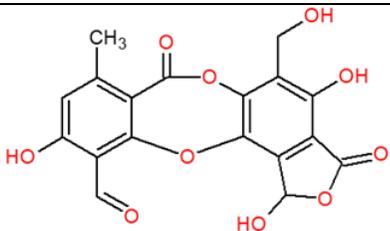
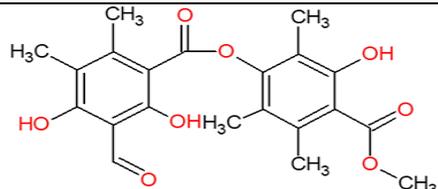
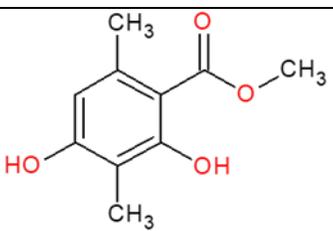
#### 5.3.1.1 Cuantificación del poder captador del radical libre DPPH• del extracto y compuestos aislados de *E. cirrhatum*

Durante años se ha reflejado el creciente interés por determinar la capacidad antioxidante de sustancias de origen natural, lo que ha generado un continuo desarrollado de diferentes técnicas espectrofotométricas que permiten dar un acercamiento a dicha capacidad. Se han reportado numerosos métodos que permiten evaluar la capacidad antioxidante (Miller, et al., 1996). En lo que respecta a capacidad captadora de radicales libres, están aquellos que utilizan radicales libres de naturaleza sintética como DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), el ABTS (2,2'-azino-bis ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y el ABAP (2,21 -azobis 2-amidinopropane) (Mesa - Vanegas, et al., 2015), además otras técnicas *in situ* que utilizan el radical hidroxilo (OH•), radical superóxido (O<sub>2</sub>•), radical alcoxilo (RO<sub>2</sub>•) entre otras (Halliwell, 2012).

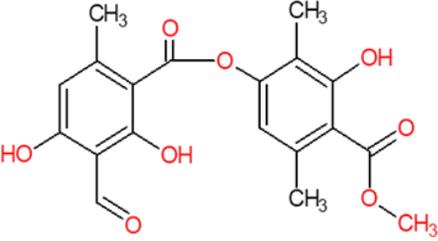
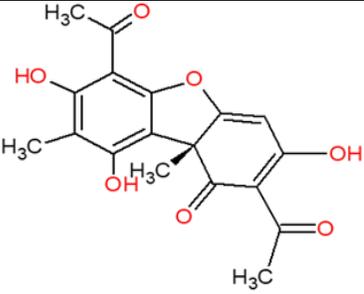
Para evaluar de forma cuantitativa la capacidad captadora de radicales libres del extracto acetónico de *E. cirrhatum*, sustancias liquénicas y patrones antioxidantes (ácido gálico y BHT), se utilizó el modelo de radical libre DPPH• (Brand - Williams, et al., 1995). A pesar de que el radical libre empleado en el mismo no es biológico, este modelo es utilizado ampliamente para evaluar la capacidad captadora de radicales libres en la búsqueda de compuestos antioxidantes, ya que este resulta simple, rápido, sensible, reproducible además de que encuentra implementado en el grupo de investigación.

La capacidad captadora de radicales libres del extracto acetónico, compuestos aislados de este y patrones antioxidantes se evaluó a partir de la determinación experimental de la concentración efectiva cincuenta (CE<sub>50</sub>), representativa de la concentración de compuesto necesaria para disminuir en un cincuenta por ciento la concentración inicial de radical libre DPPH•. Por consiguiente, entre menor sea la magnitud de la CE<sub>50</sub> para un compuesto, mayor será su poder captador de radicales libres. En la Tabla 5-7 se presentan los valores de CE<sub>50</sub> expresados en mg muestra / mg DPPH• o mol compuesto / mol DPPH• para los compuestos 1 al 5 y patrones antioxidantes.

**Tabla 5 - 8.** Poder captador de radicales libres ( $CE_{50}$ ) del extracto acetónico de *E. cirrhatum*, compuestos aislados y patrones.

Muestras	Actividad anti-radicales libres ( $CE_{50}$ )	
	mg muestra / mg DPPH*	mol compuesto / mol DPPH*
 ácido gálico ( <b>AG</b> )	0.0177	0.0371
 BHT	0.1739	0.3112
Extracto ( <b>E</b> )	0.4825	-
 ácido salazínico ( <b>1</b> )	9.4952	9.6429
 pseudocifelarina A ( <b>2</b> )	9.0357	8.8545
 ácido atrárico ( <b>3</b> )	3.6183	7.2720

**Tabla 5 - 9.** (continuación). Poder captador de radicales libres ( $CE_{50}$ ) del extracto acetónico de *E. cirrhatum*, compuestos aislados y patrones.

Muestras	Actividad anti-radicales libres ( $CE_{50}$ )	
	mg muestra / mg DPPH*	mol compuesto / mol DPPH*
 <p>atranorina (4)</p>	11.5058	12.1212
 <p>ácido úsnico (5)</p>	5.3257	6.0992

Con base en los datos obtenidos de  $CE_{50}$  (mg muestra / mg DPPH\*) (Tabla 5-7), el extracto (0.4825) mostró un poder captador de radicales libres menor que los antioxidantes control BHT (0.1739) y ácido gálico (0.0177), siendo más activo que sus constituyentes individuales. Lo anterior podría indicar que se estaría presentando un efecto sinérgico por parte de los constituyentes presentes en el extracto o que no se haya aislado el o los constituyentes responsables de dicha actividad. Comparando la actividad de los compuestos 1 a 5,  $CE_{50}$  (mol muestra / mol DPPH\*) el ácido úsnico (5) resultó ser el compuesto más activo seguido del ácido atrárico (3), y de los compuestos ácido salazínico (1) y pseudocifelarina A (2). Por su parte la atranorina (4) resultó ser el compuesto menos activo como captador de radicales libres. Estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, concuerdan con estos resultados que ponen en evidencia que tanto el ácido úsnico como el ácido atrárico presentan actividad antioxidante en este modelo (Rojas, et al., 2015; Perico - Franco, et al., 2015a).

### 5.3.1.2 Determinación de la reactividad de los compuestos aislados como agentes captadores de radicales libres

La reactividad de los compuestos liquénicos **1** a **5** como agentes captadores de radicales libres se estableció a partir de  $k_2$  (constante de velocidad de reacción de segundo orden), determinada experimentalmente a  $25.0 \pm 0.1$  °C (Espín, et al., 2000; Suja, et al., 2004).

El comportamiento cinético para cada uno de los sistemas estudiados del Ln [DPPH•] vs t fue de tipo lineal, permitiendo establecer que la cinética seguida por estos sistemas, bajo las condiciones experimentales, es de *pseudo*-primer orden. Con base en esto, se calculó  $k_2$  a partir de  $k_{obs}$  y la concentración inicial del compuesto (Tabla 5-8).

**Tabla 5 - 10.** Reactividad de los compuestos **1** a **5**, aislados de *E. cirrhatum* como agentes captadores de radicales libres ( $k_2$ ;  $25.0 \pm 0.1$  °C).

Compuesto	Relación [AH] <sub>0</sub> / [DPPH•] <sub>0</sub>	[AH] <sub>0</sub> μM	$k_{obs}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_2$ (M <sup>-1</sup> * s <sup>-1</sup> )	$k_{2promedio}$ (M <sup>-1</sup> * s <sup>-1</sup> )	± sd (M <sup>-1</sup> * s <sup>-1</sup> )
ácido gálico ( <b>AG</b> )	6:1	296.9	-0.00019333	0.6512	0.648	0.005
	10:1	433.9	-0.00027971	0.6447		
BHT	2:1	75.3	-0.00002903	0.3855	0.418	0.045
	3:1	150.6	-0.00006769	0.4495		
ácido salazínico ( <b>1</b> )	3:1	146.3	-0.00002550	0.1743	0.197	0.032
	6:1	292.6	-0.00006415	0.2192		
pseudocifelarina A ( <b>2</b> )	2:1	105.3	-0.00001239	0.1177	0.116	0.003
	4:1	210.6	-0.00002401	0.1140		
ácido atrárico ( <b>3</b> )	3:1	137.4	-0.00003575	0.2601	0.276	0.022
	4:1	157.1	-0.00004571	0.2910		
atranorina ( <b>4</b> )	5:1	282.6	-0.00002012	0.0712	0.061	0.015
	8:1	426.7	-0.00002127	0.0499		
ácido úsnico ( <b>5</b> )	3:1	129.1	-0.00001663	0.1288	0.129	0.002
	8:1	382.9	-0.00005035	0.1315		

Como se puede apreciar en la Tabla 5-8, los valores de  $k_2$  para los compuestos **1** a **5** resultaron significativamente inferiores ( $p < 0.05$ ) a los presentados para el ácido gálico y BHT, permitiendo establecer que los compuestos aislados en este estudio son menos reactivos como captadores de radicales libres que los patrones evaluados.

Teniendo presente que sustancias como el ácido ascórbico e isoeugenol son considerados antioxidantes de cinética rápida, pues cuando reaccionan con DPPH<sup>•</sup>, tardan cerca de un minuto para alcanzar el estado estacionario (estado en el que el % remanente de DPPH<sup>•</sup> en función del tiempo permanece constante); entre tanto antioxidantes como alfa-tocoferol y ácido rosmarinico son clasificados dentro de los de cinética intermedia (tardan hasta 30 minutos para alcanzar el estado estacionario) y los antioxidantes ácido gálico y BHT dentro de cinética lenta (tardan 6 o más horas para alcanzar este estado) (Brand - Williams, et al., 1995), podemos inferir que los compuestos evaluados **1** a **5** también son de cinética lenta, aunado al hecho de que ellos tardan alrededor de 27 horas para alcanzar dicho estado estacionario y a los menores valores que presentaron en  $k_2$ .

Comparando la reactividad de **1** a **5**, la atranorina (**4**) ( $k_2 = 0.061 \pm 0.015 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) resultó ser el compuesto menos reactivo mientras que el ácido atrárico fue el más reactivo (**3**) ( $k_2 = 0.276 \pm 0.022 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). En el caso de la atranorina la baja reactividad concuerda con su baja potencia para captar radicales libres ( $\text{CE}_{50}$  12.1212 mol muestra /mol DDPH<sup>•</sup>), mientras que para el ácido atrárico su mayor reactividad también coincide con una mayor potencia. Por su parte, los compuestos **2** (pseudocifelarina A) y **5** (ácido úsnico) no presentaron diferencias significativas en sus valores de  $k_2$  ( $p > 0.5$ ) indicando que poseen la misma reactividad como agentes captadores de radicales libres, siendo esta reactividad intermedia entre la presentada por **3** y **4**. Comparando la estructura de **2** vs **4**, se puede inferir que la presencia de sustituyentes metilo adicionales sobre los anillos aromáticos en los dépsidos (como ocurre en **2**) puede ser una característica estructural que favorece su reactividad como agente captador de radicales libres lo cual se ve reflejado en sus valores de  $k_2$ . Estos hallazgos concuerdan con estudios previos (Perico - Franco, et al., 2015a; Rojas, et al., 2015; Mishra, et al., 2011) donde de manera adicional, se ha encontrado que los compuestos monoaromáticos con patrón de  $\beta$ -orcinol, donde los grupos metilos se encuentran sin oxidar como en el caso de **3**, resultan más reactivos que los dépsidos con dicha característica estructural lo cual explicaría su mayor reactividad. Lo anterior, teniendo en cuenta el carácter activador o desactivador del anillo aromático por parte del grupo metilo o aldehído, respectivamente.

### 5.3.1.3 Determinación del poder reductor férrico o (PRF)

El ensayo de poder reductor férrico (PRF) es un método que permite la determinación cuantitativa de la capacidad de una sustancia para actuar como donador de electrones a especies oxidadas produciendo su reducción, para convertirlas así, en especies más estables, que no generen reacciones en cadena características de los procesos oxidativos (Fernández - Moriano, et al., 2015). Esta capacidad reductora puede servir como un indicador significativo del potencial antioxidante de una sustancia.

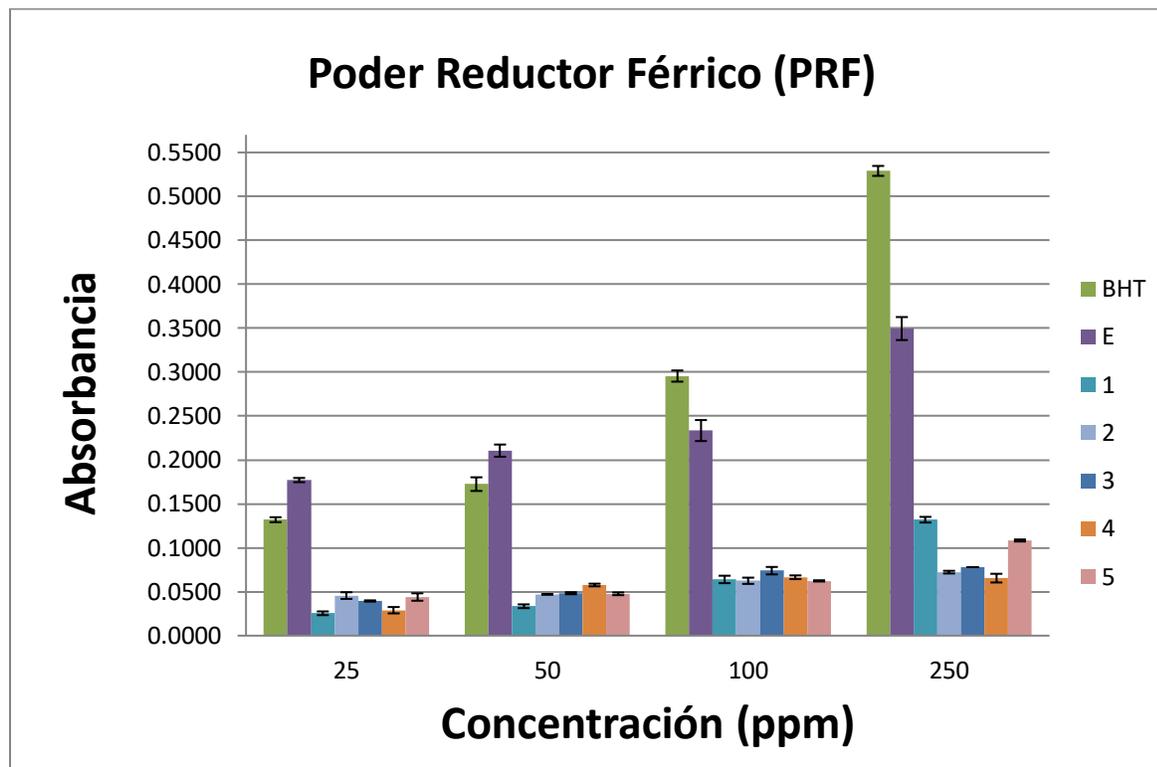
En este método el ion férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) es reducido a ion ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) por efecto de un agente antioxidante, dicha reducción se cuantifica mediante la formación del complejo de ferrocianuro ferroso  $\text{Fe}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  o azul de Turnbull (Benzie, et al., 1996) que se puede cuantificar espectrofotométricamente ( $\lambda$  700 nm). Valores mayores de absorbancia de la muestra, están asociados a un aumento en la concentración del complejo y es indicativo de un mayor poder reductor férrico ejercido por la sustancia analizada (Oyaizu, 1986).

Los resultados del PRF para el extracto acetónico de *E. cirrhatum*, compuestos aislados, y antioxidantes control se muestran en la Tabla 5-9 y Figura 5-6.

**Tabla 5 - 11.** Poder reductor férrico del extracto acetónico y compuestos aislados del *E. cirrhatum*.

Muestra	Poder reductor férrico (PRF $\pm$ sd) <sup>(a)</sup> (Absorbancia)			
	25 ppm	50 ppm	100 ppm	250 ppm
ácido gálico (AG)	0.7400 (0.0127)	1.2650 (0.0135)	2.2630 (0.1335)	3.9420 (0.0502)
BHT	0.1320 (0.0028)	0.1725 (0.0078)	0.2955 (0.0064)	0.5290 (0.0057)
Extracto (E)	0.1771 (0.0038)	0.2106 (0.0069)	0.2335 (0.0086)	0.3496 (0.0131)
ácido salazínico (1)	0.0255 (0.0021)	0.0335 (0.0021)	0.0640 (0.0042)	0.1320 (0.0201)
pseudocifelarina A (2)	0.0457 (0.0038)	0.0470 (0.0000)	0.0625 (0.0035)	0.0723 (0.0049)
ácido atrárico (3)	0.0395 (0.0007)	0.0483 (0.0012)	0,0740 (0.0042)	0.0780 (0.0000)
atranorina (4)	0.0290 (0.0036)	0.0577 (0.0015)	0.0665 (0.0021)	0.0655 (0.0049)
ácido úsnico (5)	0.0440 (0.0042)	0.0477 (0.0015)	0.0623 (0.0038)	0.1083 (0.0012)

(a) Cada valor representa el promedio de dos o tres medidas independientes  $\pm$  la desviación estándar, sd.



**Figura 5 - 6.** Poder reductor férrico del extracto acetónico, compuestos aislados del de *E. cirrhatum* y patrones. Extracto acetónico (**E**), ácido salazínico (**1**), pseudocifelarina A (**2**), ácido atrárico (**3**), atranorina (**4**), ácido úsnico (**5**) y butirato de hidroxitolueno (BHT).

De acuerdo con los resultados de poder reductor férrico, el extracto, los compuestos **1 a 5**, y los patrones antioxidantes (AG y BHT) presentaron una dependencia en el valor de PRF con la concentración evaluada, alcanzándose los mayores valores a una concentración de 250 ppm. De todas las sustancias evaluadas el ácido gálico resultó ser la sustancia que presentó mayor poder reductor férrico en todo el rango de concentración evaluado. A concentraciones por debajo de 250 ppm el extracto resultó ser más activo que BHT y que los compuestos **1 a 5**. Particularmente a 250 ppm el BHT resultó más activo que el extracto y que los compuestos aislados ( $p < 0.5$ ). Por otro lado, los compuestos **1 a 5** no presentaron diferencias significativas en el valor de PRF ( $p > 0.5$ ), en todo el rango de concentración evaluado, indicativo de que poseen la misma actividad (bajo PRF). Considerando que, en todo el rango de concentración evaluado, el extracto presentó mayor valor en PRF que sus compuestos aislados, esto podría deberse a un posible efecto sinérgico en el extracto.

### 5.3.1.4 Determinación del poder inhibidor de la peroxidación lipídica

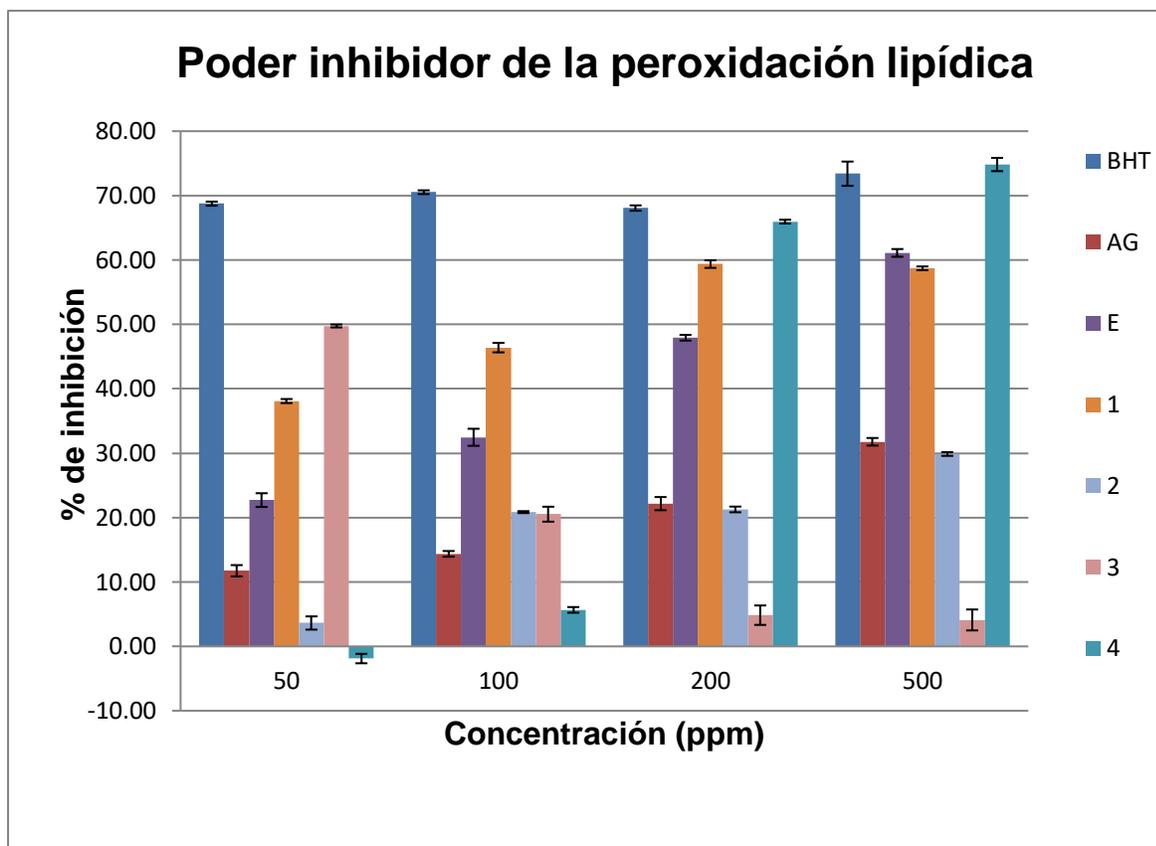
La peroxidación lipídica es un factor que está involucrado en el proceso de envejecimiento celular, y a su vez está relacionado con procesos patológicos que incluyen enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y con la progresión del cáncer (Dunaway, et al., 2018). Durante este proceso, se lleva a cabo la degradación oxidativa de los lípidos, iniciada por un mecanismo de reacción en cadena a través de la generación de radicales libres. Estos afectan por lo general a ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en las membranas celulares, siendo estos con mayor frecuencia el sustrato de ataque, además de las lipoproteínas y otras moléculas que contienen lípidos (Snezana, et al., 2014). Por esta razón, se hace necesaria la búsqueda de agentes antioxidantes que tengan como mecanismo de acción evitar la peroxidación de lípidos.

El poder inhibidor de la peroxidación lipídica tomando como modelo al ácido linoleico, (expresado como porcentaje de inhibición, % IPAL), para el extracto acetónico de *E. cirrhatum*, los compuestos aislados y los controles positivos (ácido gálico y BHT) fue evaluado a las 24 y 48 horas y a una temperatura de 37.0 °C. Considerando que a las 48 h se alcanzaron los mayores valores en % IPAL, estos resultados se presentan en la Figura 5-7 y Tabla 5-10.

**Tabla 5 -12.** Poder inhibidor de la peroxidación lipídica del extracto acetónico y compuestos aislados de *Everniastrum cirrhatum*.

Muestra	Poder inhibidor de la peroxidación % IPAL ( ± sd) <sup>(a)</sup>			
	50 ppm	100 ppm	200 ppm	500 ppm
ácido gálico ( <b>AG</b> )	11.74 (0.12)	14.37 (0.12)	22.17 (0.93)	31.77 (0.12)
BHT	68.75 (0.84)	70.53 (0.81)	68.06 (1.04)	73.40 (0.23)
extracto ( <b>E</b> )	22.72 (0.73)	32.47 (0.44)	47.93 (0.29)	61.10 (1.03)
ácido salazínico ( <b>1</b> )	38.10 (0.87)	46.39 (2.67)	59.36 (0.12)	58.70 (0.12)
pseudocifelarina A ( <b>2</b> )	3.63 (1.03)	20.85 (0.15)	21.27 (0.44)	29.88 (0.29)
ácido atrárico ( <b>3</b> )	49.75 (0.23)	20.53 (1.16)	4.84 (1.51)	4.11 (1.63)
atranorina ( <b>4</b> )	-1.89 (0.12)	5.66 (4.76)	65.96 (1.07)	74.82 (0.99)

<sup>(a)</sup>Cada valor representa el promedio de dos o tres medidas independientes ± la desviación estándar, sd



**Figura 5 - 7.** Poder inhibidor de la peroxidación lipídica del extracto y sustancias aisladas de *E. cirrhatum*. Extracto acetónico (E), ácido salazínico (1), pseudocifelarina A (2), ácido atrárico (3), atranorina (4), ácido gálico (AG) y butirato de hidroxitolueno (BHT).

Como se aprecia, el % IPAL presenta un comportamiento dependiente de la concentración para todas las muestras evaluadas, excepto para el BHT, que no mostró diferencias significativas en el % IPAL en todo el rango de concentración evaluado. Dados sus valores altos de % IPAL esto sería indicativo de su gran capacidad inhibidora de la peroxidación lipídica, expresada desde la concentración más baja (50 ppm) siendo el inhibidor de la peroxidación lipídica más potente en este estudio. En el caso del extracto y los compuestos 1, 2 y 4, su % IPAL aumentó de manera proporcional al incremento de su concentración mientras que en el caso del compuesto 3, su % IPAL disminuyó al aumentar su concentración permitiendo inferir un posible comportamiento prooxidante de este compuesto. El extracto, el ácido salazínico y la atranorina, presentaron mayor % IPAL que el ácido gálico a una concentración de 200 ppm ( $p < 0.5$ ) mientras que la pseudocifelarina A mostró el mismo poder inhibidor que el ácido gálico ( $p > 0.5$ ). A pesar de que el ácido gálico resultó ser el agente captador de radicales libres y reductor férrico más potente, fue menos activo como inhibidor de la peroxidación de lípidos que el BHT lo cual se podría

asociar a su mayor carácter hidrofílico que BHT, considerando que este ensayo tiene lugar en un medio lipofílico.

### 5.3.2 Evaluación de la actividad fotoprotectora del extracto y compuestos aislados de *Everniastrum cirrhatum*

#### 5.3.2.1 Determinación del factor de protección solar (FPS) *in vitro*

El factor de protección solar (FPS) es un parámetro que permite determinar la capacidad de un fotoprotector para proteger en contra de la radiación ultravioleta UVB (Hoffman, et al., 2000). El FPS se obtiene del cociente entre la mínima cantidad de energía necesaria para producir eritema mínimamente detectable (dosis mínima de eritema: MED) en piel con fotoprotección y la energía requerida para producir la MED sin la aplicación del mismo. Se debe tener en cuenta que este factor sólo considera el eritema producido por la radiación UVB y no otros efectos producidos por la radiación UVA.

De acuerdo con la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) a partir de los valores de FPS, los fotoprotectores pueden presentar diferentes niveles de protección: "mínima" cuando el FPS está entre 2 y 12; "moderada" cuando está entre 12 y 30; "alta" cuando es superior a 30 ( Food and Drug Administration, 2011). A su vez, el FPS determinado *in vitro* constituye un parámetro que correlaciona muy bien con las pruebas *in vivo* al relacionar la absorbancia de una sustancia con el efecto eritematogénico de la radiación e intensidad de la luz a las longitudes de onda específicas en la región UVB (Mansur, et al., 1986; Abreu - Dutra, et al., 2004).

El FPS del extracto acetónico, compuestos aislados de *E. cirrhatum* (1 a 5) y filtros solares: avobenzona (AVO / filtro UVA), tinosorb S (Tin.S / filtro UVA-UVB) y el ácido 2-fenil-5-bencimidazol-sulfónico (AFBS / filtro UVB), se presentan en la Tabla 5-11 y Figura 5-8.

Los resultados de FPS de las sustancias aisladas ácido salazínico (1), pseudocifelarina A (2), ácido atrárico (3), atranorina (4), ácido úsnico (5), además de los patrones fotoprotectores evaluados, permiten evidenciar de manera general un comportamiento dependiente de la concentración, ya que el FPS aumentó con el incremento de la concentración de la muestra evaluada.

**Tabla 5 - 13.** Actividad fotoprotectora (FPS,  $\lambda_{crit}$  y UVA-r\*) y permeabilidad dérmica (Log P y  $\Delta G$ ) del extracto acetónico y compuestos aislados de *E. cirrhatum*.

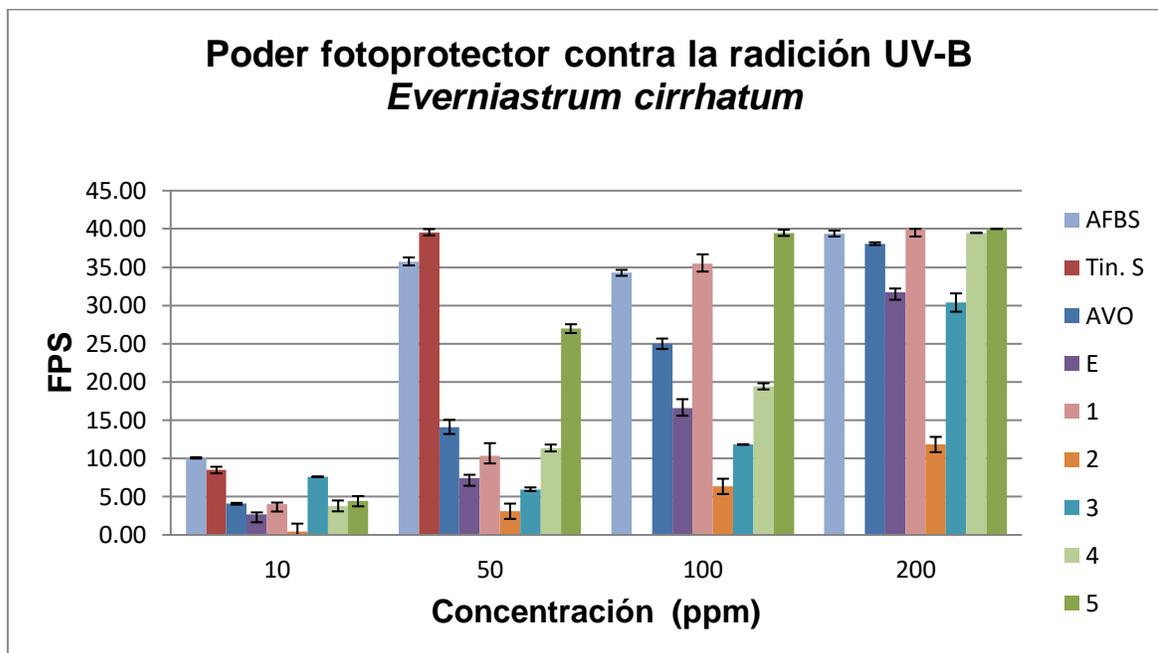
Muestra	Actividad fotoprotectora					Permeabilidad dérmica		
	Factor de Protección Solar (UVB) FPS ( $\pm$ sd)				Longitud de Onda Crítica (**)	Factor Protección UVA (**)	Coefficiente de reparto	Energía Libre de Transferencia
	10 ppm	50 ppm	100 ppm	200 ppm	$\lambda_{crit.}$ (nm) $\pm$ sd	UVA-r*	Log P $\pm$ sd	$\Delta G$ (kJ/mol) $\pm$ sd
AFBS	10.07 (0.15)	35.75 (3.50)	34.26 (2.33)	39.40 (0.09)	328.77 (0.61)	0.463 (0.016)	0.69 (0.26)	-3.96 (1.48)
Tin.S	8.48 (0.43)	39.57 (0.41)	> 40	> 40	364.20 (0.17)	1.713 (0.038)	9.14 (0.75)	-52.16 (4.28)
AVO	4.07 (0.12)	14.12 (0.92)	24.98 (0.68)	38.07 (0.17)	377.08 (0.58)	5.005 (0.004)	4.81 (0.17)	-27,46 (0.97)
E	2.66 (0.29)	7.43 (0.43)	16.59 (1.16)	31.74 (0.47)	344.92 (2.08)	0.472 (0.042)	-	-
1	4.06 (0.17)	10.34 (1.65)	35.42 (1.26)	40.01 (0.00)	341.00 (0.71)	0.435 (0.061)	0.98 (0.10)	-6.26 (0.75)
2	0.48 (0.04)	3.10 (0.08)	6.35 (0.37)	11.82 (0.67)	370.83 (2.14)	0.897 (0.039)	4.32 (0.32)	-24.69 (1.82)
3	7.60 (0.05)	5.97 (0.24)	11.82 (0.05)	30.38 (1.20)	321.00 (0.82)	0.136 (0.005)	2.32 (0.48)	-11.73 (1.33)
4	3.79 (0.71)	11.37 (0.45)	19.42 (0.40)	39.49 (0.80)	353.17 (0.75)	1.379 (0.008)	3.86 (0.44)	-22.06 (2.54)
5	4.41 (0.67)	26.96 (0.58)	39.49 (0.41)	40.01 (0.00)	364.00 (1.83)	0.723 (0.164)	1.43 (0.23)	-8.16 (1.24)

(\*\*)  $\lambda_{crit.}$  y UVA-r\*, están determinados para una concentración de 200 ppm. Cada valor de FPS,  $\lambda_{crit.}$ , UVA-r\*, LogP y  $\Delta G$  resulta del promedio de dos o tres medidas independientes  $\pm$  la desviación estándar, sd.

Comparando los valores de FPS de los fotoprotectores comerciales AVO y AFBS, se aprecia el carácter fotoprotector UVB del compuesto AFBS frente a AVO, dado su mayor valor de FPS en todo el rango de concentración, que era de esperar, dada la naturaleza fotoprotectora de AFBS (filtro UVB). Respecto a tinosorb S (filtro UVA/UVB), este presentó un valor intermedio en FPS a una concentración de 10 ppm, frente a los mostrados para AVO y AFBS, y a una concentración de 50 ppm, también mostró mayor capacidad fotoprotectora UVB que AFBS. A concentraciones más altas (100 y 200 ppm), presentó un valor de FPS superior a 40, que explicaría su gran capacidad fotoprotectora UVB.

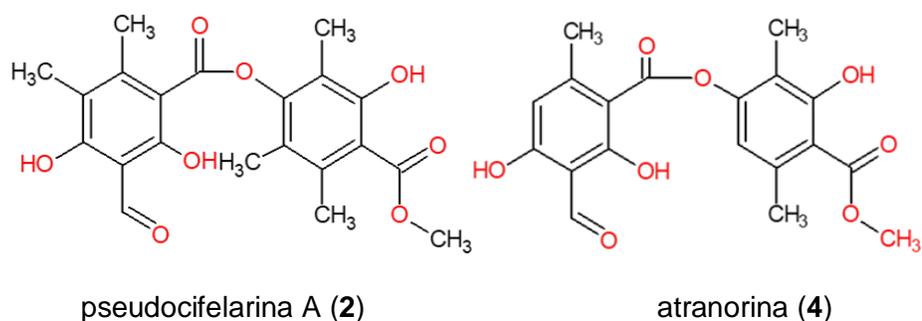
Al comparar los valores de FPS del extracto y compuestos **1** a **5**, es de resaltar el comportamiento de los ácidos salazínico (**1**) y ácido úsnico (**5**) que presentaron la mayor capacidad fotoprotectora UVB en todo el rango de concentración evaluado ( $p < 0.05$ ).

Considerando el valor de FPS de las muestras evaluadas a 200 ppm (concentración de referencia para este ensayo) y el criterio establecido por la ( Food and Drug Administration, 2011) para indicar el nivel de protección frente a esta radiación, los patrones AFBS, AVO, el extracto y los compuestos **1**, **3**, **4** y **5** estarían clasificados como fotoprotectores con un nivel de protección “alto” (FPS superior a 30) frente a la radiación UVB, mientras el compuesto **2** como un agente con nivel “mínimo” de protección (FPS entre 2 y 12).



**Figura 5 - 8.** Poder fotoprotector en contra de la radiación UVB del extracto acetónico y compuestos aislados de *E. cirrhatum*. Extracto acetónico (**E**), ácido salazínico (**1**), pseudocifelarina A (**2**), ácido atrárico (**3**), atranorina (**4**), ácido úsnico (**5**), ácido 2-fenil-5-bencimidazol-sulfónico (AFBS), Tinosorb S (Tin. S) y Avobenzona (AVO).

Teniendo presente que los compuestos **2** y **4** son dépsidos, cuya diferencia estructural radica en una mayor sustitución por grupos metilos en los anillos aromáticos (característica presente en **2**) (Figura 5-9), este tipo de sustituyentes hace que se genere un efecto batocrómico en la absorción del cromóforo, provocando un desplazamiento en su espectro de absorción hacia longitudes de onda mayores, lo cual explicaría la menor capacidad fotoprotectora UVB en **2**.



**Figura 5 - 9.** Comparación de las estructuras de los compuestos 2 y 4 aislados de *Everniastrum cirrhatum*.

### 5.3.2.2 Determinación de la longitud de onda crítica ( $\lambda_{crit}$ ), como metodología en la cuantificación del efecto fotoprotector frente a la radiación UVA

Hoy en día se ha evidenciado que la radiación UVA también puede resultar en daño significativo tisular y posterior aparición de patologías graves como cáncer de piel (Cole, et al., 1986) por ello es necesario protegerse de dicha radiación. La FDA ( Food and Drug Administration, 2011) estableció el parámetro de longitud de onda crítica ( $\lambda_{crit}$ ), como una prueba *in vitro* para evaluar el efecto fotoprotector frente a la radiación UVA y en conjunto con el FPS, establecer la amplitud de espectro de protección de las sustancias usadas como filtros solares (Catanedo - Càzares, et al., 2013). Este parámetro se define como la longitud de onda por debajo de la cual un agente fotoprotector absorbe el 90 % de la radiación solar en el rango de longitud de onda de 290 a 400 nm. Se ha establecido una escala de puntuación que va de 0 a 4 para clasificar la capacidad de los fotoprotectores de proteger frente a la radiación UVA: 0 ( $\lambda_{crit} < 325$  nm); 1 ( $325 \leq \lambda_{crit} < 335$  nm); 2 ( $335 \leq \lambda_{crit} < 350$  nm); 3 ( $350 \leq \lambda_{crit} < 370$  nm); 4 ( $370 \text{ nm} < \lambda_{crit}$ ), indicativos de “nula”, “baja”, “media”, “alta” y “muy alta” capacidad fotoprotectora frente a la radiación UVA, respectivamente Una sustancia se puede clasificar entonces de amplio espectro cuando la longitud de onda crítica  $\geq 370$  nm y su FPS es mayor 15 ( Food and Drug Administration, 2011).

Los resultados de  $\lambda_{crit}$  para el extracto y compuestos aislados de *E. cirrhatum* y patrones (AVO, AFBS y Tin. S) se muestran en Tabla 5-11. De acuerdo con los criterios de clasificación dados por FDA ( Food and Drug Administration, 2011), el patrón AVO ( $377.08 \pm 0.58$  nm) está clasificado en el nivel 4 con una “muy alta” cobertura frente a la radiación UVA concordando con lo esperado para esta sustancia. Por su parte, el AFBS ( $328.77 \pm 0.61$  nm) se ubica en el nivel 1, con “baja” cobertura frente a la radiación UVA, confirmando

su principal efecto fotoprotector frente a la radiación UVB dado su alto valor de FPS (ca. 39.40). El patrón Tin.S ( $364.20 \pm 0.17$ ) se ubica en el nivel 3, con una cobertura “alta” frente a la radiación UVA, sumada a su capacidad protectora UVB dada por su alto FPS ( $> 40$ ) confirmando su efecto fotoprotector UVA/UVB (Sambandan, et al., 2011). Estos resultados, permiten confirmar la validez de este parámetro para evaluar la actividad fotoprotectora frente a la radiación UVA (Diffey, 1994).

Para el caso del extracto y los compuestos **1** a **5**, el ácido atrárico (**3**) ( $321.00 \pm 0.82$  nm) se clasifica en un nivel 0, indicativo de “nula” protección frente a la radiación UVA, mientras que el extracto acetónico ( $344.92 \pm 2.08$  nm) y el ácido salazínico (**1**) ( $341.00 \pm 0.71$  nm) se ubican en el nivel 2, con una “media” protección frente a la radiación UVA. La atranorina (**4**) ( $353.17 \pm 0.75$  nm) y el ácido úsnico (**5**) ( $364.00 \pm 1.83$  nm) se clasifican en el nivel 3, con capacidad “alta” de protección frente a la radiación UVA aunado a sus propiedades fotoprotectoras “altas” (FPS superior a 30) frente a la radiación UVB similares a las presentadas por el Tin.S. Finalmente, la pseudocifelarina A (**2**) ( $370.87 \pm 0.75$  nm) se clasifica en el nivel 4, como una sustancia con una “muy alta” capacidad fotoprotectora frente a la radiación UVA, similar a la presentada por AVO. Considerando que **2** presentó una baja capacidad fotoprotectora UVB (FPS ca. 12), no puede ser considerada de amplio espectro, restringiendo su capacidad fotoprotectora a la radiación UVA. La mayor capacidad fotoprotectora UVA de **2** frente a **4** se puede explicar por el efecto batocrómico de los sustituyentes, previamente explicado en la sección 4.3.2.1.

Aunque el extracto y los compuestos **1**, **4** y **5**, presentaron capacidad fotoprotectora frente a la radiación UVA y UVB, tomando como base el criterio de la FDA ( Food and Drug Administration, 2011) que establece que para que un fotoprotector sea considerado de amplio espectro, este debe tener un valor de FPS  $\geq 15$  y un valor en la longitud de onda crítica  $\geq 370$  nm, éstos no podrían ser considerados fotoprotectores de amplio espectro.

### **5.3.2.3 Determinación de la relación UVA-r\* como criterio para evaluar efecto fotoprotector frente a la radiación UVA y UVB**

La relación UVA-r\* es un parámetro que determina la eficiencia de los fotoprotectores para proteger en contra de la radiación UVB y UVA. Por lo tanto, proporciona una buena idea de qué región UV está mejor bloqueada por las sustancias fotoprotectora (Diffey, 2009). La relación UVA / UVB se define entonces como la relación de las absorbancias medidas en rangos de longitud de onda distintivos: UVA (320-400nm) y UVB (290- 320nm),

permitiendo estimar específicamente el grado de protección de los fotoprotectores frente a la radiación ultravioleta.

De acuerdo con los resultados de UVA-r\* para el extracto acetónico y compuestos aislados de *E. cirrhatum* y patrones (AVO, AFBS y Tin. S) (Tabla 5-11), se evidencian diferentes grados de protección en contra de la radiación UVA (evaluado a 200 ppm). El patrón AVO presentó el mayor valor de UVA-r\* ( $5.005 \pm 0.004$ ) indicativo de una “máxima” capacidad para proteger frente a la radiación UVA vs UVB coincidentes con sus valores de FPS y  $\lambda_{crit}$ , seguido de Tin.S ( $5.005 \pm 0.004$ ) que también exhibe “máxima” capacidad fotoprotectora frente a esta radiación y por último AFBS que presentó el menor valor ( $0.463 \pm 0.016$ ). Estos resultados están de acuerdo con la naturaleza fotoprotectora de dichas sustancias.

Respecto al extracto y los compuestos aislados de *E. cirrhatum*, el compuesto **3** presentó el menor valor de UVA-r\* ( $0.136 \pm 0.005$ ) indicativo de su “nula” protección frente a la radiación UVA y preferencia para proteger frente a la radiación UVB, lo cual está de acuerdo con sus datos de FPS y  $\lambda_{crit}$ . Por su parte, los compuestos **4** (UVA-r\* ( $1.379 \pm 0.008$ )) y **5** (UVA-r\* =  $0.723 \pm 0.164$ ) presentaron valores mayores en este factor, indicativos de “máxima” y “sobresaliente” capacidad fotoprotectora frente a la radiación UVA, respectivamente, aunado a sus sobresalientes capacidades fotoprotectoras UVB. El extracto y el compuesto **1**, mostraron buena capacidad fotoprotectora UVA además de haber presentado propiedades fotoprotectoras UVB. Finalmente, la pseudocifelarina A (**2**), solamente mostró capacidad fotoprotectora UVA confirmada a partir de su  $\lambda_{crit}$  y UVA-r\*.

En conjunto, los resultados obtenidos de los tres parámetros *in vitro* evaluados para la actividad fotoprotectora, nos indican que el extracto acetónico y los compuestos **1**, **3**, **4** y **5** serían fotoprotectores idóneos para proteger en contra de la radiación UVB de acuerdo con su factor de protección solar, cabe resaltar que para los compuestos ácido salazínico (**1**) y atranorina (**4**) se corroboran los datos con estudios previos que indican esta fotoprotección, debido a que es muy común que se encuentran en altas concentraciones en la corteza del liquen y en la parte superior de la médula siendo metabolitos especializados en la fotoprotección del hongo liquenizado frente a las condiciones solares (Lüttge, et al., 2012).

Por otro lado, la capacidad fotoprotectora contra la radiación UVA determinada por la longitud de onda crítica es “nula” para el ácido atrárico (**3**); “media” para el extracto y ácido

salazínico (1); “alta” para la atranorina (4) y ácido úsnico (5) y “muy alta” para la pseudocifelarina A (2) la cual no posee capacidad fotoprotectora frente a la radiación UVB convirtiéndose, esta última en un posible candidato para actuar sinérgicamente con sustancias de protección UVB.

#### **5.3.2.4 Estimación preliminar del carácter lipofílico y la posible permeabilidad dérmica de los compuestos aislados de *E. cirrhatum***

Considerando que los compuestos estudiados podrían ser empleados como ingredientes de formulaciones destinadas a la piel a fin de prevenir daños causados por la radiación ultravioleta sobre esta y a que este órgano posee una naturaleza lipofílica, fue importante determinar de manera preliminar, la lipofilia y grado de permeabilidad que podrían presentar estas sustancias en dicho órgano. En este sentido, el coeficiente de reparto (P) y la energía libre molar de Gibbs de transferencia ( $\Delta_tG$ ), representan parámetros fisicoquímicos que permiten predecir de manera preliminar el grado de lipofilia y la permeabilidad dérmica, respectivamente de sustancias candidatas a ser empleadas como fotoprotectores. Valores de  $\text{Log } P < 1$ , en una sustancia están asociadas a una mayor dificultad de esta para el traspaso al estrato córneo de la piel a fin de ejercer su efecto protector; pero si  $\text{Log } P > 1$ , podrá atravesarlo sin dificultad siendo deseable que permanezca en él para ejercer su efecto y no se absorba (Choy, et al., 2011; Touitou, et al., 2008). Respecto a la energía libre molar de Gibbs de transferencia  $\Delta_tG$ , este parámetro nos permite predecir si el paso de la sustancia a través de membrana biológica ocurre o no, y si este proceso se da de manera espontánea mediante difusión pasiva, siendo favorable en aquellos casos en donde  $\Delta_tG$  resulta negativa.

A partir de los resultados obtenidos de  $\text{Log } P$  y  $\Delta_tG$  evaluados *in silico* (Tabla 5-11), se evidencia el carácter lipofílico de los compuestos pseudocifelarina A (2), ácido atrárico (3), atranorina (4) y ácido úsnico (5), siendo el más lipofílico el compuesto 2 lo cual es de esperarse dada su naturaleza química y menos lipofílico el compuesto 5 lo que se corrobora con estudios previos que indican una moderada lipofilicidad para el ácido úsnico (Santos Nunes, et al., 2016). Por otro lado, los patrones AVO y Tin.S también mostraron un carácter lipofílico mientras que AFBS, al igual que el ácido salazínico (1) presentaron un carácter hidrofílico.

Los valores de energía libre de transferencia de Gibbs  $\Delta_tG$  (kJ/mol), de todos los compuestos aislados, y los patrones fotoprotectores evaluados, presentaron valores

negativos en este parámetro, indicando que su paso a través de membrana podría ocurrir de manera espontánea mediante difusión pasiva, siendo energéticamente más favorable, para aquellos compuestos que presentaron un valor mucho más negativo, tal es el caso Tin. S ( $- 52.16 \pm 4.28$  kJ/mol), seguido de AVO ( $- 27.46 \pm 0.97$  kJ/mol) y de los compuestos aislados **2** ( $- 24.69 \pm 1.82$  kJ/mol), **4** ( $- 22.06 \pm 2.54$  kJ/mol) y **3** ( $- 11.73 \pm 1.33$  kJ/mol) y finalmente los compuestos **5** ( $- 8.16 \pm 1.24$  kJ/mol) y **1** ( $- 6.26 \pm 0.75$  kJ/mol) quienes presentan menor facilidad para difundirse a través de las membranas, de acuerdo con el ensayo *in silico*.

Teniendo en cuenta los resultados de actividad antioxidante (poder captador de radicales libres ( $CE_{50}$ ), reactividad ( $k_2$ ) como agente captador de radicales libres, poder reductor férrico (PRF) y poder inhibidor de la peroxidación de lípidos (% IPAL) y actividad fotoprotectora (FPS,  $\lambda_{crit}$ , UVA-r\*) de los compuestos aislados del liquen *E. cirrhatum* en conjunto con los parámetros que dan indicio de su permeabilidad a nivel del estrato córneo de la piel (Log P y  $\Delta_tG$ ) se destacan a los compuestos **1**, **4** y **5** como agentes duales con propiedades antioxidantes (cuyo mecanismo involucra la reducción de iones férricos y la inhibición de la peroxidación de lípidos) y fotoprotectoras, particularmente contra la radiación UVB. Adicionalmente, aunque el extracto y los compuestos **4** y **5** también presentaron capacidad fotoprotectora frente a la radiación UVA, tomando como base el criterio de la FDA ( Food and Drug Administration, 2011) que establece que para que un fotoprotector sea considerado de amplio espectro, este debe tener un valor de FPS  $\geq 15$  y un valor en la longitud de onda crítica  $\geq 370$  nm, éstos no podrían ser considerados fotoprotectores de amplio espectro. Por su parte, la pseudocifelarina A (**2**) posee características idóneas de fotoprotector UVA y podría ser utilizada sinérgicamente con fotoprotectores UVB en formulaciones destinadas a proteger a la piel de la radiación UV. Dichos compuestos poseen características de permeabilidad adecuada para se entregadas en el estrato córneo de la piel, por lo cual se podrían constituir en principios activos para el desarrollo de formulaciones destinadas a la prevención de padecimientos asociados a la radiación solar, entre ellos el cáncer de piel.

## 6. Conclusiones

El estudio químico del extracto acetónico del hongo liquenizado *Everniastrum cirrhatum* condujo al aislamiento y caracterización de los compuestos: ácido salazínico (1), pseudocifelarina A (2), ácido atrárico (3), atranorina (4) y ácido úsnico (5). Los compuestos 2 y 5 son por primera vez reportados para la especie y el género.

El ácido salazínico (1), la atranorina (4) y el ácido úsnico (5) resultaron ser agentes duales con propiedades antioxidantes, cuyo mecanismo involucra la reducción de iones férricos y la inhibición de la peroxidación de lípidos primordialmente, y con propiedades fotoprotectoras UVB y UVA y características de permeabilidad adecuada para ser entregadas en el estrato córneo de la piel, constituyéndose en agentes promisorios para formularse como productos para proteger a dicho órgano frente a la radiación UV y con ello, convirtiéndose en posibles agentes preventivos de cáncer de piel.

La pseudocifelarina A (2) posee características idóneas de un fotoprotector UVA que podría ser utilizada sinérgicamente con otros fotoprotectores en formulaciones destinadas a proteger a la piel de la radiación UV.

Este trabajo constituye una contribución científica al conocimiento de las propiedades biológicas de los hongos liquenizados del páramo de Sumapaz, y de su potencialidad como fuente de agentes bioactivos.

## 7. Recomendaciones

Seguir explorando las propiedades fotoprotectoras y antioxidantes de los compuestos **1**, **4** y **5**, mediante ensayos que involucren líneas celulares y material genético sometido a estrés oxidativo por radiación UV a fin de comprobar su efecto protector sobre estos, así como evaluar la citotoxicidad de estos con miras a determinar su posible toxicidad.

Confirmar la estereoquímica del ácido úsnico, para determinar el enantiómero con las actividades biológicas evaluadas.

Realizar algunos estudios de formulación que puedan ser evaluados en estudios preclínicos *in vivo*, a fin de desarrollar estas sustancias como ingredientes activos en formulaciones destinadas a la protección solar.

Seguir estudiando la especie *Everniastrum cirrhatum*, como fuente de compuestos con actividades biológicas.

## 8. Bibliografía

- Food and Drug Administration. (2011). *Labeling and effectiveness testing; sunscreen drug products for over-the-counter human use. Final rule.*
- Rancan, F., Rosan, S., Boehm, K., Fernández, E., Hidalgo, M., Quihot, W., . . . Oltmanns, U. (2002). Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *J. Photochem Photobiol B*, 68(2-3), 133-139.
- Abreu - Dutra, E., Oliveira, A. G., Kedor - Hackman, E. R., & Rocha - Miritello, M. I. (2004). Determination of sun protection factor (SPF) sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Rev. Bras. Cienc: Farm.*
- Aguilera - Arjona, J., & Gálvez - Aranda, M. V. (2013). *INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN SOLAR EN LA PIEL HUMANA*. Recuperado el 16 de 8 de 2016, de INTERACCIÓN DE LA RADIACIÓN SOLAR EN LA PIEL HUMANA.: <http://www.clubcientificobezmiliana.org/blog/wp-content/uploads/2013/05/2-Interaccion-radiacion-piel.pdf>
- Aguirre, J. (2006). *Diversidad de los musgos (Bryophyta) y líquenes de Colombia: Una evaluación*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Biología., Bogota.
- Ahad , A. M., Goto, Y., Kiuchi, F., Tsuda, Y., Kondo, K., & Sato, T. (1991). Nematocidal Principles in "Oakmoss Absolute" and Nematocidal Activity of 2,4-Dihydroxybenzoates. *Chem. Pharm. Bull*, 49(4), 1043-1046.
- Aldana - Domínguez, J., Montes, C., Martínez , M., Medina, N., Hahn , J., & Duque , M. (2017). Biodiversity and ecosystem services knowledge in the Colombian Caribbean: progress and challenges. *Trop. Conserv. Sci*, 10, 1-11.
- André , A. (2007). *Encyclopedia of life*. Recuperado el 17 de 7 de 2019, de Encyclopedia of life: <http://www.tropicallichens.net/photopath/everniastrum-cirrhatum-taiwan.jpg>
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*, 127(1), 183-198.
- Argüello Galindo , J. (2019). *Determinación del potencial del hongo liquenizado Bunodophoron melanocarpum como fuente de compuestos duales con actividad foto-protectora y antioxidante*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Bogotá.
- Asplund, J., & Wardle, D. A. (2017). How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biological Reviews*, 92(3).
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepto)*, 161-172.
- Barreno - Rodríguez, E., & Pérez - Ortegón, S. (2003). *Liquenes\_Muniellos.pdf*. Recuperado el 2017, de Liquenes\_Muniellos.pdf: [https://www.uv.es/barreno/Liquenes\\_Muniellos.pdf](https://www.uv.es/barreno/Liquenes_Muniellos.pdf)
- Bayir, Y., Odabasoglu, F., & Cakir, A. (2006). The inhibition of gastric mucosal lesion, oxidative stress and neutrophil-infiltration in rats by the lichen constituent diffractaic acid. *Phytomedicine*, 13(8), 584-590.
- Behera, B. C., Verma, N., Sonone, A., & Makhijja, U. (2006). Determination of antioxidative potential of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *LWT - Food Science and Technology*, 30(1), 80-85.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay . *Anal Biochem*, 70-76.
- Bernal, R., Gradstein, R., & Celis, M. (2016). *Catálogo de plantas y líquenes de Colombia*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.
- Boehm, F., Clarke, K., Edge, R., Fernandez, E., Navaratnam, S., Quihot, W., . . . Truscott, T. G. (2009). Lichens – Photophysical studies of potential new sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95(1), 40-45.
- Boustie, J., & Grube, M. (2005). Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genet Resour*, 3(2), 273-287.
- Brand Williams, w., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

- Brodo, I., Duran, S., & Sharnoff, S. (2001). *Lichens of North America. En: Yale University Press.* New Haven.
- Calcott, M. J., Ackerley, D. F., Knight, A., Keyzers, R. A., & Owen, J. G. (2018). Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chem. Soc. Rev*, 47, 1730-1760.
- Castaño - Amores, C., & Hernández - Benavides, P. J. (2018). Activos antioxidantes en la formulación de productos cosméticos anti envejecimiento. *Ars Pharmaceutica*, 59(2).
- Catanedo - Càzares, J. P., Torres - Álvarez, B., Valdés - González, G., & Ehnis - Pérez, A. (2013). Evaluación in vitro de la protección UV-A de los bloqueadores solares para prescripción en México. *Gaceta Médica de México*, 292-298.
- Chaparro De Valencia, M., & Aguirre Ceballos, J. (2002). *Hongos liquenizados* (Primera ed.). Bogotá: El Malpensante S.A.
- Choy, Y. B., & Prausnitz, M. R. (2011). The Rule of Five for Non-Oral Routes of Drug Delivery: Ophthalmic, Inhalation and Transdermal. *Pharmaceutical Research*, 943-948.
- Cockell, C., & Knowland, J. (1999). Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews*, 74(3), 311-345.
- Cole, C. A., Forbes, D., & Davies, R. E. (1986). An action spectrum for UV photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol*, 275-284.
- Córdoba, C. V. (1975). *Fisiología de las sustancias liquenicas*. Madrid: Alhambra S. A.
- Cormane, J., & Rodelo, A. (2014). Epidemiología del cáncer no melanoma en Colombia. *AsoColDerma*, 20-26.
- Corrales, L. C., & María, M. A. (2012). Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias. *Nova-Publicación Científica en ciencias Biomédicas*, 10(18), 135-250.
- Cruz Jiménez, M. (2018). *Potencial de los líquenes frente a la radiación*. Tesis de grado, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE. FACULTAD DE FARMACIA.
- De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., & Plummer, M. (2012). Global Burden of Cancers Attributable to Infections in 2008: A Review and Synthetic Analysis. *The Lancet Oncology*, 13(6), 607-615.
- De Paz, G. A., Raggio, J., Gómez Serranillos, M. P., Palomino, O. M., González Burgos, E., Carretero, M. E., & Crespo, A. (2010). HPLC isolation of antioxidant constituents from *Xanthoparmelia* spp. 53(2), 165-171.
- Devkota, S., Chaudhary, R. P., Werth, S., & Scheidegger, C. (2017). Indigenous knowledge and use of lichens by the lichenophilic communities of the Nepal Himalaya. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 15.
- Díaz - Santos, M. (2008). *Estudio del potencial antioxidante de una especie selecta de líquen colombiano del género Usnea*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Diffey, B. (2009). Spectral uniformity: a new index of broad spectrum (UV-A) protection. *International Journal of Cosmetic Science*, 63-68.
- Diffey, B. L. (1994). A method for broad spectrum classification of sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science*, 47-52.
- Dunaway, S., Odin, R., Zhou, L., Ji, L., Zhang, Y., & Kadekaro, A. L. (2018). Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1-14.
- Duro - Mota, E., Campillo - Páez, M. T., & Causin - Serrano, S. (2003). El sol y los filtros solares. *Medifam*.
- Eifler - Lima, V. L., Sperry, a., Sinbandhit, S., Boustie, J., Tomasi, S., & Schenkel, E. (2000). NMR spectral data of salazinic acid isolated from some species of *Parmotrema*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 38, 472-474.
- Ertl, P., Rohde, B., & Selzer, P. (2000). Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(20), 3714-377.
- Espín, J. C., Soler Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 648-656.

- Espín, J., Soler Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *J. Agric. Food Chem*, 48(3), 648-656.
- Esposito, L. A., Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Cottrell, B., MacGregor, G. R., & Wallace, D. C. (2000). Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene. *Free Radical Biology and Medicine*, 754-766.
- Fernández - Moriano, C., Gómez - Serranillo, M. P., & Crespo, A. (2015). Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharmaceutical Biology*, 1-7.
- Fondo Colombiano de Enfermedades de alto Costo. (2017). *Cuenta de alto costo*. Obtenido de Cuenta de alto costo: <https://cuentadealtocosto.org/site/cancer/>
- Garrote, A., & Bonet, R. (2008). Fotoprotección. Factores de protección y filtros solares. *Elsevier*, 63-73.
- Ghose, A. K., & Crippen, G. M. (1987). Atomic physicochemical parameters for threedimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, 27(1), 21-35.
- Giraldo, J. C., Atehortúa, L., & Meía, M. A. (2014). Foto-proteccion: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *Dermatología CMQ*, 12(4), 272-281.
- Godic, A., Poljsak, B., Adamic, M., & Dahmane, R. (2014). The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-6.
- Gómez - Serranillo, M. P., Fernández - Moriano, C., González - Burgos, E., Divakar, P. K., & Crespo, A. (2014). Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. *RSC Adv*, 4(103), 59017-59047.
- Güvenç, A., Küpeli Akkol, E., Süntar, İ., Keleş, H., & Yıldız, S. (2012). Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(3), 726-734.
- Halliwell, B. (2012). Free radical and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5), 257-265.
- Hawksworth, D., Iturriaga, T., & Crespo, A. (2005). Lichens as rapid bioindicators of pollution and habitat disturbance in the tropics. *Revista Iberoamericana de Micología*, 22(2), 71-82.
- Hoffman, K., Kaspar, K., Altmeyer, P., & T, G. (2000). UV transmission measurements of small skin specimens with special quartz cuvettes. *Dermatology*, 307-311.
- Huneck, S. (1984). Pseudocyphellarin A and B, two fully substituted depsides from the lichen *Pseudocyphellaria endochrysea*. *Phytochemistry*, 431-434.
- Huneck, S. (1999). *The Significance of Lichens and Their Metabolites*. Naturwissenschaften.
- Huynh, B. L., Duong, T. H., Lien Do, T., Pinnock, T. G., Pratt, L. M., Yamamoto, S., . . . Nguyen, K. (2016). ORIGINAL ARTICLE The article was published by Academy of Chemistry of Globe Publications [www.acgpubs.org/RNP](http://www.acgpubs.org/RNP) Published 10/12/2015 EISSN:1307-6167 Rec. NaNewγ-Lactone Carboxylic Acids from the Lichen *Parmotrema praesorediosum* (Nyl.) Hale, Parmeliaceae. *Rec. Nat. Prod.*, 10(3), 332-340.
- Illana - Esteves, C. (2012). Lichens used in traditional medicine. *Boletín de La Sociedad Micológica de Madrid*, 36, 163-174.
- Instituto Nacional de Cáncer. (2015). *Instituto Nacional Del Cáncer NIH*. Recuperado el 21 de 6 de 2017, de Diccionario del Cáncer: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?expand=C>
- Ismed, F., Le Dévéhat, F. L., Delalande, O., Sinbandhit, S., Bakhtiar, A., & Boustie, J. (2012). Lobarin from the Sumatran lichen, *Stereocaulon halei*. *Fitoterapia*, 83(8).
- Jayaprakasha, G. K., & Rao, L. J. (2000). Phenolic Constituents From the Lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and Their Antioxidant Activity. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 55, 1018-1022.
- Katalinic, A., Kunze, U., & Schäfer, T. (2003). Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br Journal Dermatology*, 149, 1200-1206.

- Khanuja Singh, S. P., Kumar Tiruppadiripuliyur, R., Kumar Gupta, V., & Chand, P. (31 de 3 de 2005). *Patente n° US 2004/0198815 A1*.
- Konasíc, M., & Ranković, B. (2011). Lichens as possible sources of antioxidants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 165-170.
- Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T., Rančić, A., & Manojlović, N. (2014). Cladonia lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT - Food Science and Technology*, 59(1), 518-525.
- Kranner, I., Cram, J. W., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheiner, E., & Pfeifhofer, H. W. (2005). Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 3141-3146.
- Kumar, V., Naik, B., Kumar, V., Kumar, S., Kumar, D., & Aslam, M. (2014). Evaluation of Antibacterial and Anti-oxidant Activity of Some Lichens of Uttarakhand. *American Journal of Current Biology*, 1(1).
- Lang, P. (2006). Carcinoma basocelular. *Cancer de Piel. Elsevier*, 101-132.
- Lara - Carrio, A. (2015). *APLICACIONES DE LOS LÍQUENES PARA EL SER HUMANO*. Madrid, España.
- Le Dévéha, F. L., Legouin, B., Couteau, C., Boustie, J., & Coiffard, L. (2013). Lichenic extracts and metabolites as UV filters. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 120(5), 17-28.
- Leal, a., Rojas, J. L., Valencia Islas, N. A., & Castellanos, L. (2018). New  $\beta$ -orcinol depsides from *Hypotrachyna caraccensis*, a lichen from the páramo ecosystem and their free radical scavenging activity. *Natural Product Research*, 32(12), 1375-1382.
- Lima - Gerlanch, A., Gumboski, E. L., & Eliasaro, S. (2013). First record of the genus *Everniastrum* Sipman (Parmeliaceae, lichenized Ascomycota) for the state of Paraná, Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 851-853.
- Lobos B, P., & Lobos S, A. (2011). NON-MELANOMA SKINCANCER. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 22(6), 737-748.
- Lohèzic Le Dèvehat, F., Legouin, B., Couteau, C., Boustie, J., & Coiffard, L. (2013). Lichenic extracts and metabolites as UV filters. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 17-28.
- Loizzo, M. R., Lucci, P., Núñez, O., Tundis, R., Balzano, M., Frega, N. G., . . . Pacetti, D. (2019). Native colombia Fruits and their by Products: Phenolic Profile, antioxidant Activity and Hypoglycaemic potetial. *Foods*, 8(3).
- Lomas, A., Leonardi-Bee, J., & Bath-Hextall, F. (2012). A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Journal of Dermatology*, 166(5), 1069-1080.
- Lozano, J. A. (2004). Melanoma. Detección y tratamiento de un tumor de gran incidencia. *ELSEVIER*, 23(6), 86-92.
- Lücking, R., Rivas Plata, E., Chaves, J. L., Umaña, L., & Sipman, H. (2009b). How many tropical lichens are there... really? *Biblioth Lichenol*, 399-418.
- Lücking, R., Moncada, B., Martínez Habibe, M. C., Salgado Negret, B. E., Celis, M., Rojas Zamora, O., . . . Borsch, T. (2019). Lichen diversity in Colombian Caribbean dry forest remnants. *Caldasia*, 41(1).
- Luo, H., Yamamoto, Y., Kim, J. A., Sung Jung, J., Koh, Y. J., & Hur, J. S. (2009). Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island). *Polar Biology*, 32(7), 1033-1040.
- Lüttge, U., Beyschlag, W., Büdel, B., & Francis, D. (2012). *Progress in Botany* 73. London: Springer Heidelberg.
- Manojlovic, N., Rankovic, B., Kosanic, M., Vasiljevic, P., & Stanjkovic, T. (2012). Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*, 1166-1172.
- Mansur, J. S., Rodriues Breder, M. N., D Ascencao Mansur, M. C., & Azulay, R. D. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An Bras Dermatol*, 121-124.

- Maza Ramos, G., Sáez De Ocariz, M., Orozco Covarrubias, L., Durán McKinster, C., Palacios López, C., & Ruiz Maldonado, R. (2015). Fotoprotección y vitamina D en. *Dermatol Rev Mex*, 517-525.
- Mejia - Giraldo, J. C., Ate - Hortua, L., & Puertas - Mejia, M. A. (2014). Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *DCMQ*, 12(4).
- Melo, M. G., Dos Santos, J. P., Serafini, M. R., Caregnato, F. F., De Bittencourt, P., Rabelo, M. A., & Gelain, D. P. (2011). Redox Properties and Cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicology in Vitro*, 25(2), 462-468.
- Meruane, M., & Rojas, M. (2012). Skin and Appendages Development in vertebrates. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1422-1433.
- Mesa Vanegas, A. M., Zapata Uribe, S., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalbe, Z., & Rojano, B. (2015). Antioxidant activity of different polary extracts from *Ageratum conyzoides* L. *Blacpma*, 1-10.
- Miller, N. J., & Rice Evans, C. A. (1996). Spectrophotometric determination of antioxidant activity. *Redox Report*, 161-171.
- Millot, M., Di Meo, F., Tomasi, S., Boustie, J., & Trouillas, P. (2012). Photoprotective capacities of lichen metabolites: A joint theoretical and experimental study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 111(4), 17-26.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (2014). *Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible*. Recuperado el 27 de 08 de 2019, de Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible: <http://www.minambiente.gov.co/index.php/normativa/10-asuntos-ambientales-y-sectorial-y-urbana/asuntos-ambientales-y-sectorial-y-urbana-articulos/687-plantilla-asuntos-ambientales-y-sectorial-y-urbana-sin-galeria-62>
- Mishra, A., Mishra, A., & Chattopadhyay, P. (2011). Herbal Cosmeceuticals for Photoprotection from Ultraviolet B Radiation: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3).
- Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Nikolić, M., Tošić, S., & Stojičić, D. (2011). Lichens as source of versatile bioactive compounds. *Biologica Nyssana*, 2(1), 1-6.
- Müller, K. (Julio de 2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1-2), 9-16.
- Nash, T. H. (2008). *Lichen Biology* (Second ed.). (C. U. Press, Ed.)
- Nasser, J. A., Yaacob, W. A., Din, L. B., Yamin, B. M., & Latip, J. (2009). ISOLATION OF ATRANORIN, BERGENIN AND GONIOTHALAMIN FROM HOPEA SANGAL. *ARPN Journal of Engineering and Applied Science*, 4(1), 92-95.
- Nguyen, K. H., Chollet Krugler, M., Gouault, N., & Tomasi, S. (2013). UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Nat Prod Rep*, 30(12).
- Nishigori, C., Hattori, Y., & Toyokuni, S. (2004). Role of Reactive Oxygen Species in Skin Carcinogenesis. *Forum Reviews*, 6(3).
- Orange, A., James, P. W., & White, F. J. (2001). *Microchemical Methods For The Identification of Lichens*. British Lichen Society.
- Ospina - Pérez, M., & Muñeton - Peña, C. M. (2011). Alteraciones del gen c-Myc en la oncogénesis. *Iatreia*, 24(4).
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn.J.Nutr.Diet.*, 44(6), 307-315.
- Palm, M. D., & O'Donoghue, M. N. (2007). Update on photoprotection. *Dermatologic Therapy*.
- Pardo, C., & Cendales, R. (2015). incidencia, mortalidad y prevalencia de cáncer en Colombia, 2007 - 2011. *Instituto nacional de cancerología. Bogotá*.
- Perico - Franco, L. S., Rojas, J. L., Cerbón, M. A., Gonzáles - Sánchez, I., & Valencia - Islas, N. A. (2015a). Antioxidant Activity and Protective Effect on Cell and DNA Oxidative Damage of Substances isolated from Lichens of Colombian páramo. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 3(4), 9-17.
- Perico - Franco, L., Soriano - García, M., Cerbon, M. A., González - Sánchez, I., & Valencia - Islas, N. A. (2015b). Secondary metabolites and cytotoxic potential of *Lobariella pallida* and *Stereocaulon strictum* var . *compressum* , two lichens from Colombian páramo region. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, 3(4), 31-38.

- Perico Franco, L. S. (2011). *Antioxidantes de los líquenes Stereocaulon strictum (Stereocaulaceae) y Lobariella pallida (Lobariaceae) y determinación de su potencial citotoxicidad*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Pinto - Zárate, J., & Rangel - Churio, J. (2012). Colombian páramo vegetation database (CPVD)-the database on high Andean páramo vegetation in Colombia. *Biodiversity & Ecology*, 4, 275-286.
- Pol, C. S., Savale, S. A., Khare, R., Verma, N., & Behera, B. C. (2017). Antioxidative, Cardioprotective, and Anticancer Potential of Two Lichenized Fungi, Everniastrum cirrhatum and Parmotrema reticulatum, from Western Ghats of India. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 23(2), 142-156.
- Pouillot, A., Polla, L., Tacchini, P., Neequaye, A., Polla, A., & Polla, B. (2011). Natural antioxidants and their effects on the skin. En J. W. Sons (Ed.), *Formulating Packaging and Marketing of Natural Cosmetic Products* (Firs ed.).
- Pozzobon, F. C., Acosta, A. E., & Castillo, J. S. (2018). Cáncer de piel en Colombia: cifras del Instituto Nacional de Cancerología. *Rev Asoc Colomb Dermatol*, 26(1), 12-17.
- Prashith Kekuda, T. R., Vinayaka, K. S., Swathi, D., Suchitha, Y., Venugopal, T. M., & Mallikarjun, N. (2011). Mineral Composition, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of a Macrolichen Everniastrum cirrhatum (Fr.) Hale (Parmeliaceae). *E - Journal of Chemistry*, 8(4), 1886 - 1894.
- Prashith Kekuda, T. R., Vinayaka, K., Praveen Kumar, S. V., & Sudharshan, S. J. (2009). Antioxidant and antibacterial activity of lichen extracts, honey and their combination. *Journal of Pharmacy Research*, 2(12), 1875-1878.
- Raggio, J., Pintado, A., Ascaso, C., De la Torre, R., De los Rios, A., Wierzchos, J., & Sancho, L. (2010). Whole lichen thalli survive exposure to apscce condition: result of Lithopanspermia experimet with *Aspicilia fruticulosa*. *Astrobiology*, 281-292.
- Rai, R., Shanmuga, S. C., & Srinivas, C. (2012). Update on Photoprotection. *Indian Journal of Dematology*, 57(5), 335-342.
- Ranković, B. (2015). *Lichen Secondary Metabolites. Bioactive Properties and Pharmaceutical*. Springer.
- Rincón - Espitia, A., Aguirre C, J., & Lücking, R. (2011). LÍQUENES CORTICÍCOLAS EN EL CARIBE COLOMBIANO. *Caldasia*, 331-347.
- Rodríguez - Perón, J. M., Méndez - López, J. R., & Trujillo - López, Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cub Med Mil*, 30(1).
- Rogers, H. W., Weinstock, M. A., Harris, A. R., Hinckle, M. R., Feldman, S. R., Fleischer, A. B., & Coldiron, B. M. (2010). Incidence Estimate of Nonmelanoma Skin Cancer. *Archives of Dermatology*, 283-387.
- Rojas, J. L., Diaz Santos, M., & Valencia Islas, N. A. (2015). Metabolites with antioxidant and photoprotective properties from *Usnea rocellina* Motyka, a lichen from Colombia Andes. 3(4).
- Rubio M, A., Rojas O, I., & Noguez M, N. A. (2009). Determination of pKa and partition coefficient of 4,4'-diaminodifhenylufone with solubility data. *Redalyc.Org*.
- Saewam, N., & Jimtaisong, A. (2013). Photoprotection of natural flavonoids. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(9), 129-141.
- Saewan, N., & Jimtaisong, A. (2015). Natural Products as Photoprotection. *J Cosmet Dermatol*, 47-63.
- Sambandan, D. R., & Ratner, D. (2011). Sunscreens: An overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 748-758.
- Sánchez - Lira, N., Morales - Miranda, A., García de la Mora, G., León - Contreras, J. C., González - Sánchez, I., Valencia - Islas, N., & Morimoto, S. (2017). Orcinol derivative compound with antioxidant properties protects Langerhans islets against streptozotocin damage. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(3), 305-313.
- Sánchez, G., Nova, J., De la Hoz, F., & Castañeda, C. (2011). Incidence of skin cancer in Colombia from 2003-2007. *Piel*, 26(4), 171-177.
- Santos Nunes, P., Silva Rabelo, A., & Campos de Souza, J. C. (2016). Gelatin-based membrane containing usnic acid-loaded liposome improves dermal burn healing in a porcine model. *International Journal of Pharmaceutics*, 473-482.

- Sayre, R. M., Poh Agin, P., Levee, G. J., & Marlowe, E. (1979). A comparison of In vivo and In vitro testing of sunscreens. *Phytochemistry*, 29, 559-566.
- Shah, N. C. (2014). Lichens of Commercial Importance in India. *The Scitech Journal*, 1(2), 32 - 36.
- Shahidi, F. W. (1992). Phenolic antioxidants. *Crit. Rev Food Sci Nutr*, 67-103.
- Shukla, V., Patel, D., Bajpai, R., Semwal, M., & Upreti, D. (2016). Ecological implication of variation in the secondary metabolites in Parmelioid lichens with respect to altitude. *Environ Sci Pollut Res Int*, 23(2), 1391-1397.
- Silverman, R. B., & Holladay, M. W. (2014). Chapter 9 - Prodrugs and Drug Delivery systems. En *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action* (págs. 423-468). Academic Press.
- Sipman, H. J. (1980). *Studies on Colombian Cryptogams. The genus Everniastrum Hale and related taxa (Lichenes)*. Institute of Systematic Botany, University of Utrecht, 3584 CS Utrecht, the Netherlands.
- Sipman, H. J., & Aguirre C, J. (1982). Contribucion al conocimiento de los liquenes de Colombia - I clave generica para los liquenes foliosos y fruticosos de los paramos colombianos. *Caldasia*, 13(64), 604-634.
- Sipman, H., Hekking, W., & Aguirre, C. J. (2008). Checklist of lichenized and lichenicolous fungi from Colombia. *Bibli José Jerónimo Triana*, 242.
- Snezana, A. J., & Bojan, Z. S. (2014). Chapter Fourteen- Cadmium Effect on The Thyroid Gland. *Vitamins & Hormones*, 391-425.
- Solano, F. (2020). Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources. *Molecules*, 25(7), 1537.
- Sordo, C., & Gutierrez, C. (2013). Cáncer de piel y radiación solar: experiencia peruana en la prevención y detección temprano del cáncer de piel y melanoma. *SciELO*, 113-117.
- Spribile, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M. C., . . . McCutcheon, J. P. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 488-492.
- Springsteen, A., Yurek, R., Frazier, M., & Carr, K. F. (1999). In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Analytica Chimica Acta*, 155-164.
- Suja, K. P., Jayalekshmy, A., & Arumughan, C. (2004). Free Radical Scavenging Behavior of Antioxidant Compounds of Sesame (Sesamum indicum L.) in DPPH\*. *System. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4).
- Thadhani, V. M., Choudhary, M. I., Ali, S., Omar, I., Siddique, H., & Karunaratne, V. (2011). Antioxidant activity of some lichen metabolites. *Natural Product Research*, 25(19), 1827-1837.
- Tomovic, J., Kosanic, M., Rankovic, B., Vasiljevic, P., Najman, S., & Manojlovic, N. (2019). Phitochemical analysis and biological activity of extracts of lichen *Physcia semipinnata*: as a new source of pharmacologically active compounds. *Farmacia*, 67(2), 346-353.
- Torres, A., Hochberg, M., Pergament, I., Smoum, R., Niddam, V., Dembitsky, V. M., . . . Enk, C. D. (2004). A new UV-B absorbing mycosporine with photo protective activity from the lichenized ascomycete *Collema cristatum*. *European Journal of Biochemistry*, 271(4), 780-784.
- Touitou, E., & Godin, B. (2008). Skin nonpenetrating sunscreens for cosmetic and pharmaceutical formulations. *Clinical Dermatology*, 375-379.
- Ulrich, M., Stockfleth, E., Roewert Humber, J., & Astner, S. (2007). Noninvasive diagnostic tools for nonmelanoma skin cancer. *Journal of Dermatology*, 56-58.
- Upreti, D. K., Divakar, P. K., Shukla, V., & Rajesh, B. (2015). *Recent advances in Lichenology*. Springer.
- Valencia - Islas, N., Zambrano, A., & Rojas, J. L. (2007). Ozone reactivity and free radical scavenging behavior of phenolic secondary metabolites in lichens exposed to chronic oxidant air pollution from Mexico City. *Journal of Chemical Ecology*, 33(8), 1619-1634.
- Varol, M., Türk, A., Candan, M., Tay, T., & Tansu Koparal, A. (2015). Photoprotective Activity of Vulpinic and Gyrophoric Acids Toward Ultraviolet B-Induced Damage in Human Keratinocytes. *Phytotherapy Research*, 30(1), 9-15.
- Venero - Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2).

- Walser, J., Holderegger, R., & Gugerli, F. (2005). Microsatellites reveal regional population differentiation and isolation in *Lobaria pulmonaria*, an epiphytic lichen. *Molecular Ecology*, *14*, 457-467.
- White, P. A., Oliveira, R. C., Oliveira, A. P., Serafini, M. R., Araújo, A. A., Gelain, D. P., . . . Santos, M. R. (2014). Antioxidant Activity and Mechanisms of Action of Natural Compounds Isolated from Lichens: A Systematic Review. *Molecules*, *19*(9), 14496-14527.
- Winsiow, T. (2008). *The Oncology Institute of Hope and Innovation. All rights reserved*. Obtenido de The Oncology Institute of Hope and Innovation. All rights reserved All rights reserved: The Oncology Institute of Hope and Innovation. All rights reserved
- Wolfgang, E., Nihat, K., & Andreas, B. (2011). Advanced methods for the study of the chemistry and the metabolism of lichens. *Phytochem Rev*, *10*, 445-456.
- Wong, T., & Orton, D. (2011). Sunscreen allergy and its investigation. *Clin. Dermatology*, 306-316.
- Woranovicz - Barreira, S. M., Gorin, A. J., Lanzi - Sassaki, P., Pinto - Marcelli, M., & Iacomini, M. (1999). Galactomannoglucans of lichenized fungi of *Cladonia* spp.: *FEMS Microbiology Letters*, 313-317.
- World Health Organization International Agency For Research On Cancer. (1992). Solar and Ultraviolet Radiation. En *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Vol. 55, pág. 880).
- Wulf, H. C., Möller, J. S., Kobayasi, T., & Gniadecki, R. (2004). Skin aging and natural photoprotection. *Micron*, *35*(3), 185-197.
- Yanez - Ayabaca, A. A. (2009). Os generos *Hypotrachyna* e *Everniastrum* (Parmeliaceae, Ascomycota liquenizados) nas províncias de Carchi e Imbabura na região Andina do Equador. *Biology*.
- Zaw, K. K., Yokoyama, Y., Abe, M., & Ishikawa, O. (2006). Catalase restores the altered mRNA expression of collagen and matrix metalloproteinases by dermal fibroblasts exposed to reactive oxygen species. *European Journal of Dermatology*, *16*(4), 375-379.
- Zhao, L., Kim, J. C., Paik, M. J., Lee, W., & Hur, J. S. (2017). A Multifunctional and Possible Skin UV Protectant, (3R)-5-Hydroxymellein, Produced by an Endolichenic Fungus Isolated from *Parmotrema austrosinense*. *Molecules*, *22*(1).
- Zorrilla - García, A. E., Izquierdo - Eirez, M., & Izquierdo - Expósito, M. (2004). Papel de los radicales libres sobre el ADN: carcinogénesis y terapia antioxidante. *Rev Cubana Invest Bioméd*, *23*(1).

## 9.Anexo: Espectros de los liquenoquímicos aislados del *Everniastrum cirrhatum*

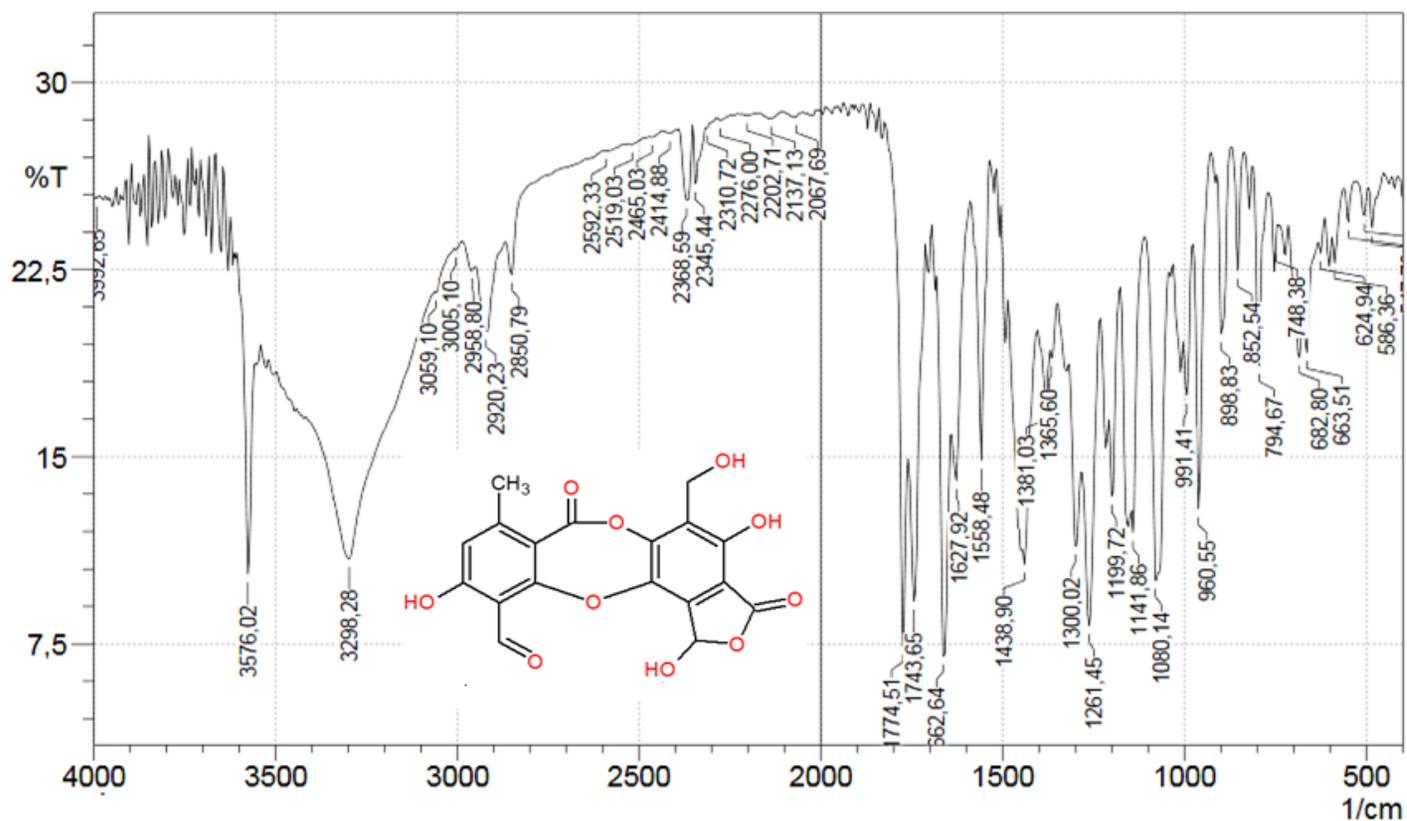


Figura 9 - 1. Espectro de infrarrojo (KBr) ácido salazínico (1)

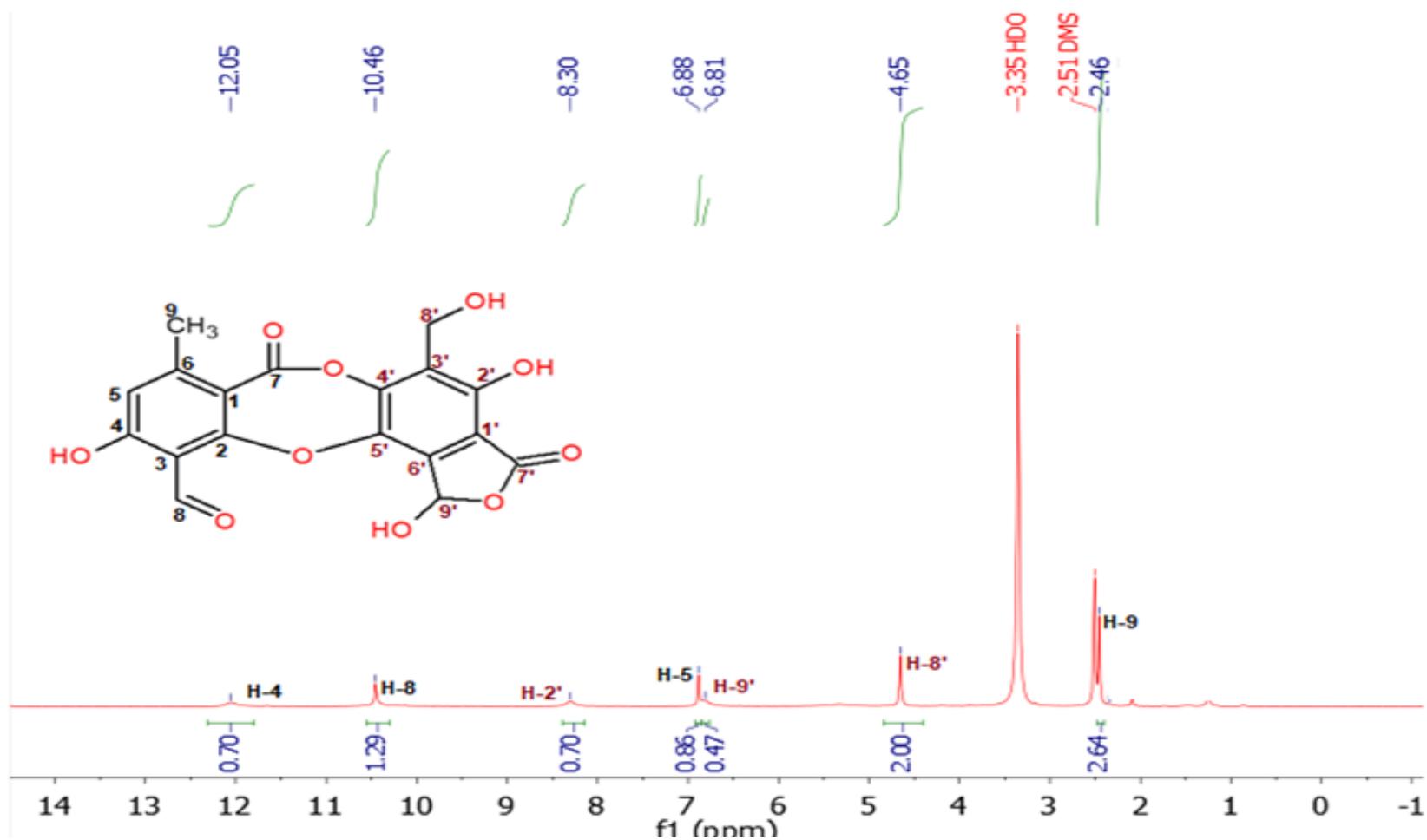


Figura 9 - 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO d<sub>6</sub>) del ácido salazínico (1).

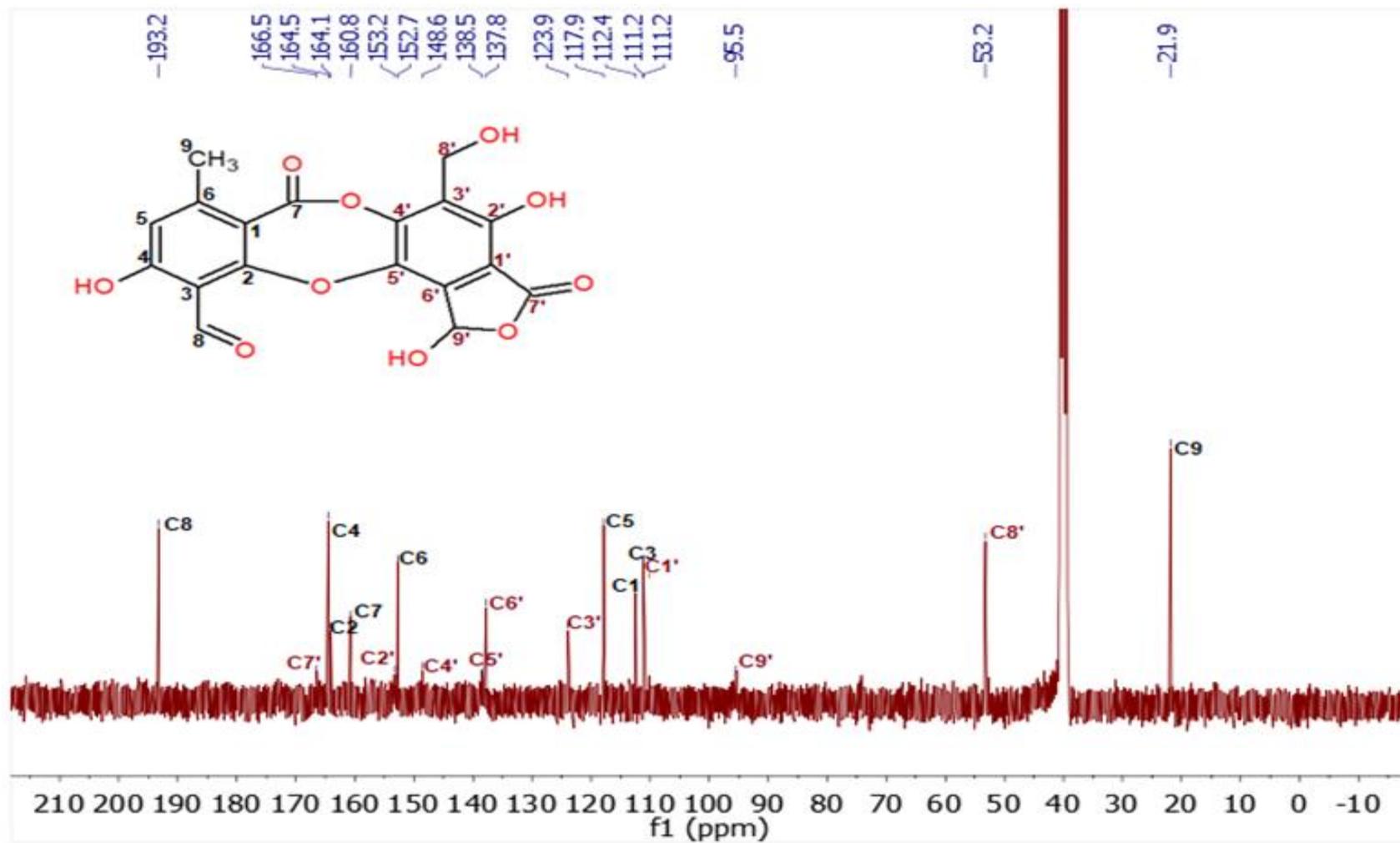


Figura 9 - 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{DMSO } d_6$ ) del ácido salazínico (1).

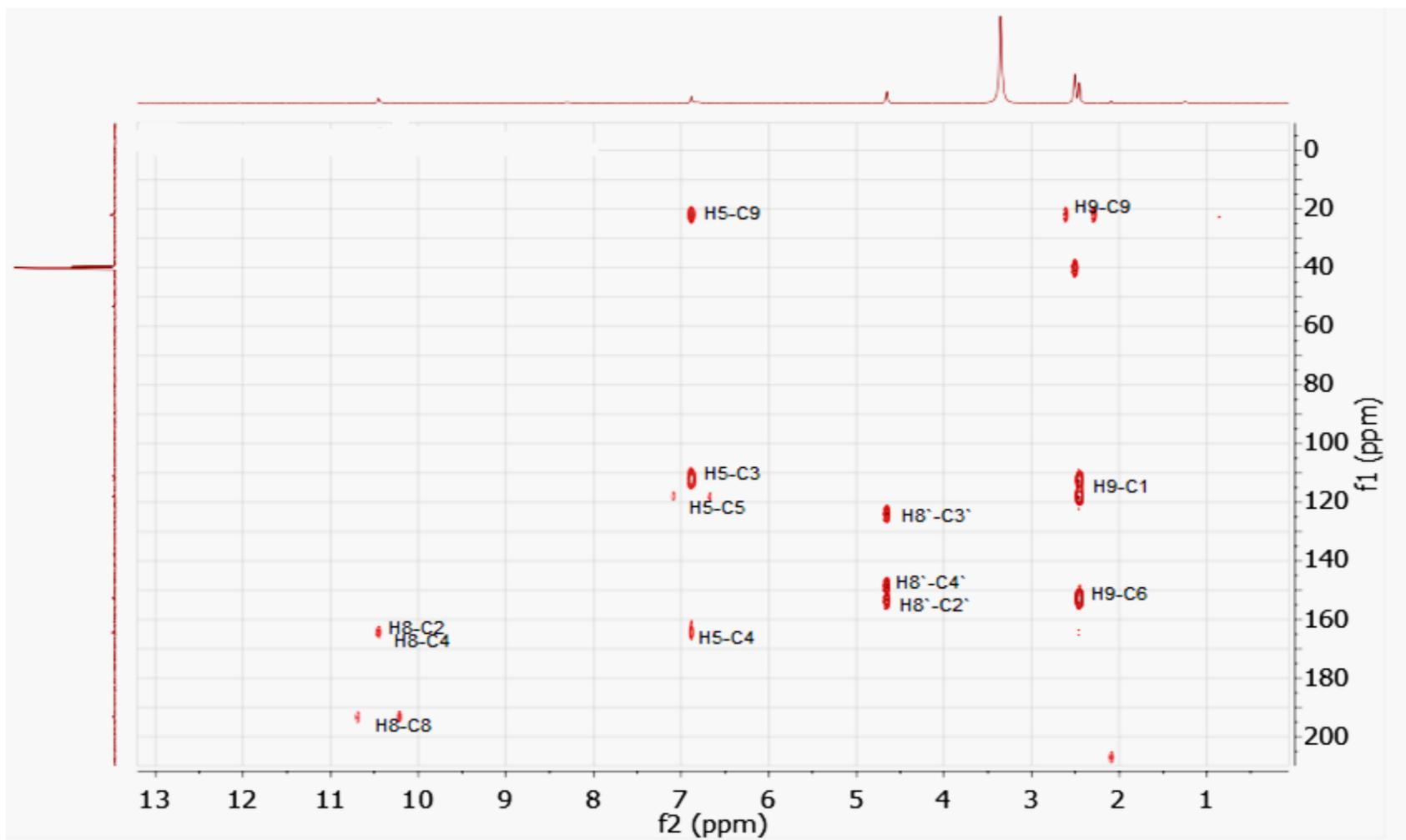


Figura 9 - 4. Espectro HMBC (<sup>1</sup>H a 400 MHz y <sup>13</sup>C a 101 MHz DMSO d<sub>6</sub>) del ácido salazínico (1).

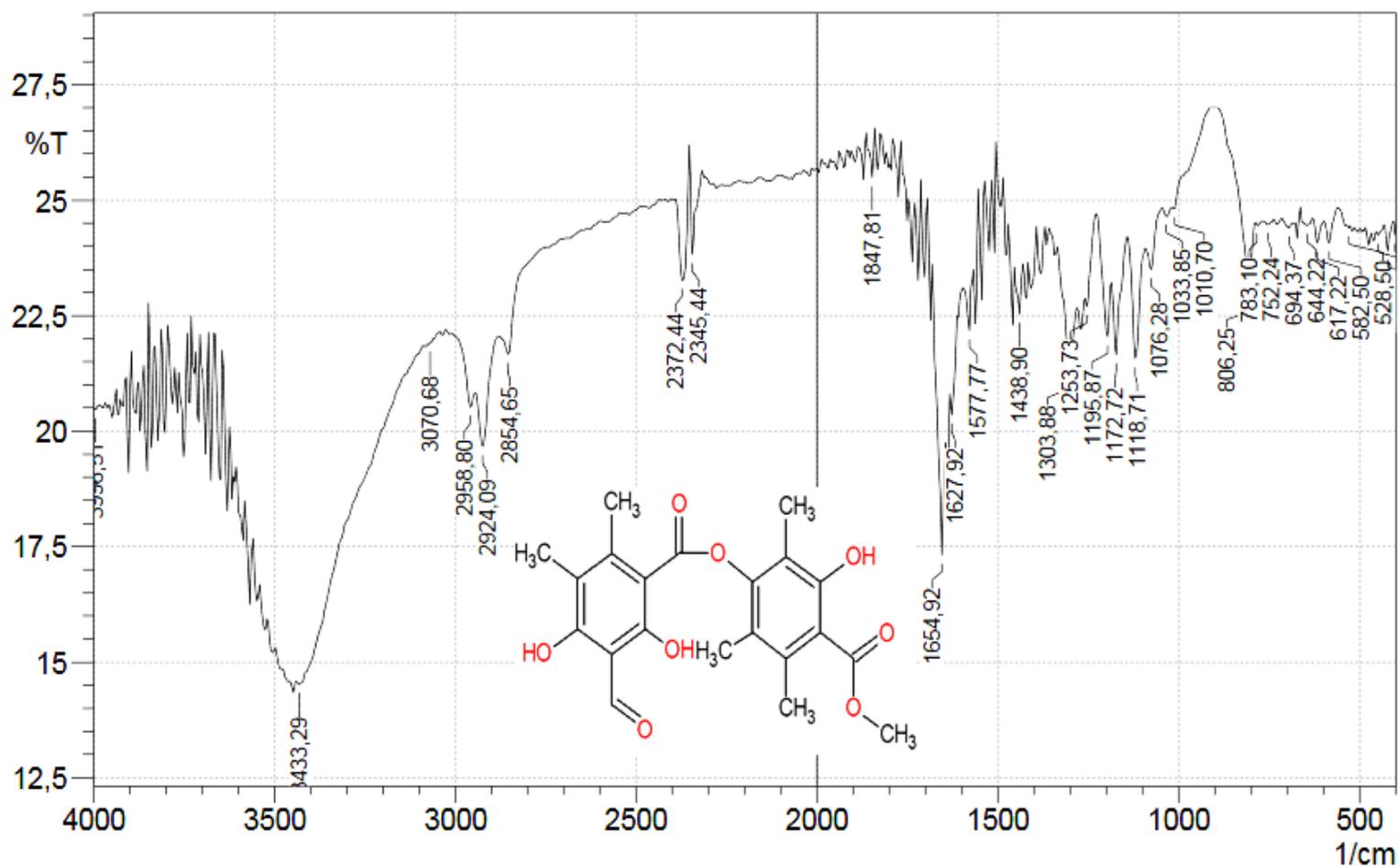


Figura 9 - 5. Espectro de infrarrojo (KBr) de pseudocifelarina A (2).

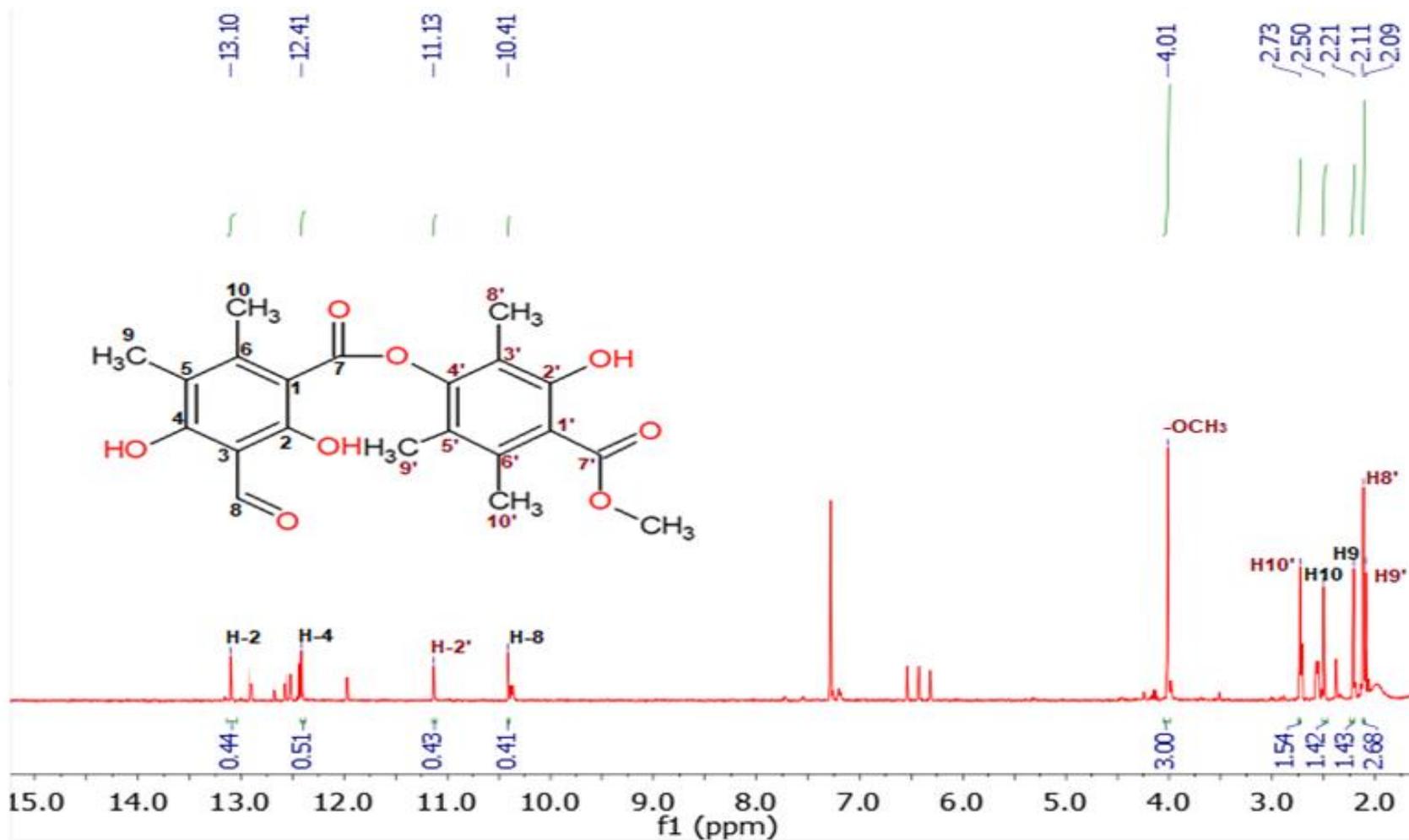


Figura 9 - 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (400 MHz, CHCl<sub>3</sub>) de la pseudocifelarina A (2).

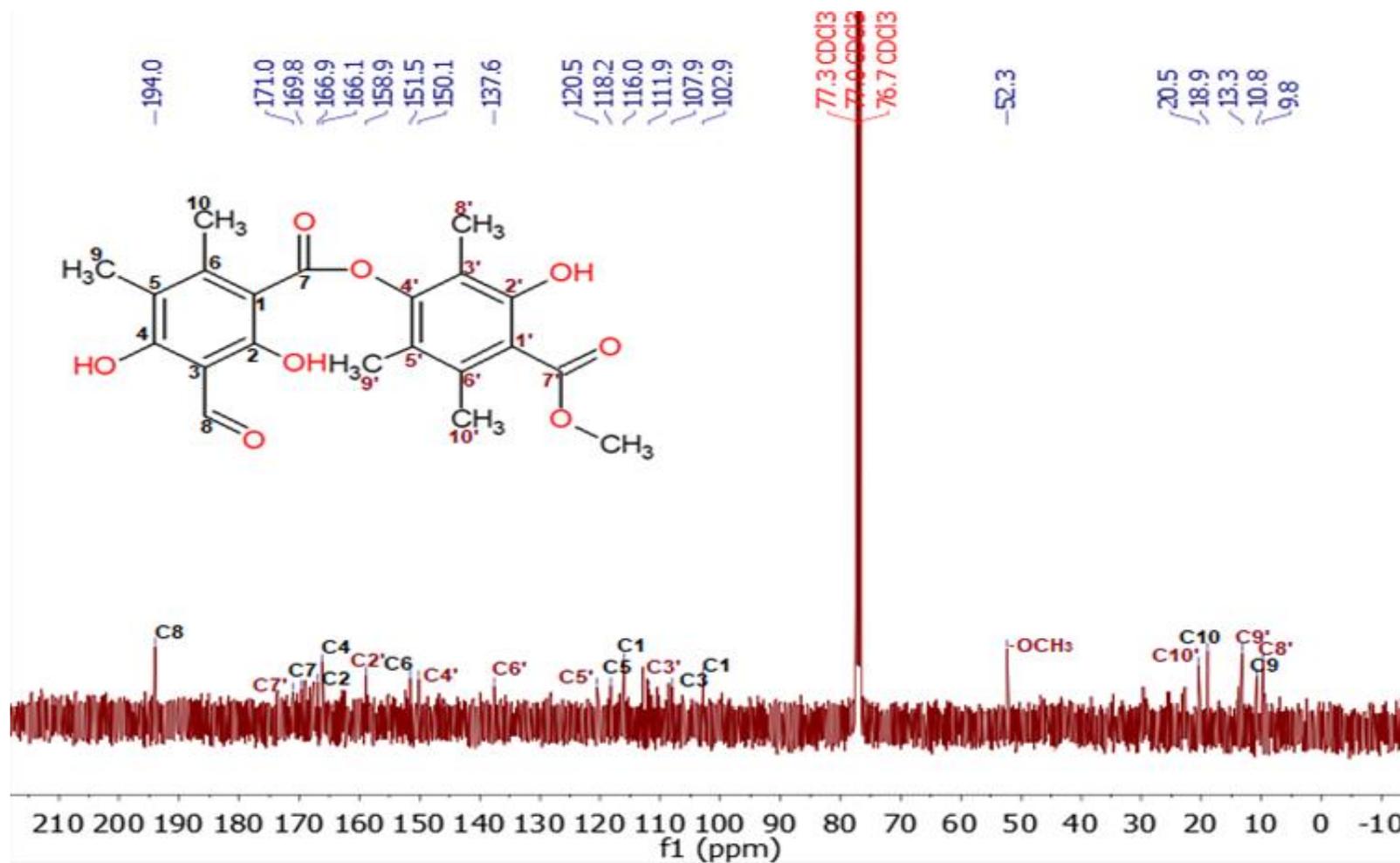
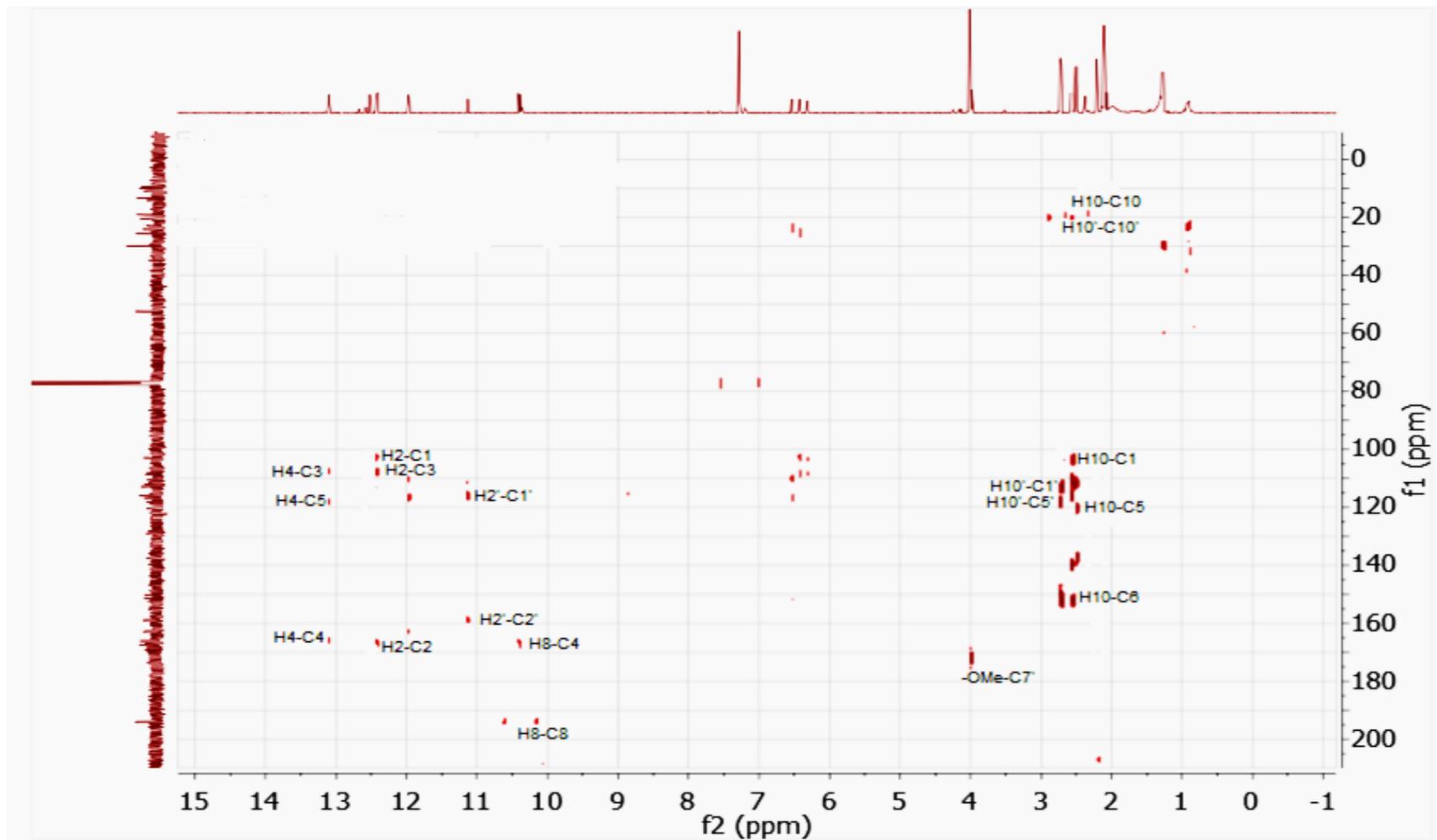
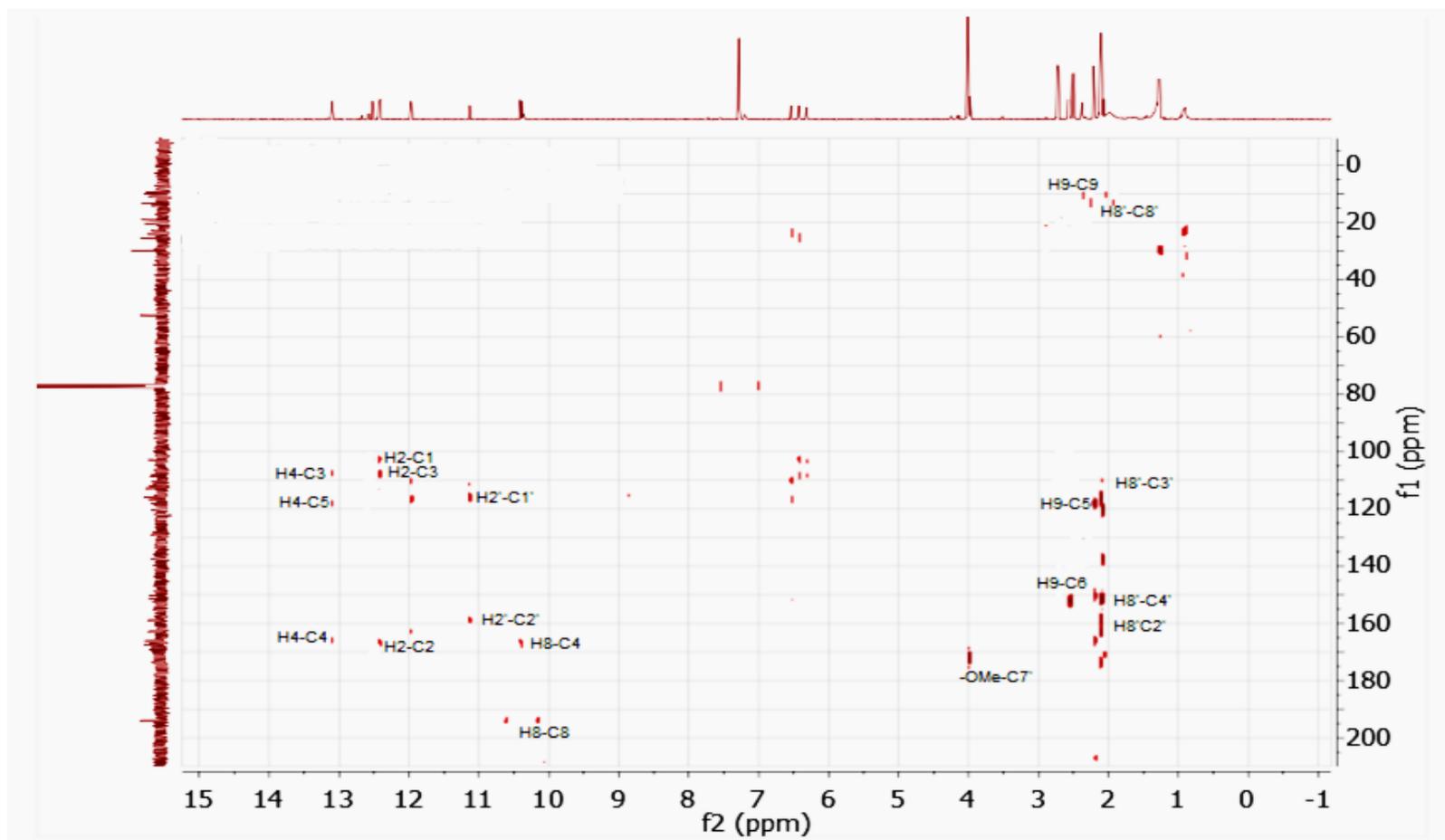


Figura 9 - 7. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) de la pseudocifelarina A (2)



**Figura 9 - 8.** Espectro HMBC ( $^1\text{H}$  a 400 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 101 MHz  $\text{CDCl}_3 d_6$ ) de la pseudocifelarina A (2), para los hidrógenos (H-10 y H-10')



**Figura 9 - 9.** Espectro HMBC ( $^1\text{H}$  a 400 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 101 MHz  $\text{CDCl}_3$   $d_6$ ) de la pseudocifelarina A (**2**), para las correlaciones de los hidrógenos ( $\text{H-4}$ ,  $\text{H-2}$ ,  $\text{H-2'}$ ,  $\text{H-9}$  y  $\text{H-8'}$ ).

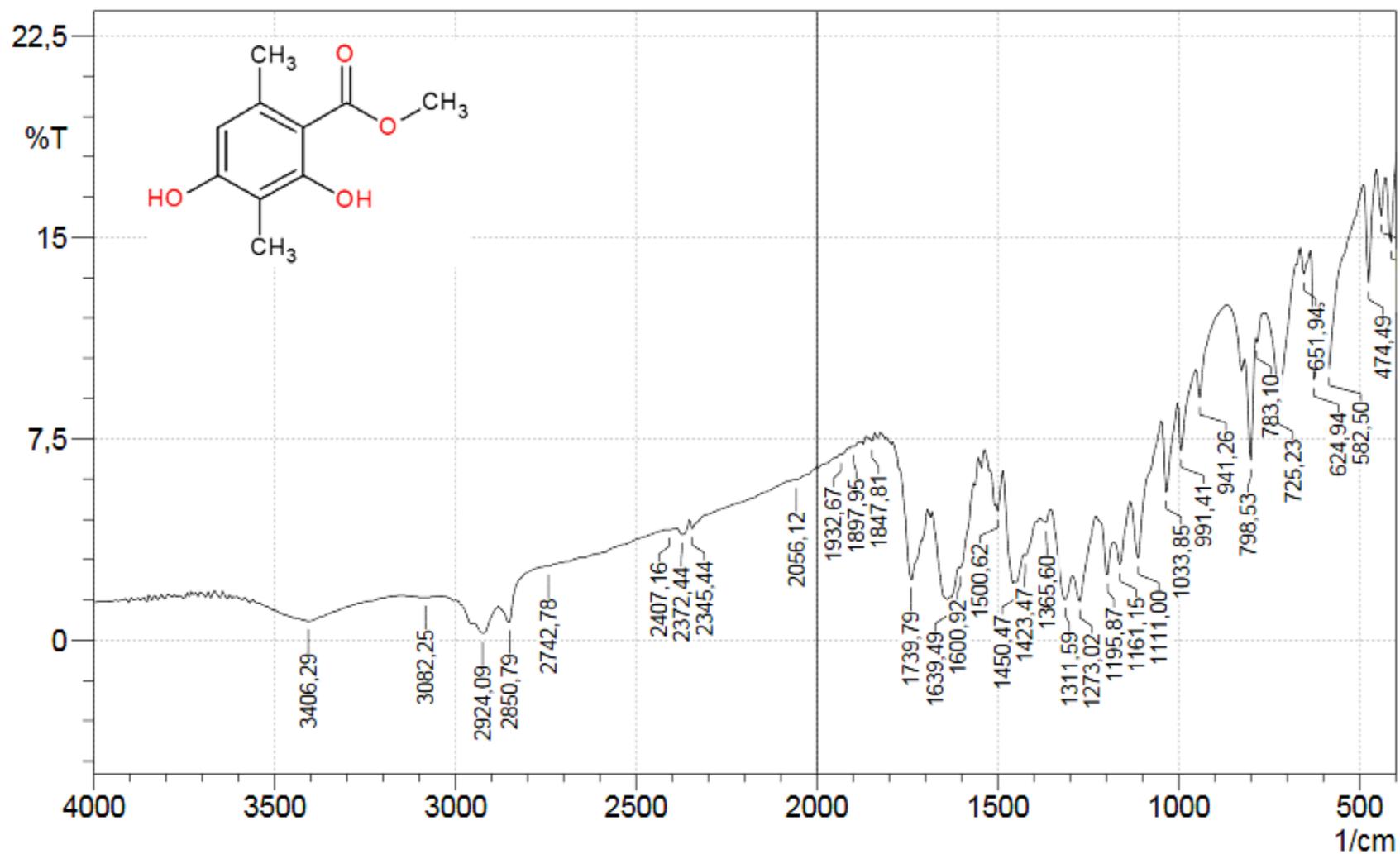


Figura 9 - 10 Espectro de infrarrojo (KBr) de ácido atrárico (3).

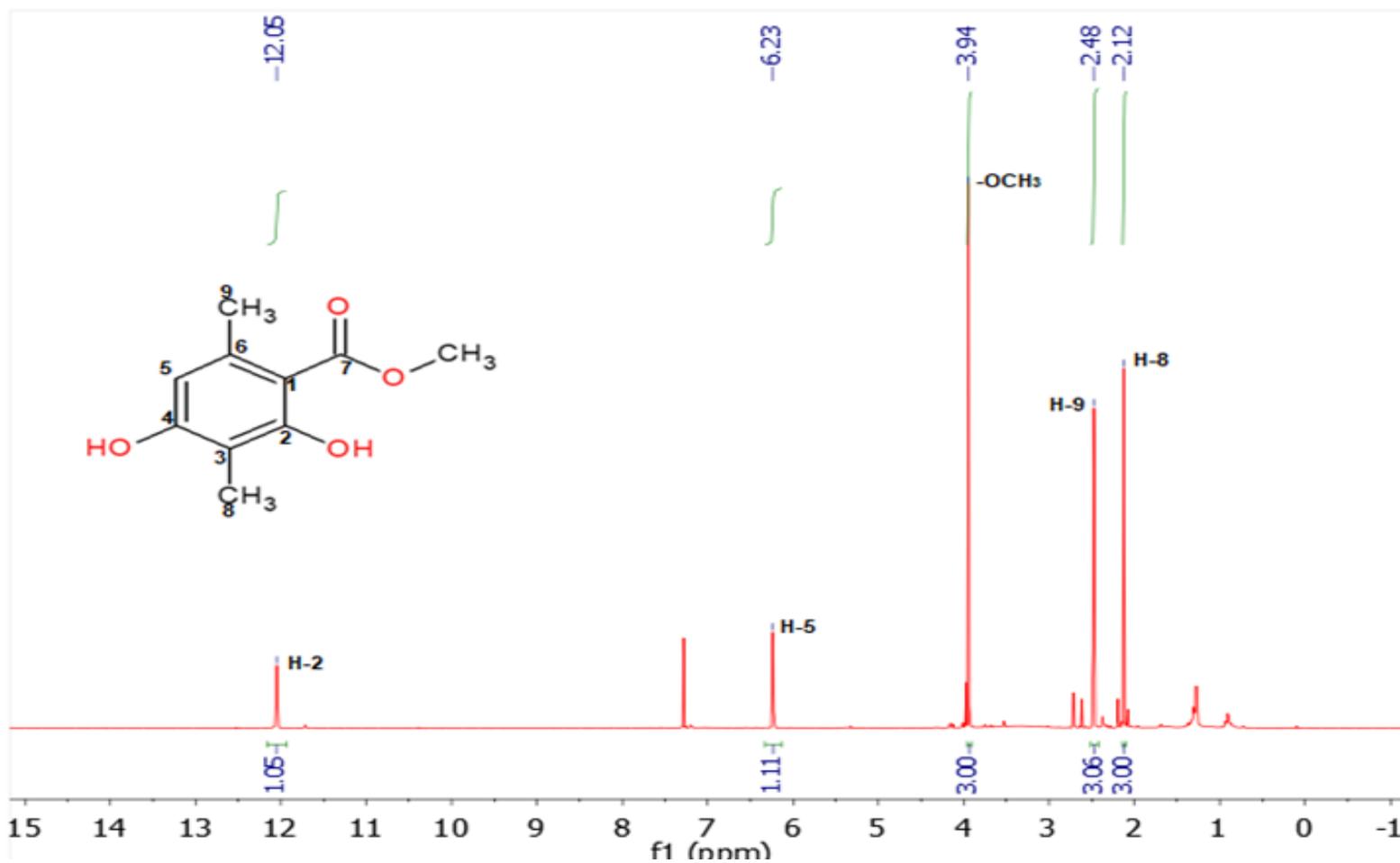


Figura 9 - 11. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) del ácido atrárico (3).

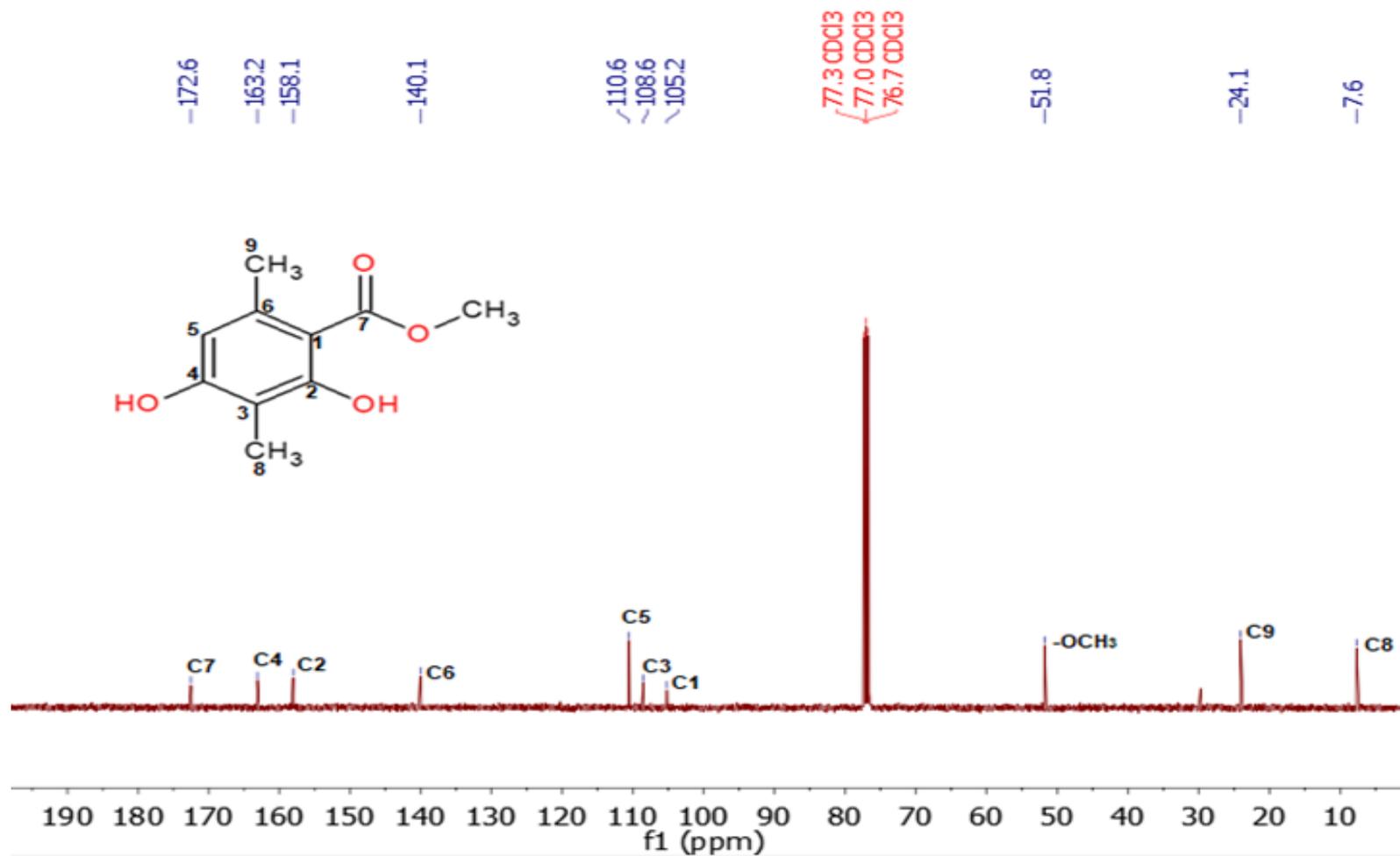


Figura 9 - 12. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) del ácido atrárico (3).

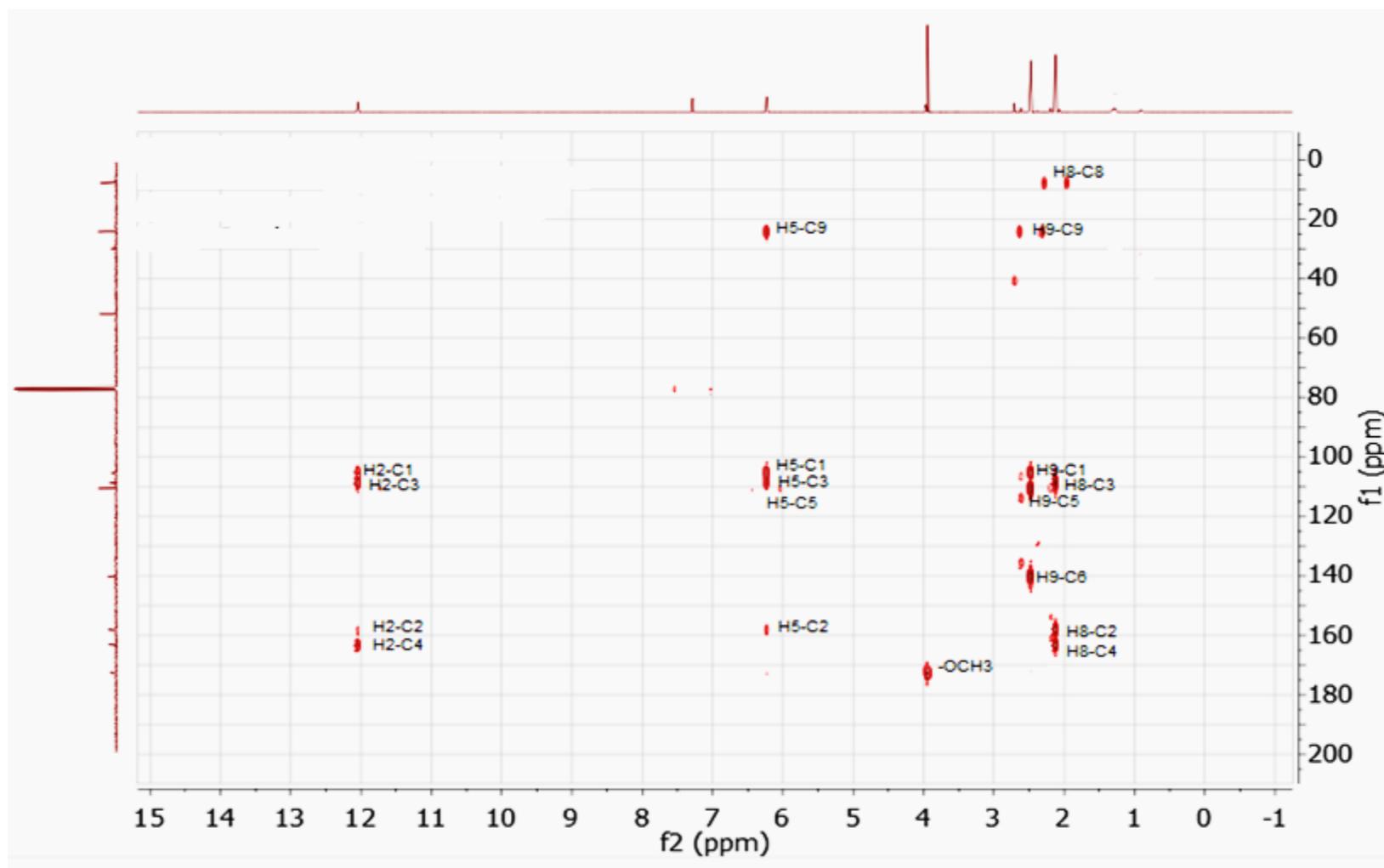


Figura 9 - 13. Espectro HMBC ( $^1\text{H}$  a 400 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 101 MHz  $\text{CDCl}_3$   $d_6$ ) del ácido atrárico (3).

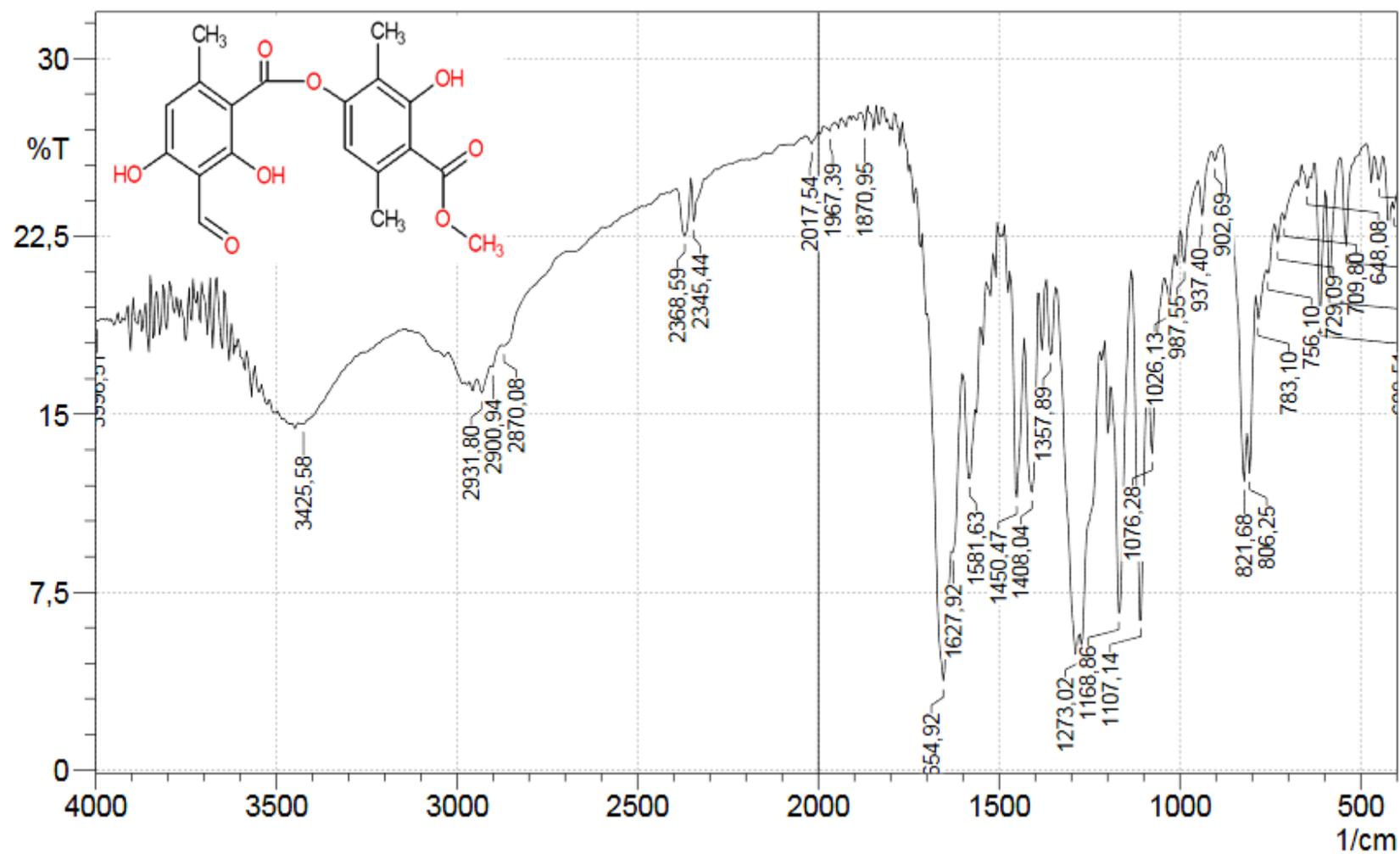


Figura 9 - 14 Espectro de infrarrojo (KBr) de atranorina (4).

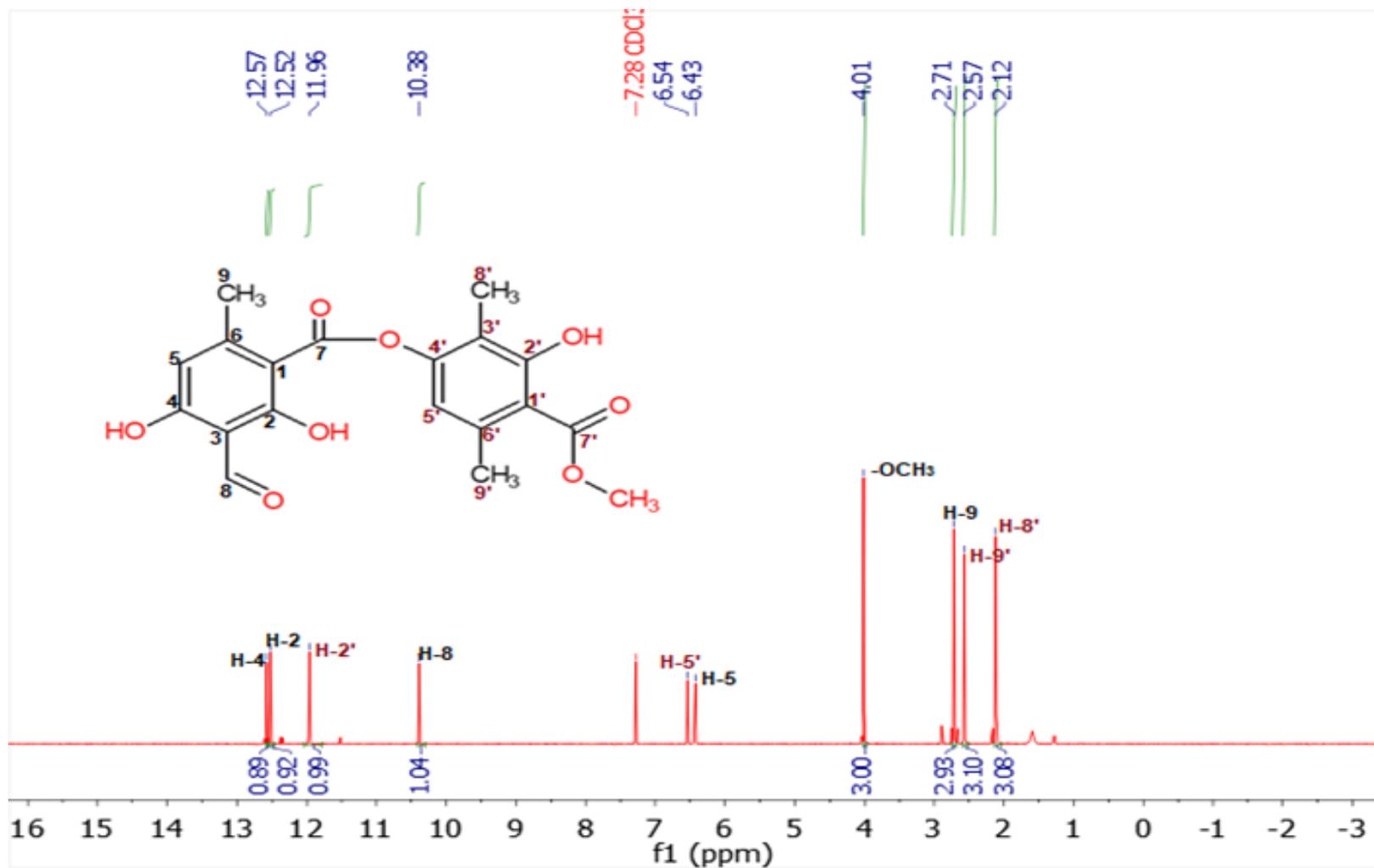


Figura 9 - 15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) de la atranorina (4).

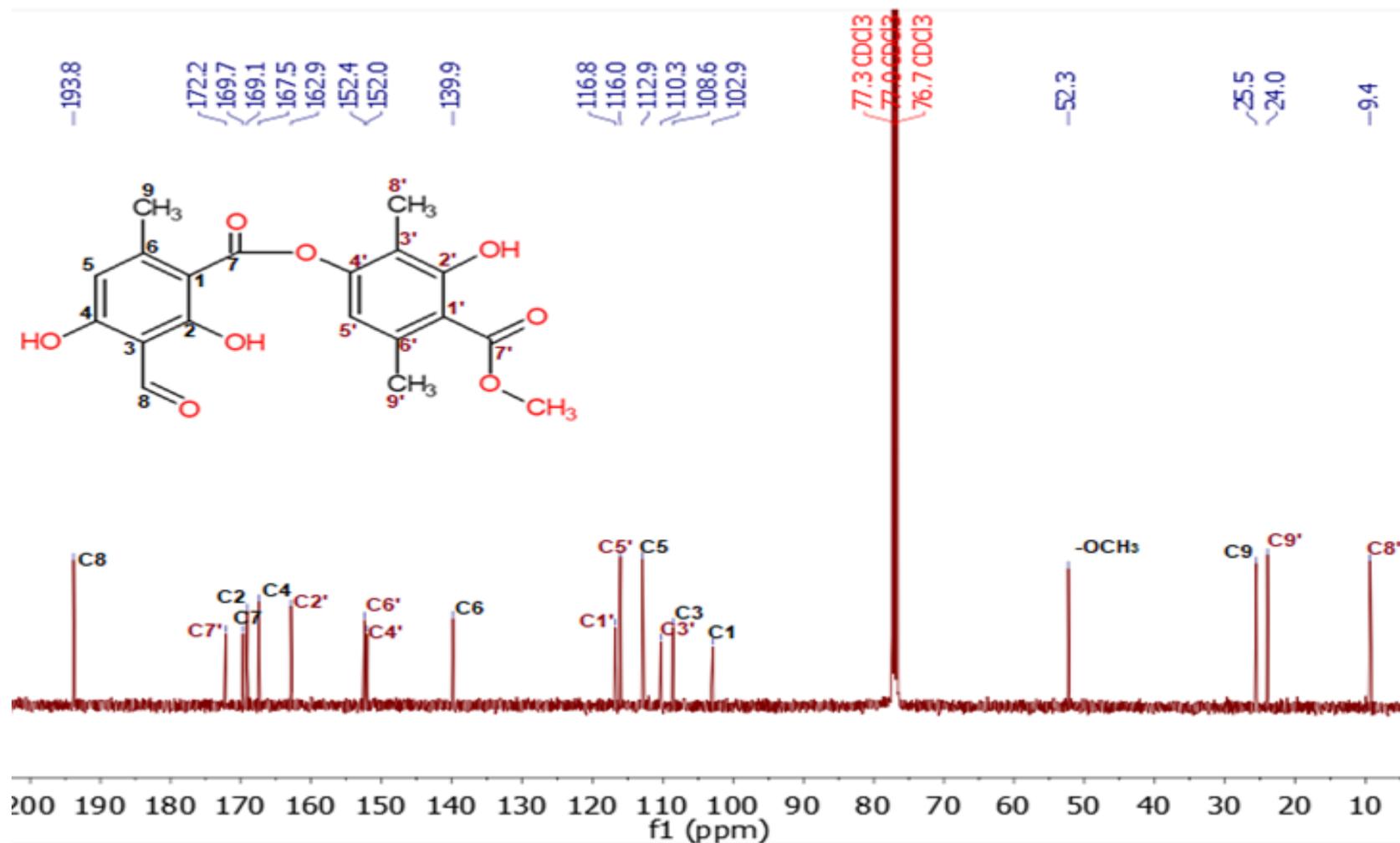


Figura 9 - 16. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup>C (101 MHz, CHCl<sub>3</sub>) de la atranorina (4).

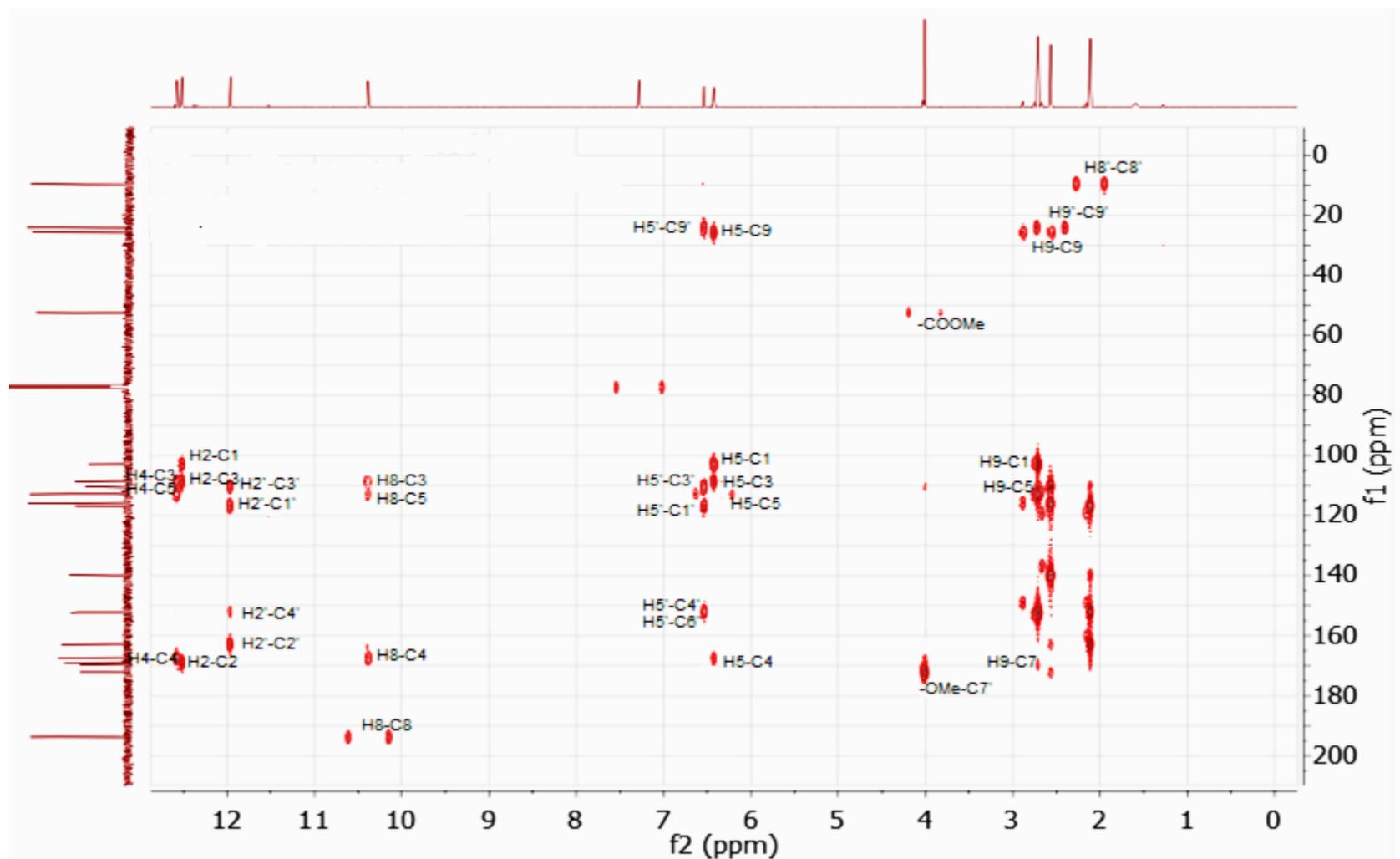
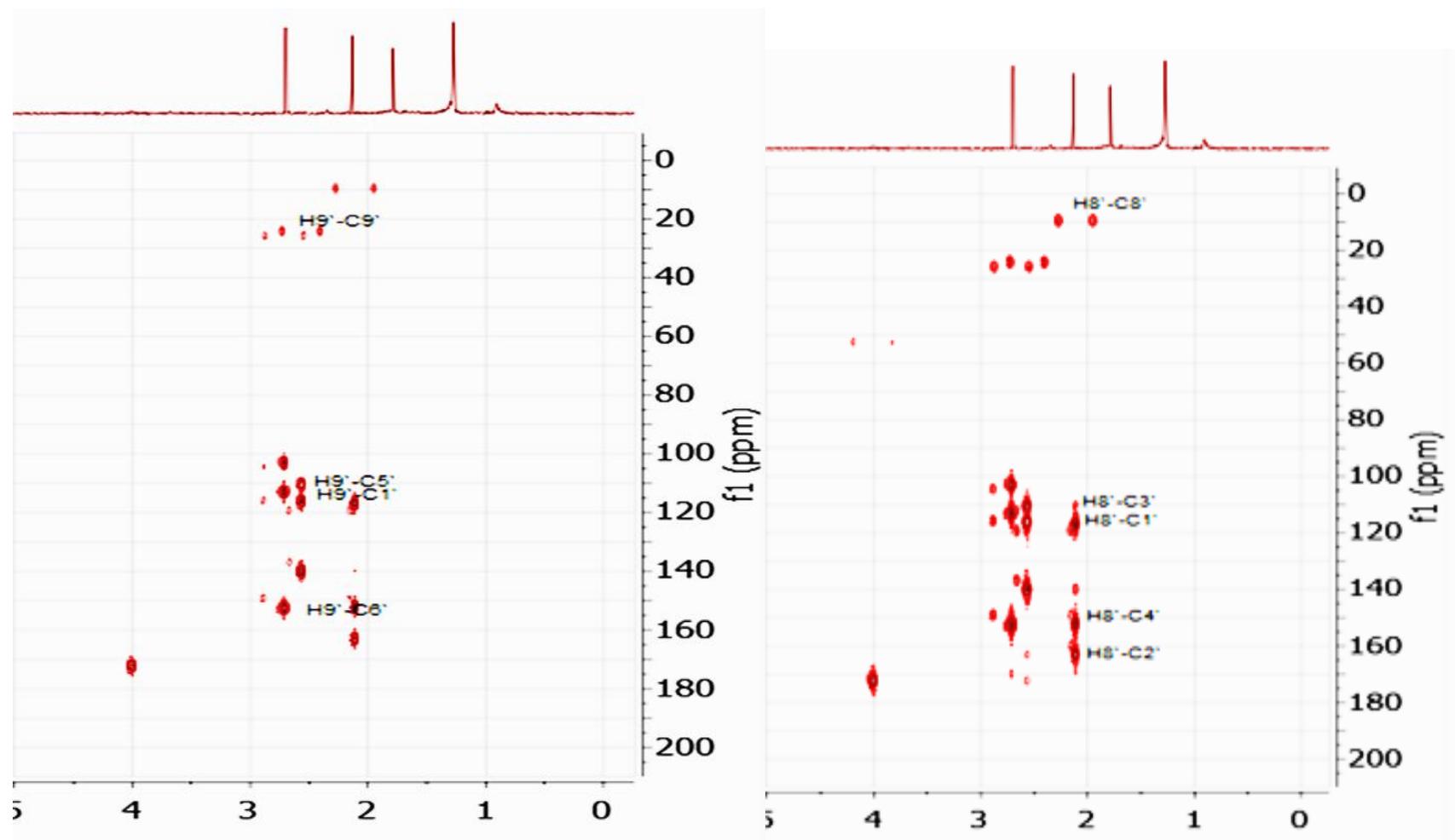


Figura 9 - 17. Espectro HMBC ( $^1\text{H}$  a 400 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 101 MHz  $\text{CDCl}_3$   $d_6$ ) de la atranorina (4).



**Figura 9 - 18.** Espectro HMBC ( $^1\text{H}$  a 400 MHz y  $^{13}\text{C}$  a 101 MHz  $\text{CDCl}_3$   $d_6$ ) de la atranorina (4), para las correlaciones de los hidrógenos ( $\text{H-8}'$  y  $\text{H9}'$ ).

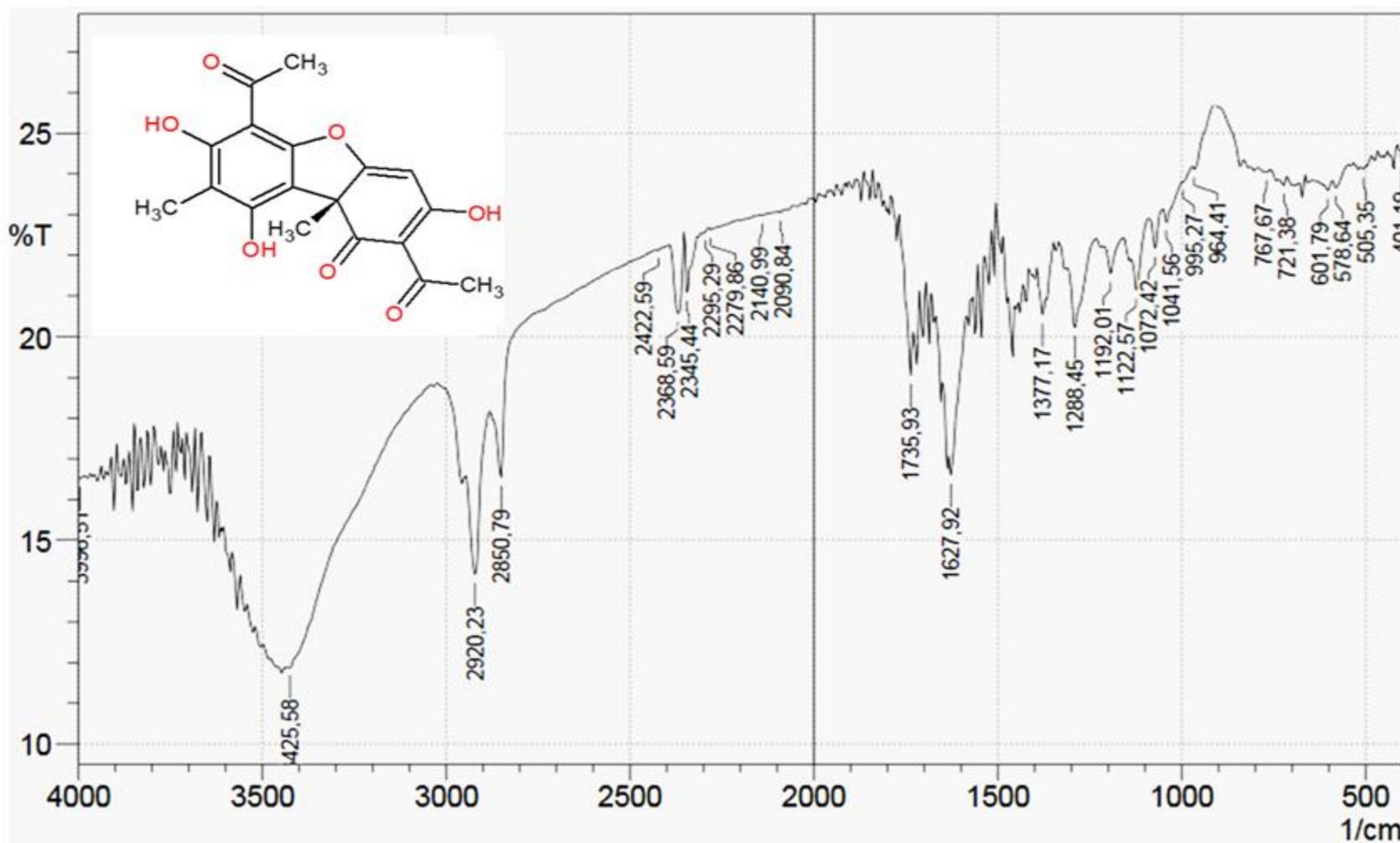


Figura 9 - 19 Espectro de infrarrojo (KBr) del ácido úsnico (5).

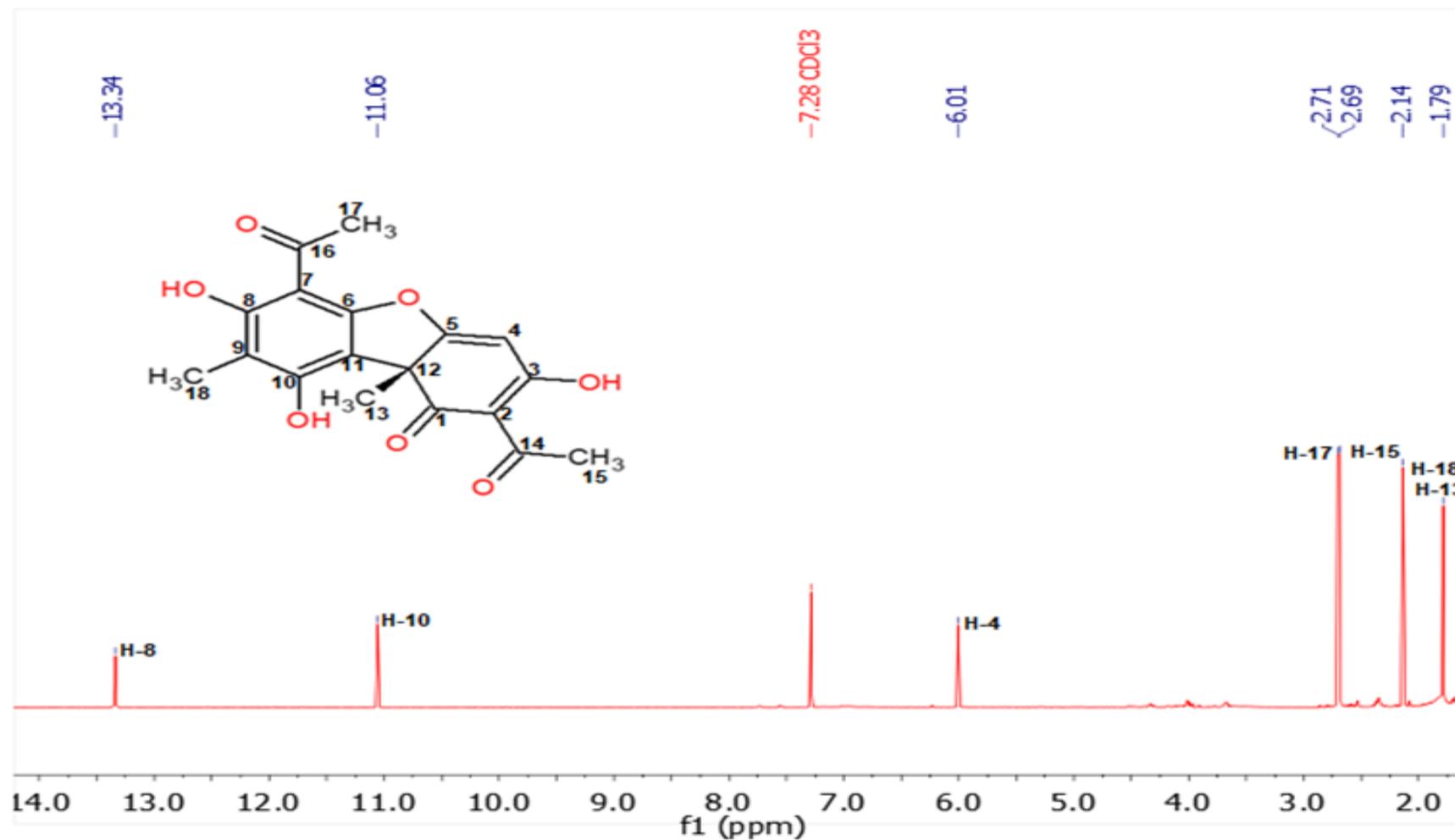


Figura 9 - 20. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) del ácido úsnico (5).

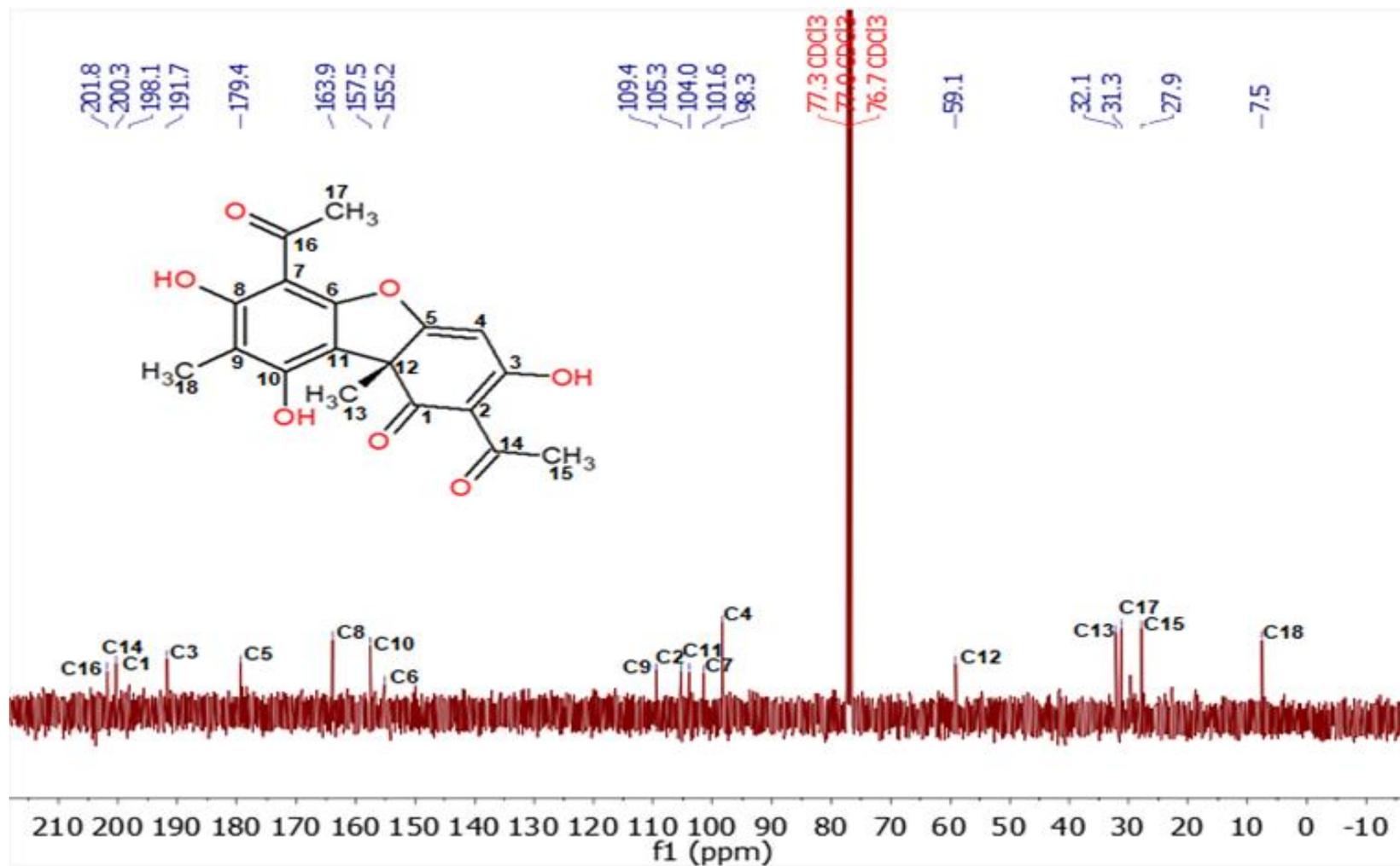


Figura 9 - 21. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  (101 MHz,  $\text{CHCl}_3$ ) del ácido úsnico (5).

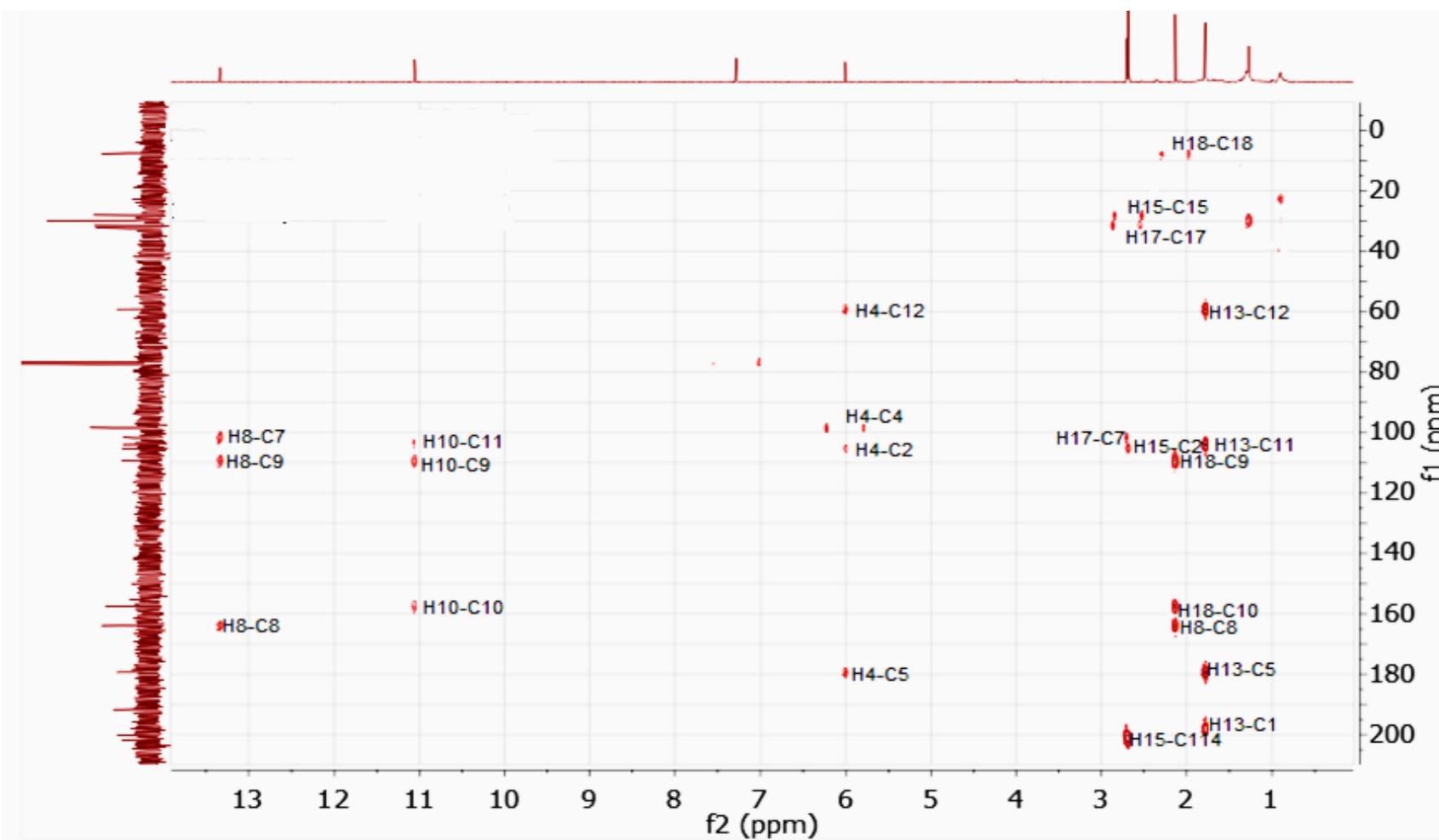


Figura 9 - 22. Espectro HMBC (<sup>1</sup>H a 400 MHz y <sup>13</sup>C a 101 MHz CDCl<sub>3</sub> d<sub>6</sub>) del ácido úsnico (5).