



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Antioxidantes y/o fotoprotectores de los  
líquenes del páramo de Sumapaz  
*Thamnolia vermicularis* y *Cladonia* cf.  
*didyma* y estudio de su posible  
producción biotecnológica**

**Lissy Marcella Núñez Arango**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá, Colombia  
2022

# **Antioxidantes y/o fotoprotectores de los líquenes *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia* cf. *didyma* y estudio de su posible producción biotecnológica**

**Lissy Marcella Núñez Arango**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Doctora en Ciencias Farmacéuticas**

Directora:

Prof. PhD. Norma Angélica Valencia Islas  
Profesora Titular  
Departamento de Farmacia

Codirector:

Prof. PhD. José Leopoldo Rojas Araque  
Profesor Asociado  
Departamento de Química

Línea de Investigación:

Obtención de sustancias bioactivas a partir de fuentes naturales

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 Farmacia

Bogotá, Colombia

2022



## ***Dedicatoria***

***A mi familia, mi pareja, mis amigos, mis  
compañeros de laboratorio, mis profesores, y  
todos aquellos que me dieron su incondicional  
apoyo.***

***Gracias de corazón.***

## **Declaración de obra original**

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

---

Lissy Marcella Núñez Arango

Fecha 06/10/2022

## Agradecimientos

Se agradece al Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (MinCiencias) la financiación de esta tesis a través de los siguientes mecanismos:

- a) Programa de Créditos Condonables a Doctores Nacionales a través de la convocatoria 757, código HERMES: 43541.
- b) Proyecto: “Caracterización y evaluación de dispositivos médicos a base de colágeno asociados a extractos naturales y metabolitos con aplicación farmacéutica. Código: 110180864505”. CT80740-198-2019. Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (MinCiencias). Código HERMES: 42660.

Se agradece a la Universidad Nacional de Colombia el financiamiento otorgado a través del proyecto: “Bioprospección de líquenes del Páramo de Sumapaz, Colombia como fuente original de sustancias duales con actividad antioxidante y fotoprotectora para la prevención de problemas dérmicos asociados a la radiación solar”, código HERMES: 35978. Convocatoria Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, Creación e Innovación de la Universidad Nacional de Colombia 2016-2018. Modalidad Única.

Se agradece al Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible y a Parques Nacionales Naturales de Colombia por el otorgamiento del Otrosí No. 4 al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 de 2016 (suscrito ante el Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible y la Universidad Nacional de Colombia) y por la gestión realizada para la recolección de las especies objeto de estudio en el Parque Nacional Natural Sumapaz (localidad 20 del Municipio de Bogotá, Colombia).





---

## Resumen

### **Antioxidantes y/o fotoprotectores de los líquenes del páramo de Sumapaz *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia* cf. *didyma* y estudio de su posible producción biotecnológica**

La exposición prolongada a la radiación ultravioleta (RUV) afecta principalmente a la piel, generando efectos negativos agudos y crónicos, que implican lesiones mutagénicas mediadas por el estrés oxidativo (EO), conllevando a cáncer de piel, enfermedad con un alto nivel de incidencia y mortalidad. Por lo anterior, es importante el uso de sustancias que tengan propiedades fotoprotectoras y/o antioxidantes, que por un lado sean capaces de interactuar con la RUV, evitando que llegue a la piel y, por otro, que impidan o contrarresten la formación de radicales libres. Dada las limitaciones que presenta la actual oferta de agentes protectores solares y/o antioxidantes respecto a su estabilidad, eficacia y seguridad, existe la necesidad de encontrar alternativas que cumplan con dichos requisitos, y los compuestos de origen natural son de interés para este propósito.

Los líquenes del páramo de Sumapaz (ecosistema sometido a condiciones ambientales extremas de alta radiación solar), son una fuente atractiva para el desarrollo de estos agentes, ya que presentan una química única, responsable en gran medida de la supervivencia que poseen estos organismos en dicho ecosistema. Es así como en la presente investigación se sometieron a estudio dos líquenes del páramo del Sumapaz, *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia* cf. *didyma*, de donde se aislaron y caracterizaron al ácido descarboxythamnólico (1) y arabitol (2) del primero, y el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3), el ácido barbático (4), el ácido condidymico (5), y el ácido isodidymico (6) del segundo. Así mismo se realizó el estudio del potencial antioxidante *in vitro* de los compuestos y extractos liquénicos, evaluando su capacidad captadora de radicales libres DPPH•, poder reductor férrico, poder inhibidor de la peroxidación lipídica, protección del ADN, y de queratinocitos frente al radical hidroxilo generado *in situ*. Se evaluó además la capacidad fotoprotectora *in vitro*, tanto en el UVA como en el UVB, y se determinaron parámetros fisicoquímicos: lipofilicidad (cLogP), energía libre de Gibbs de transferencia

( $\Delta_tG$ ), área de superficie polar topológica (TPSA), peso molecular (PM) y número de anillos aromáticos que presentan en la estructura (Ar#), indicativos de la penetración dérmica de los compuestos. Finalmente, se propuso una alternativa biotecnológica de inmovilización celular en caolinita como soporte de inmovilización y acetato de sodio (0.1, 1.0 y 10 mM) como precursor biosintético para la obtención de **1** a partir de *T. vermicularis*.

El compuesto **1** resultó ser el mejor agente dual con propiedades antioxidantes y fotoprotectoras capaz de captar radicales libres ( $CE_{50} = 0.3077$  mol de compuesto / mol DPPH•), reducir iones férricos (PRF  $0.782 \pm 0.011$  a 500 ppm), proteger a las células (% viabilidad celular (%VC)  $85.34 \pm 2.60$  a  $15 \mu M$ ), y a su vez posee capacidad fotoprotectora alta tanto en el UVB (FPS  $39.77 \pm 0.21$ ) como en el UVA ( $\lambda_{crit}$   $358.0 \text{ nm} \pm 2.1$ , y UVA-r\*  $0.546 \pm 0.051$  a 200 ppm) y propiedades fisicoquímicas favorables para ser entregado al estrato córneo de la piel (cLogP,  $\Delta_tG$ , PM y Ar#). El compuesto **3**, no fue un agente antioxidante sobresaliente en los modelos empleados, sin embargo, presentó alta capacidad fotoprotectora UVA ( $\lambda_{crit}$   $352.5 \pm 1.3$  y UVA-r\*  $0.464 \pm 0.001$  a 200 ppm) y propiedades protectoras de queratinocitos (%VC  $82.17 \pm 1.64$  a  $15 \mu M$ ) y del ADN (% Integridad del ADN (% I-ADN)  $73.82 \pm 5.44$  a  $100 \mu M$ ) frente a daño oxidativo, además de cumplir algunas propiedades fisicoquímicas para ejercer su efecto tópico ( $\Delta_tG$ , TPSA y Ar#). Los compuestos **5** y **6** presentaron actividad antioxidante prometedora, captando radicales libres DPPH• ( $CE_{50} = 0.6694$  y  $1.700$  mol de compuesto / mol DPPH•, respectivamente), reducen iones férricos (PRF  $0.392 \pm 0.009$  y  $0.546 \pm 0.011$ , respectivamente a 500 ppm), protegen a las células (% VC  $76.03 \pm 2.45$ , y  $75.92 \pm 0.14$ , respectivamente a  $15 \mu M$ ) y al ADN de daño oxidativo (% I-ADN  $56.59 \pm 4.50$ , y  $57.44 \pm 3.48$ , respectivamente a  $100 \mu M$ ) y presentan propiedades fotoprotectoras UVB altas (FPS  $39.78 \pm 0.20$ , y  $38.64 \pm 0.60$ , respectivamente a 200 ppm), además de cumplir algunas propiedades fisicoquímicas para ejercer su efecto tópico ( $\Delta_tG$ , TPSA y PM). Por su parte, **4** careció de propiedades antioxidantes y fotoprotectoras sobresalientes.

La inmovilización celular de *T. vermicularis* con flujo continuo de acetato de sodio 10 mM como precursor biosintético permitió la bioproducción de **1** con el mayor rendimiento (ca. 42 %) en comparación a las otras concentraciones evaluadas del precursor.

El ácido descarboxythamnólico (**1**) es un agente dual antioxidante y fotoprotector prometedor para su posible desarrollo como protector solar, mientras que **3**, **5** y **6** son de interés para combinarlos con otros agentes en el desarrollo de protectores solares de

amplio espectro. La presente investigación representa un aporte al conocimiento químico y de actividad biológica de los líquenes del páramo de Sumapaz y contribuye a la explotación sostenible de este recurso natural.

**Palabras clave: Hongos liquenizados, fotoprotección, antioxidantes, protección ADN, citoprotección, inmovilización celular**

# Abstract

## **Antioxidants and/or photoprotectors from the Sumapaz páramo lichens *Thamnolia vermicularis* and *Cladonia* cf. *didyma* and study of their possible biotechnological production**

Prolonged exposure to ultraviolet radiation (UVR) mainly affects the skin, generating acute and chronic negative effects, involving mutagenic lesions mediated by oxidative stress (OS), leading to skin cancer, a disease with a high incidence and mortality rate. Therefore, it is important to use substances with photoprotective and/or antioxidant properties, which on the one hand can interact with UVR, preventing it from reaching the skin, and on the other hand, preventing or counteracting the formation of free radicals. Given the limitations of the current supply of sunscreen and/or antioxidant agents with respect to their stability, efficacy and safety, there is a need to find alternatives that meet these requirements, and compounds of natural origin are of interest for this purpose.

The lichens of the Sumapaz paramo (an ecosystem subjected to extreme environmental conditions of high solar radiation), are an attractive source for the development of these agents, since they present a unique chemistry, which is largely responsible for the survival of these organisms in this ecosystem. Thus, in the present investigation, two lichens from the Sumapaz paramo, *Thamnolia vermicularis* and *Cladonia* cf. *didyma*, were studied, from which decarboxythamnolic acid (**1**) and arabitol (**2**) were isolated and characterized from the first one, and 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxyergosteryl divaricatinic acid (**3**), barbatic acid (**4**), condidymic acid (**5**), and isodidymic acid (**6**) from the second one. The *in vitro* antioxidant potential of the compounds and lichen extracts was also studied, evaluating their DPPH• free radical scavenging capacity, ferric reducing power, lipid peroxidation inhibiting power, DNA protection, and protection of keratinocytes against the hydroxyl radical generated *in situ*. The *in vitro* photoprotective capacity was also evaluated, both in UVA and UVB, and physicochemical parameters were determined: lipophilicity (cLogP), Gibbs free energy of transfer ( $\Delta_t G$ ), topological polar surface area (TPSA), molecular weight (MW) and number of aromatic rings present in the structure (Ar), indicative of the dermal penetration of the compounds. Finally, a biotechnological alternative of cell immobilization on kaolinite as immobilization support and sodium acetate (0.1, 1.0 and 10 mM) as biosynthetic precursor was proposed to obtain **1** from *T. vermicularis*.

Compound **1** proved to be the best dual agent with antioxidant and photoprotective properties capable of scavenging free radicals ( $EC_{50} = 0.3077$  mol compound / mol DPPH•), reducing ferric ions (PRF  $0.782 \pm 0.011$  at 500 ppm), protecting cells (% cell viability (%VC)  $85.34 \pm 2.60$  at 15  $\mu$ M), while possessing high photoprotective capacity in both UVB (SPF  $39.77 \pm 0.21$ ) and UVA ( $\lambda_{crit}$   $358.0 \text{ nm} \pm 2.1$ , and UVA-r\*  $0.546 \pm 0.051$  at 200 ppm) and favorable physicochemical properties for delivery to the *stratum corneum* of the skin (cLogP,  $\Delta_tG$ , PM and Ar#). Compound **3**, was not an outstanding antioxidant agent in the models employed, however, it presented high UVA photoprotective capacity ( $\lambda_{crit}$   $352.5 \pm 1.3$  and UVA-r\*  $0.464 \pm 0.001$  at 200 ppm) and keratinocyte protective properties (%VC  $82.17 \pm 1.64$  at 15  $\mu$ M) and DNA (% DNA Integrity (% I-DNA)  $73.82 \pm 5.44$  at 100  $\mu$ M) against oxidative damage, in addition to fulfilling some physicochemical properties to exert their topical effect ( $\Delta_tG$ , TPSA and Ar#). Compounds **5** and **6** showed promising antioxidant activity, scavenging DPPH• free radicals ( $EC_{50} = 0.6694$  and  $1.700$  mol compound / mol DPPH•, respectively), reduce ferric ions (PRF  $0.392 \pm 0.009$  and  $0.546 \pm 0.011$ , respectively at 500 ppm), protect cells (% VC  $76.03 \pm 2.45$ , and  $75.92 \pm 0.14$ , respectively at 15  $\mu$ M) and DNA from oxidative damage (% I-DNA  $56.59 \pm 4.50$ , and  $57.44 \pm 3.48$ , respectively at 100  $\mu$ M) and exhibit high UVB photoprotective properties (SPF  $39.78 \pm 0.20$ , and  $38.64 \pm 0.60$ , respectively at 200 ppm), in addition to fulfilling some physicochemical properties to exert their topical effect ( $\Delta_tG$ , TPSA and PM). For its part, **4** lacked outstanding antioxidant and photoprotective properties.

Cell immobilization of *T. vermicularis* with continuous flow of 10 mM sodium acetate as biosynthetic precursor allowed the bioproduction of **1** with the highest yield (ca. 42 %) compared to the other evaluated concentrations of the precursor.

Decarboxythamnolic acid (**1**) is a promising dual antioxidant and photoprotective agent for possible development as a sunscreen, while **3**, **5** and **6** are of interest for combination with other agents in the development of broad spectrum sunscreens. The present research represents a contribution to the chemical knowledge and biological activity of the lichens of the Sumapaz paramo and contributes to the sustainable exploitation of this natural resource.

**Key words:** Lichenized fungi, photoprotection, antioxidants, DNA protection, cytoprotection, cell immobilization.



# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>9</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>12</b>
<b>Planteamiento del problema y justificación</b> .....	<b>26</b>
<b>1. Objetivos</b> .....	<b>32</b>
1.1 General.....	32
1.2 Específicos .....	32
<b>2. Marco teórico y estado del arte</b> .....	<b>33</b>
2.1 La piel.....	33
2.2 Cáncer de piel .....	34
2.2.1 Cáncer de piel en Colombia .....	35
2.3 La exposición a la radiación solar como factor principal de estrés oxidativo a nivel dérmico .....	36
2.3.1 Papel de los antioxidantes en la prevención y tratamiento del cáncer de piel	40
2.3.2 Protectores solares como agentes preventivos de cáncer de piel.....	45
2.4 Hongos liquenizados.....	48
2.4.1 Metabolitos secundarios de los hongos liquenizados y sus propiedades biológicas.....	51
2.4.2 Actividad antioxidante y fotoprotectora de metabolitos secundarios de líquenes .....	53
2.5 <i>Thamnolia vermicularis</i> .....	54
2.5.1 Taxonomía.....	54
2.5.2 Hábitat y distribución .....	55
2.5.3 Usos tradicionales y propiedades medicinales.....	56
2.5.4 Compuestos reportados .....	57
2.6 <i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> .....	60
2.6.1 Taxonomía.....	60
2.6.2 Hábitat y distribución .....	61
2.6.3 Usos tradicionales y propiedades medicinales .....	62
2.6.4 Compuestos reportados .....	62
2.7 Producción biotecnológica de metabolitos de hongos liquenizados.....	64
<b>3. Hipótesis</b> .....	<b>71</b>
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	<b>72</b>

4.1	Lugares de realización .....	72
4.2	Selección de las especies objeto de estudio .....	72
4.2.1	Recolección .....	72
4.2.2	Extracción en pequeña escala .....	73
4.2.3	Evaluación preliminar de la actividad antioxidante y fotoprotectora de los extractos .....	73
4.3	Estudio químico de las especies seleccionadas .....	74
4.3.1	Procedimientos experimentales generales .....	74
4.3.2	Confirmación de la identidad taxonómica de las especies objeto de estudio .....	75
4.3.3	Extracción del líquen <i>Thamnolia vermicularis</i> .....	77
4.3.4	Fraccionamiento del extracto .....	77
4.3.4.1	Obtención del ácido descarboxithamnólico (1) .....	78
4.3.4.2	Obtención del arabitol (2).....	78
4.3.5	Extracción del líquen <i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> .....	78
4.3.6	Fraccionamiento del extracto .....	79
4.3.6.1	Obtención del 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3) .....	79
4.3.6.2	Obtención del ácido barbático (4).....	80
4.3.6.3	Obtención del ácido condidymico (5).....	81
4.3.6.4	Obtención del ácido isodidymico (6).....	82
4.4	Estudio biológico de los líquenes seleccionados .....	83
4.4.1	Procedimientos experimentales generales .....	83
4.4.2	Determinación de la actividad antioxidante .....	83
4.4.2.1	Cuantificación del poder captador de radicales libres DPPH• .....	83
4.4.2.2	Determinación de la reactividad para captar radicales libres .....	85
4.4.2.3	Capacidad inhibidora de la peroxidación de lípidos .....	86
4.4.2.4	Poder reductor férrico .....	88
4.4.3	Determinación de la actividad fotoprotectora .....	89
4.4.3.1	Evaluación de la actividad fotoprotectora frente a la radiación UVB mediante la estimación del factor de protección solar.....	89
4.4.3.2	Evaluación de la actividad fotoprotectora frente a la radiación UVA mediante la estimación de la longitud de onda crítica y relación UV-r* .....	90
4.4.3.3	Determinación del efecto protector de células sometidas a estrés oxidativo por radical hidroxilo.....	91
4.4.3.4	Determinación del efecto protector de ADN sometido a estrés oxidativo por radical hidroxilo .....	93
4.4.4	Determinación de la posible penetración cutánea de los liquenoquímicos aislados.....	94
4.5	Bioproducción de compuestos liquénicos por inmovilización celular .....	96
4.6	Análisis Estadístico .....	98
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>99</b>
5.1	Selección de las especies <i>Thamnolia vermicularis</i> y <i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> .....	99
5.2	Estudio químico de <i>Thamnolia vermicularis</i> .....	99
5.2.1	Obtención de las sustancias liquénicas .....	99
5.2.2	Caracterización estructural de los compuestos .....	100
5.2.2.1	Ácido descarboxithamnólico (1).....	100
5.2.2.2	Arabitol (2).....	102

5.3	Estudio químico de <i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> .....	103
5.3.1	Obtención de las sustancias liquénicas .....	103
5.3.2	Caracterización estructural de los compuestos .....	104
5.3.2.1	5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3) .....	105
5.3.2.2	Ácido barbático (4) .....	107
5.3.2.3	Ácido condidymico (5) .....	109
5.3.2.4	Ácido isodidymico (6) .....	112
5.4	Estudio de la actividad biológica de <i>Thamnolia vermicularis</i> y <i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> .....	115
5.4.1	Actividad antioxidante de extractos y compuestos aislados .....	115
5.4.1.1	Capacidad captadora de radicales libres .....	115
5.4.1.2	Reactividad de los compuestos para captar radicales libres .....	120
5.4.1.3	Poder reductor férrico .....	121
5.4.1.4	Poder inhibidor de la peroxidación lipídica .....	124
5.4.2	Actividad fotoprotectora de extractos y compuestos aislados de <i>Thamnolia vermicularis</i> y <i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> .....	126
5.4.2.1	Actividad fotoprotectora frente a la radiación UVB mediante estimación del factor de protección solar (FPS) .....	126
5.4.2.2	Actividad fotoprotectora frente a la radiación UVA mediante estimación de longitud de onda crítica ( $\lambda_{crit}$ ) y relación UVA (UVA-r*) .....	129
5.4.2.3	Efecto protector de células sometidas a estrés oxidativo por radical hidroxilo	131
5.4.2.4	Efecto protector del ADN sometido a estrés oxidativo por radical hidroxilo	132
5.4.2.5	Estimación de la posible penetración cutánea de los liquenoquímicos aislados	135
	Penetración dérmica .....	136
5.4.2.6	Correlación entre la estructura química de los liquenoquímicos aislados con su actividad antioxidante y fotoprotectora .....	137
5.5	Bioproducción de compuestos liquénicos por inmovilización celular .....	142
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>150</b>
6.1	Conclusiones .....	150
6.2	Recomendaciones .....	152

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 2-1:</b> Anatomía de la piel. (Adaptado de National Cancer Institute).....	33
<b>Figura 2-2:</b> Prevalencia y mortalidad del melanoma en Colombia (2019) ajustada por edad según entidad territorial (Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, 2019).....	36
<b>Figura 2-3:</b> Ejemplo de reacción en cadena de radicales libres.....	38
<b>Figura 2-4:</b> Efectos en la piel por la exposición prolongada a la radiación ultravioleta (RUV) (Adaptado de Mesa-Arango, et al., 2017).....	39
<b>Figura 2-5:</b> Mecanismos de acción antioxidante.....	40
<b>Figura 2-6:</b> Hongo liquenizado (GBIF 2021) con esquema representativo de sus partes. A) talo heterómero, B) talo homómero (Adaptado de Asturnatura, líquenes y micorrizas, 2021).....	49
<b>Figura 2-7:</b> Biosíntesis de metabolitos secundarios de hongos liquenizados (Ranković, 2015).....	51
<b>Figura 2-8:</b> Ejemplos de policétidos fenólicos de origen liquénico (Calcott, et al., 2018).....	52
<b>Figura 2-9:</b> Liquenoquímicos con actividad antioxidante y fotoprotectora. (Calcott, et al., 2018; Nguyen, et al., 2013).....	54
<b>Figura 2-10:</b> <i>Thamnoia vermicularis</i> . (Fotografía de la autora).....	55
<b>Figura 2-11:</b> Distribución mundial de <i>Thamnoia vermicularis</i> (CNALH, 2023). Los puntos en azul indican los lugares en donde se ha reportado la existencia de la especie. ....	56
<b>Figura 2-12:</b> <i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> (Fotografía de la autora).....	61
<b>Figura 2-13:</b> Distribución mundial de <i>Cladonia didyma</i> (CNALH, 2023). Los puntos en color anaranjado indican los lugares en donde se ha reportado la existencia de la especie.....	61
<b>Figura 2-14:</b> Esquema de aislamiento de esporas después de la descarga del apotecio para el cultivo del hongo aposimbótico (Yoshimura, et al., 2002).....	66
<b>Figura 2-15:</b> Ejemplo de la resíntesis del talo liquénico de <i>Usnea hakonensis</i> . Izquierda: fotobionte y micobionte aislados, centro: resíntesis del talo comparado con un individuo liquénico encontrado en la naturaleza (derecha). (Kono, et al., 2020).....	67
<b>Figura 2-16:</b> Tipos de inmovilización celular para la obtención de compuestos liquénicos.....	68
<b>Figura 4-1:</b> Reacción entre el radical libre DPPH y un antioxidante. ....	84

<b>Figura 4-2:</b> Reacción entre el radical libre DPPH• y un antioxidante (AH: antioxidante, R•: radical).....	85
<b>Figura 4-3:</b> Peroxidación lipídica y cuantificación de hidroperóxidos (LOOH). .....	87
<b>Figura 4-4:</b> Reacciones de reducción del ion férrico y formación del complejo coloreado azul de Turnbull. ....	88
<b>Figura 4-5:</b> Transformación enzimática del MTT a formazán por células viables.....	92
<b>Figura 4-6:</b> Equipo para bioproducción de metabolitos de líquenes mediante inmovilización de talos liquénicos.....	97
<b>Figura 5-1:</b> Correlaciones observadas (H → C) en el espectro HMBC para el ácido condidymico (5).....	110
<b>Figura 5-2:</b> Correlaciones observadas (H → C) en el espectro HMBC para el ácido isodidymico (6).....	113
<b>Figura 5-3:</b> Comparación estructural del ácido descarboxithamnólico (1) vs el ácido barbático (4).....	120
<b>Figura 5-4:</b> Poder reductor férrico de extractos y compuestos aislados de <i>T. vermicularis</i> (ET) y <i>C. cf. didyma</i> (ECd). ácido descarboxithamnólico (1), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3), ácido barbático (4), ácido condidymico (5), ácido isodidymico (6) y butirato de hidroxitolueno (BHT).....	122
<b>Figura 5-5:</b> Poder inhibidor de la peroxidación lipídica de extractos y compuestos aislados de <i>T. vermicularis</i> (ET) y <i>C. cf. didyma</i> (ECd). ácido descarboxithamnólico (1), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3), ácido barbático (4), ácido condidymico (5), ácido isodidymico (6) y butirato de hidroxitolueno (BHT).....	126
<b>Figura 5-6:</b> Efecto protector del ADN de los compuestos aislados de <i>T. vermicularis</i> y <i>C. cf. didyma</i> frente a daño oxidativo causado por el radical OH•. Gel de agarosa obtenido de la electroforesis del ADN sometido a diferentes tratamientos: ADN no expuesto al radical (I-ADN), ADN expuesto al radical (ADN EXP.OH), ácido descarboxithamnólico (1), ácido barbático (4), ácido condidymico (5), ácido isodidymico (6), octil metoxicinamato (OMC) y esferofoarina (ESF).....	134
<b>Figura 5-7:</b> Compuestos aislados de los líquenes <i>T. vermicularis</i> y <i>C. cf. didyma</i> .....	140
<b>Figura 5-8.</b> Curvas de calibración de ácido descarboxithamnólico (1 o ADT; 5 a 300 ppm). <b>a:</b> extracción de compuestos de baja polaridad (Et <sub>2</sub> O:AcOEt (60:40)); <b>b:</b> extracción de compuestos de mediana polaridad (CHCl <sub>3</sub> :AcCN (65:35)).....	144
<b>Figura 5-9:</b> Bioproducción de compuestos fenólicos (equivalentes a ADT por mg de residuo seco obtenido de la alícuota de inmovilización) por <i>T. vermicularis</i> empleando NaOAc (0.10, 1.0 y 10.0 mM) como precursor biosintético y caolinita como matriz de inmovilización.....	145
<b>Figura 5-10:</b> Perfiles cromatográficos de la bioproducción de compuestos fenólicos de baja (a) y mediana (b) polaridad por <i>T. vermicularis</i> mediante inmovilización celular en caolinita suministrada con NaOAc (10 mM). Ácido descarboxithamnólico (ADT), extracto en acetona del liquen (Ext. Ac.), extracto en éter del liquen (Ext. Éter) reveladas con UV (arriba) y ácido sulfúrico (abajo).....	147
<b>Figura 5-11:</b> Ácido descarboxithamnólico (1 o ADT) bioproducido por inmovilización celular del talo liquénico de <i>T. vermicularis</i> en caolinita suministrando acetato de sodio (NaAcO, 0.1, 1.0 y 10.0 mM) como precursor biosintético. ....	148

<b>Figura 5-12:</b> Corte del talo de <i>T. vermicularis</i> (40X) antes (a) y después (b) del ensayo teñido con rojo neutro (arriba). Apariencia del talo antes y después del ensayo (abajo). Corte trasversal.....	149
<b>Figura 6-1.</b> Espectro de IR (KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) del ácido descarboxythamnólico (1) .....	166
<b>Figura 6-2.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del ácido descarboxythamnólico (1) (DMSO $\text{d}_6$ , 400 MHz).....	167
<b>Figura 6-3.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del ácido descarboxythamnólico (1) (DMSO $\text{d}_6$ , 101 MHz).....	168
<b>Figura 6-4.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del arabitól (2) (DMSO- $\text{d}_6$ , 400 MHz).....	169
<b>Figura 6-5.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del arabitól (2) (DMSO $\text{d}_6$ , 101 MHz).....	170
<b>Figura 6-6.</b> Espectro HMQC del arabitól (2) (DMSO- $\text{d}_6$ ).....	171
<b>Figura 6-7.</b> Espectro de IR (KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) de 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3). .....	172
<b>Figura 6-8.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	173
<b>Figura 6-9.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3) ( $\text{CDCl}_3$ ,101 MHz).....	174
<b>Figura 6-10.</b> Espectro HMQC de 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3) ( $\text{CDCl}_3$ ).....	175
<b>Figura 6-11.</b> Espectro HMBC del 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3) ( $\text{CDCl}_3$ ). .....	176
<b>Figura 6-12.</b> Espectro RMN $^1\text{H}$ del ácido barbático (4) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	177
<b>Figura 6-13.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del ácido barbático (4) ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz) .....	178
<b>Figura 6-14.</b> Espectro HMQC del ácido barbático (4) ( $\text{CDCl}_3$ ). .....	179
<b>Figura 6-15.</b> Espectro HMBC del ácido barbático (4) ( $\text{CDCl}_3$ ).....	180
<b>Figura 6-16.</b> Espectro IR (KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) del ácido condidymico (5).....	181
<b>Figura 6-17.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del ácido condidymico (5) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). .....	182
<b>Figura 6-18..</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del ácido condidymico (5) ( $\text{CDCl}_3$ ,101 MHz). .....	183
<b>Figura 6-19.</b> Espectro HMQC del ácido condidymico (5) ( $\text{CDCl}_3$ ).....	184
<b>Figura 6-20.</b> Espectro HMBC del ácido condidymico (5) ( $\text{CDCl}_3$ ).....	185
<b>Figura 6-21.</b> Espectro de masas (EMIE) del ácido condidymico (5).....	186
<b>Figura 6-22.</b> Espectro IR (KBr, $\text{cm}^{-1}$ ) del ácido isodidymico (6).....	187
<b>Figura 6-23..</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ del ácido isodidymico (6) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). .....	188
<b>Figura 6-24.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del ácido isodidymico (6) ( $\text{CDCl}_3$ ,101 MHz). .....	190
<b>Figura 6-25.</b> Espectro COSY del ácido isodidymico (6) ( $\text{CDCl}_3$ ).....	190
<b>Figura 6-26.</b> Espectro HMQC del ácido isodidymico (6) ( $\text{CDCl}_3$ ). .....	191
<b>Figura 6-27.</b> Espectro HMBC del ácido isodidymico (6) ( $\text{CDCl}_3$ ).....	192
<b>Figura 6-28.</b> Espectro de masas (EMIE) de masas ácido isodidymico .....	193
<b>Figura 6-29:</b> Perfiles cromatográficos de la bioproducción de compuestos fenólicos de baja (a) y mediana (b) polaridad por <i>T. vermicularis</i> mediante inmovilización celular en caolinita suministrada con NaOAc (1 mM). Ácido descarboxithamnólico (ADT), extracto en acetona del líquen (Ext. Ac.), extracto en éter del líquen (Ext. Éter).....	194
<b>Figura 6-30:</b> Perfiles cromatográficos de la bioproducción de compuestos fenólicos de baja (a) y mediana (b) polaridad por <i>T. vermicularis</i> mediante inmovilización celular en	

caolinita suministrada con NaOAc (1 mM). Ácido descarboxithamnólico (ADT), extracto en acetona del liquen (Ext. Ac.), extracto en éter del liquen (Ext. Éter). Placa revelada con solución de ácido sulfúrico en etanol al 10%. ..... 195

**Figura 6-31:** Perfiles cromatográficos de la bioproducción de compuestos fenólicos de baja (a) y mediana (b) polaridad por *T. vermicularis* mediante inmovilización celular en caolinita suministrada con NaOAc (0.1 mM). Ácido descarboxithamnólico (ADT), extracto en acetona del liquen (Ext. Ac.), extracto en éter del liquen (Ext. Éter). ..... 196

**Figura 6-32:** Perfiles cromatográficos de la bioproducción de compuestos fenólicos de baja (a) y mediana (b) polaridad por *T. vermicularis* mediante inmovilización celular en caolinita suministrada con NaOAc (0.1 mM). Ácido descarboxithamnólico (ADT), extracto en acetona del liquen (Ext. Ac.), extracto en éter del liquen (Ext. Éter). Placa revelada con solución de ácido sulfúrico en etanol al 10%. ..... 197

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 2-1:</b> Antioxidantes endógenos enzimáticos (Birben, et al., 2012).....	41
<b>Tabla 2-2:</b> Antioxidantes no enzimáticos endógenos y exógenos.....	42
<b>Tabla 2-3:</b> Clases estructurales de filtros y pantallas solares aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA). .....	46
<b>Tabla 2-4:</b> Compuestos reportados para <i>T. vermicularis</i> .....	57
<b>Tabla 2-5:</b> Compuestos reportados para <i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> .....	62
<b>Tabla 4-1:</b> Datos de recolección del material liquénico objeto de estudio.....	73
<b>Tabla 4-2:</b> Sistemas de elución empleados en la cromatografía de capa delgada.....	74
<b>Tabla 4-3:</b> Pruebas de coloración de talo liquénico para identificación taxonómica (Orange, et al., 2001).....	76
<b>Tabla 4-4:</b> Características morfológicas y de coloración de los talos de <i>Thamnolia vermicularis</i> para confirmación de su identidad taxonómica. ....	76
<b>Tabla 4-5:</b> Características morfológicas y de coloración de los talos de <i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> para confirmación de su identidad taxonómica. ....	77
<b>Tabla 4-6:</b> Fraccionamiento del extracto acetónico de <i>Thamnolia vermicularis</i> .....	77
<b>Tabla 4-7:</b> Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción II proveniente del extracto de <i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> . ....	79
<b>Tabla 4-8:</b> Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción II-1. ....	80
<b>Tabla 4-9:</b> Cromatografía en columna abierta en Sephadex® de la fracción FII-11. ....	81
<b>Tabla 4-10:</b> Cromatografía en columna abierta en Sephadex® de la fracción FII-3. ....	82
<b>Tabla 4-11:</b> Valores de la constante, producto de un factor de eritema (EE ( $\lambda$ )) con la intensidad solar (I ( $\lambda$ )) asociadas a las longitudes de onda entre 290 y 320 nm (Sayre, et al., 1979). ....	89
<b>Tabla 5-1:</b> Compuestos obtenidos de <i>Thamnolia vermicularis</i> . ....	100
<b>Tabla 5-2:</b> Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido descarboxithamnólico (1) .....	101
<b>Tabla 5-3:</b> Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el arabitol (2).....	102
<b>Tabla 5-4:</b> Compuestos aislados de <i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> .....	103
<b>Tabla 5-5:</b> Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3) .....	106
<b>Tabla 5-6:</b> Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido barbático (4) .....	108

<b>Tabla 5-7:</b> Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido condidymico (5).....	111
<b>Tabla 5-8:</b> Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido isodidymico (6).....	114
<b>Tabla 5-9:</b> Poder captador de radicales libres (CE <sub>50</sub> ) de extractos y compuestos aislados de <i>T. vermicularis</i> y <i>C. cf. didyma</i> .....	116
<b>Tabla 5-10:</b> Reactividad de compuestos aislados de <i>T. vermicularis</i> y <i>C. cf. didyma</i> para captar radicales libres ( $k_2$ ; 25.0 ± 0.1 °C).....	120
<b>Tabla 5-11:</b> Poder reductor férrico de los extractos acetónicos y compuestos aislados de <i>T. vermicularis</i> y <i>C. cf. didyma</i> .....	122
<b>Tabla 5-12:</b> Poder inhibidor de la peroxidación lipídica de extractos y compuestos aislados de <i>T. vermicularis</i> y <i>C. cf. didyma</i> .....	124
<b>Tabla 5-13:</b> Actividad fotoprotectora (FPS, $\lambda_{crit}$ y UVA-r*) de extractos y compuestos de <i>T. vermicularis</i> y <i>C. cf. didyma</i> .....	128
<b>Tabla 5-14:</b> Efecto citoprotector de los compuestos aislados de los líquenes <i>T. vermicularis</i> y <i>C. cf. didyma</i> , frente a daño oxidativo causado por el radical hidroxilo. ...	132
<b>Tabla 5-15:</b> Efecto protector del ADN de los liquenoquímicos aislados de <i>T. vermicularis</i> y <i>C. cf. didyma</i> contra daño oxidativo causado por el radical hidroxilo.....	133
<b>Tabla 5-16:</b> Parámetros fisicoquímicos para estimación de posible penetración cutánea de los liquenoquímicos aislados.....	136

## Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
CP	Cáncer de piel
RUV	Radiación ultravioleta
UV	Ultravioleta
RL	Radicales libres
EOR	Especies oxígeno reactivas
ENR	Especies nitrógeno reactivas
AVO	Avobenzona
BEM	Bemotrizinol
OMC	Octil metoxicinamato
HL	Hongo liquenizado
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
Sd	Desviación estándar
ES	Error estándar
BHT	Butilhidroxitolueno
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
%IPL	% 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
Et <sub>2</sub> O	Éter etílico
AcOEt	Acetato de etilo
Me <sub>2</sub> CO	Acetona
MeOH	Metanol
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo
EtOH	Etanol
AcOH	Ácido acético
DMSO	Dimetilsulfóxido
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
NaOAc	Acetato de sodio

## Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
$k_{obs.}$	Constante de velocidad aparente	$s^{-1}$	Sección 4.4.2.2
$k_2$	Constante de velocidad de 2 <sup>do</sup> orden	$M^{-1}s^{-1}$	Sección 4.4.2.2

## Símbolos con letras griegas

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

## Planteamiento del problema y justificación

El cáncer de piel (CP) es una de las patologías más frecuentes dentro de la población mundial, y una de sus principales causas es la exposición prolongada al sol, cuyo componente de radiación ultravioleta (RUV) e incluso infrarrojo, desencadenan una serie de eventos adversos en dicho órgano (Mesa-Arango, et al., 2017). Una vez la piel está expuesta a la RUV, moléculas como la melanina, proteínas, lípidos y ADN quedan a merced de ésta, causando daños en su estructura, en muchas ocasiones irreparables. Uno de los daños más representativos se da en el ADN, puesto que la RUV, especialmente el componente UVB, modifica sus bases nitrogenadas, causando mutaciones y la ruptura de genes desencadenando muerte celular (Allegra, et al., 2020). Además, dicha radiación también está relacionada con el estrés oxidativo; un estado en donde hay exacerbación de especies altamente reactivas (EAR) que dañan el material genético, peroxidan lípidos y proteínas generando un daño dérmico evidente (Pisoschi & Pop, 2015). En la piel, los principales eventos oxidativos se dan en el melanosoma, seguido por la matriz extracelular en donde el proceso de estrés oxidativo afecta especialmente a los fibroblastos (Allegra, et al., 2020).

El CP se ha convertido en un tema de preocupación a nivel mundial, debido a su impacto negativo en la salud pública, ubicándose en el cuarto (no melanoma) y diecinueveavo lugar (melanoma), en términos de prevalencia frente a otros tipos de cáncer (Organización Mundial de la Salud, 2021). Cabe mencionar que el melanoma tiene mayores tasas de mortalidad respecto al número de casos reportados, siendo el más agresivo por su alta capacidad de hacer metástasis en otros órganos (Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, 2018). Entre los países con mayor incidencia en CP, tanto melanómico como no melanómico, se encuentran Australia y Nueva Zelanda, países ubicados donde la capa de ozono (que constituye la principal barrera terrestre frente a las radiaciones emitidas por el sol) se encuentra debilitada. Otras regiones que le siguen son las ubicadas cerca de la línea ecuatorial y el trópico, en donde la incidencia de la radiación solar es perpendicular haciendo que el nivel de exposición a esta sea mayor (Sung, et al., 2020).

En Colombia, país ubicado en el área ecuatorial, se presenta una gran incidencia de CP, así lo mostraron las cifras del Instituto Nacional de Salud, que revelan un preocupante incremento en un periodo de 4 años, entre 2015 y 2019, pasando de 53622 casos a 128542 (Ministerio de Salud de Colombia, 2020). Según el Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo (2019), el melanoma se encuentra en el octavo lugar de frecuencia entre los tipos de cáncer priorizados por el sistema nacional de salud colombiano. Las cifras de CP en el país son tan alarmantes que, en términos de políticas públicas, el gobierno nacional a través del Ministerio de Salud reconoció esta patología como una prioridad en salud pública, gestionando campañas para disminuir su impacto, principalmente en regiones con los mayores índices de RUV como lo son Bogotá, Boyacá, Valle del Cauca, Casanare, Quindío, Vaupés, Guainía y Amazonas (Ministerio de Salud de Colombia, 2020).

Una de las estrategias que han adoptado diferentes países incluyendo Colombia para la prevención del CP, es la divulgación masiva de los impactos negativos que tiene la exposición prolongada al sol, que como se mencionó es la principal causa de este cáncer, advirtiendo a la población respecto a los factores de riesgo, en especial a aquellas personas con un fototipo de piel clara (I y II), quienes poseen niveles de melanina menores que aquellos con piel de tonalidad oscura (IV, V, y VI). De manera general se hacen campañas promoviendo la implementación de medidas de cuidado frente a la exposición solar, empleando elementos de protección como ropa que cubra la mayor parte del cuerpo, gorras, sombrillas, además del uso de protectores solares (Liga Colombiana contra el Cáncer, 2020).

Si bien la piel posee mecanismos endógenos de protección frente al daño que la RUV y las EAR causan por la exposición solar, entre ellos, la biosíntesis de sustancias fotoprotectoras endógenas como la melanina, y la presencia de un sistema antioxidante que incluye enzimas y compuestos capaces de combatir a las EAR; esta protección resulta insuficiente (Pisoschi & Pop, 2015). Por lo tanto, además de la protección endógena de la piel, es necesario reforzar el sistema de defensa mediante el empleo de sustancias exógenas con capacidad fotoprotectora y antioxidante.

Actualmente, el sector cosmético y farmacéutico cuenta con una gran variedad de compuestos fotoprotectores, los cuales ejercen su acción por medio de mecanismos físicos o químicos. Los fotoprotectores físicos también llamados pantallas solares, son sustancias

de naturaleza inorgánica que reflejan o dispersan la RUV, evitando que ésta entre en contacto directo con la piel (Saewan & Jimtaisong, 2015) presentando protección tanto en la región UVA como en la UVB. Además, tienen bajo perfil de alergenicidad, convirtiéndolos en una buena opción de ingredientes para los protectores solares, aun así, no son tan aceptados, debido a la apariencia que dejan en la piel, con el llamado efecto “mimo” (Radice, et al., 2016). A su vez, los filtros químicos, son compuestos orgánicos con cromóforos capaces de absorber los fotones de la RUV antes de que ésta alcance a la piel, transformándola en energía menos dañina en forma de calor o luz. El inconveniente que presentan muchas de estas sustancias tiene que ver con su estabilidad molecular, pues después de una fuerte exposición a la RUV, muchas de ellas se degradan en productos que producen reacciones fotoalérgicas y fototóxicas para la piel. Asimismo, a varios de estos compuestos se les atribuyen propiedades disruptoras endocrinas y posibles efectos inmunosupresores que condicionan su uso (Radice, et al., 2016).

En cuanto a los compuestos antioxidantes, la oferta actual incluye sustancias de origen sintético y natural, empleadas en productos dermatológicos, con el propósito de prevenir o mitigar el daño de las EAR generadas por factores externos como la RUV. Entre los productos antioxidantes más conocidos por sus beneficios en la piel, se encuentran las vitaminas E y C, además de compuestos fenólicos de origen natural (Pouillot, et al., 2011; Pisoschi & Pop, 2015).

Aunque actualmente existen diferentes alternativas para evitar el daño producido por la RUV y las EAR, el campo de la fotoprotección aún no ha sido totalmente desarrollado, y los principios activos que en este momento se emplean no cumplen en su totalidad con los requerimientos de seguridad y eficacia (Buso, et al., 2017). Es por ello, que un enfoque reciente en este campo abarca la protección solar desde un punto de vista multifocal, investigando moléculas con potencial actividad dual tanto antioxidante como fotoprotectora para contrarrestar los efectos de la RUV sobre la piel (Rojas, et al., 2015).

En este sentido, los compuestos de origen liquénico han mostrado resultados prometedores en cuanto a su potencial antioxidante y fotoprotector, un efecto dual que resultaría favorable en productos para protección solar (Millot, et al., 2012). Estas sustancias, en su tipo, son producidas por los hongos liquenizados (HL) (organismos

---

resultantes de la asociación simbiótica entre un fotobionte que puede ser un alga verde y/o una cianobacteria, y un micobionte que es un hongo (Spribille, et al., 2016)) como resultado de su adaptación fisiológica para sobrevivir bajo condiciones climáticas extremas, como las generadas por un ambiente altamente expuesto a la RUV y a las EAR que esta genera (Fernández M., et al. 2016). Son de particular interés, los HL de entornos de alta montaña (3500 - 4700 m s.n.m.) como el páramo de Sumapaz, en Colombia, porque dichos organismos han logrado colonizar con éxito este tipo de ecosistemas, sin verse afectados por los altos niveles de radiación solar. Adicionalmente, considerando que el páramo, es un ecosistema que se encuentra restringido a la zona occidental de Sudamérica con mayor presencia en Colombia y, que posee una diversidad biológica única, incluyendo HL en gran abundancia, resulta de interés su estudio pues puede conducir a la obtención de compuestos originales a partir de dichos organismos (Rojas, et al., 2015; Valencia-Islas, et al., 2021).

En Colombia, el inventario de especies liquénicas es amplio y variado, dados los diversos tipos de ecosistemas con los que cuenta el país. Ecosistemas de alta montaña, selvas tropicales, bosques, desiertos, entre otros, son algunos de los lugares en los que se ha reportado el crecimiento y propagación exitosa de los hongos liquenizados. La riqueza liquenológica colombiana se estima en aproximadamente 3600 especies, de las cuales solo se han registrado a la fecha aproximadamente 1800 faltando aún más de la mitad por ser identificadas y registradas (Soto-Medina *et al.* 2021).

Reconociendo el potencial que las sustancias liquénicas poseen para convertirse en principios activos, y aprovechando la abundancia en Colombia de este recurso natural, diferentes investigaciones se han llevado a cabo con el objetivo no solo de identificar las diferentes especies que habitan el territorio nacional, sino también para evaluar la bioactividad que presentan las sustancias que producen estos organismos simbióticos. Es así, como el Grupo de Investigación en Estudios Biológicos y Fisicoquímicos de Líquenes Colombianos en colaboración con el Grupo de Investigación en Química Medicinal de la Universidad Nacional de Colombia, han enfocado sus esfuerzos al conocimiento de los constituyentes químicos y propiedades biológicas de las sustancias de origen liquénico, confirmando la obtención de moléculas con actividad antioxidante y/o fotoprotectora (Rojas, et al., 2015; Perico, et al., 2015; Leal, et al., 2018, Valencia, et al. 2020, *inter alia*),

además de otras actividades como efecto anti androgénico, fitotóxico, antienvjecimiento, entre otros (López-Ladino, et al., 2021; Nieves, et al., 2011; Núñez-Arango, et al., 2012).

En este trabajo, se evaluó la actividad antioxidante del extracto y de los metabolitos aislados de los HL *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia* cf. *didyma*, seleccionados a partir del tamizaje de la actividad antioxidante y fotoprotectora a nivel de extracto de 5 especies recolectadas en el páramo de Sumapaz, Colombia, que cumplieron con el criterio de inclusión de encontrarse directamente expuestas a la radiación solar, lo cual supone la presencia de metabolitos secundarios con características antioxidantes y/o fotoprotectoras. También se tuvo en cuenta que las especies a considerar fueran abundantes en dicho hábitat a fin de no depredar este recurso natural.

Estudios previos a nivel del extracto de *T. vermicularis* muestran sus propiedades antioxidantes (Luo, et al., 2006), anti-Alzheimer (Li, et al. 2017), y antiobesidad (Choi, et al., 2017). En cuanto a los compuestos aislados de esta especie, el thamnoliadépsido A mostró actividad citotóxica (Guo, et al., 2011) al igual que el ácido baeomycesico, que además presentó actividad antioxidante (Manojlović, et al., 2011). Así mismo, el  $\beta$ -sitosterol y la vermicularina (también llamada ácido descarboxithamnólico) aislados de esta especie, mostraron propiedades antienvjecimiento dérmico (Haiyuan, et al., 2019). Esta información constituye un importante precedente para profundizar en el estudio de esta especie, que en esta investigación incluye la actividad antioxidante, protectora celular y del ADN frente a radicales libres, así como también la actividad fotoprotectora. En el caso de *C. cf. didyma* no existen reportes específicos de sus posibles actividades biológicas. Por lo tanto, en el presente trabajo se busca profundizar en su estudio.

Así mismo, el presente trabajo pretendió establecer relaciones de estructura actividad para los compuestos aislados, con el fin de profundizar en las características estructurales que hacen que los compuestos liquénicos cambien su desempeño como antioxidantes y fotoprotectores, comprobando hipótesis expuestas por otros autores que experimentan con sustancias liquénicas u otro tipo compuestos polifenólicos.

Considerando que los HL constituyen una fuente prometedora original de moléculas bioactivas con aplicación terapéutica y cosmética, su bioprospección debe llevarse a cabo

de manera sostenible. Cabe mencionar que los HL son organismos extremófilos que tienen la capacidad de colonizar diferentes ecosistemas, y de resistir las condiciones adversas que se les presenten, pero a pesar de esto, estos organismos simbióticos tienen tasas de crecimiento lento comparadas con las plantas superiores, por lo que recolectarlos indiscriminadamente puede conllevar a su extinción (Legaz, et al., 2011). A fin de contribuir a la preservación de este recurso natural, se han evaluado diversas alternativas que permitirían la obtención sostenible de dichos metabolitos (Pereira, et al., 2020; Legaz, et al., 2011; Yoshimura, et al., 2002; Kono, et al., 2020) en la presente investigación se exploró la técnica biotecnológica de inmovilización celular (Pereira, et al., 2020) para la obtención de una de las sustancias objeto de estudio.

# 1. Objetivos

## 1.1 General

Obtener compuestos antioxidantes y/o fotoprotectores de los líquenes *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia* cf. *didyma*, y evaluar la viabilidad para la obtención biotecnológica de algunos de estos, con la finalidad de contribuir al descubrimiento de potenciales agentes dermatológicos de origen natural, al conocimiento de los constituyentes químicos y propiedades biológicas de estos organismos, y la explotación sostenible de este recurso natural.

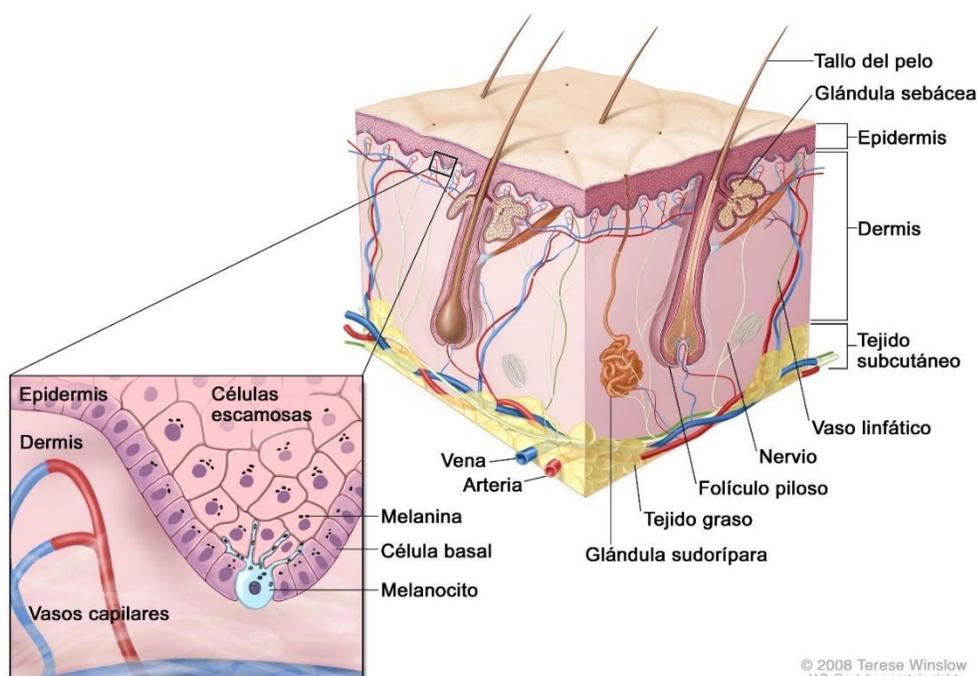
## 1.2 Específicos

1. Obtener al menos tres compuestos mayoritarios de los líquenes *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia* cf. *didyma*.
2. Establecer la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos y compuestos purificados de los líquenes *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia* cf. *didyma*, mediante un grupo de pruebas previamente seleccionadas para obtener información general del posible mecanismo de acción.
3. Determinar el potencial fotoprotector *in vitro* de los extractos y compuestos liquénicos aislados.
4. Evaluar la viabilidad del proceso de obtención de algunos metabolitos secundarios a partir de la especie que resulte más activa, a través de la técnica biotecnológica de inmovilización celular.
5. Establecer posibles correlaciones entre la actividad antioxidante y fotoprotectora encontradas.
6. Determinar de manera preliminar, la posible permeabilidad hacia el estrato córneo de la piel, de los principios activos obtenidos.

## 2. Marco teórico y estado del arte

### 2.1 La piel

La piel es un órgano complejo cuya principal función es ser una barrera para proteger al organismo de los factores externos físicos, químicos e inmunológicos, participando también en los mecanismos de termorregulación, excreción, absorción y síntesis de vitamina D (Bernat, 2021). Este órgano de amplia extensión está conformado por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 2-1). La epidermis a su vez está formada por el estrato córneo, lúcido, granuloso, espinoso y basal; además en ellas se encuentran los queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel y mastocitos.



**Figura 2-1:** Anatomía de la piel. (Adaptado de National Cancer Institute).

Subsecuentemente, se encuentra la dermis, constituida a su vez por dos capas: papilar (tejido conectivo laxo) y reticular (tejido conectivo denso). Esta alberga numerosos vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas, folículos pilosos, glándulas sudoríparas y sebáceas, además de fibroblastos que son células responsables de la producción de colágeno,

elastina y glucosaminoglicanos. Por último, se encuentra la hipodermis, o tejido subcutáneo, constituido principalmente por adipocitos y tejido conectivo laxo (Michalak, et al., 2021).

En términos funcionales, cada una de las capas de la piel tiene un papel definido y crítico para mantener la homeostasis de este órgano. La epidermis, al ser la capa más externa, es la que cumple la función de cubierta protectora, siendo la conexión directa con el entorno. En la dermis se encuentra gran parte de las estructuras que dan soporte al resto del órgano, tejido conectivo, irrigación sanguínea, glándulas sebáceas y sudoríparas, esenciales en el proceso de termorregulación, y células sensitivas que reciben información del entorno. La tercera capa o tejido subcutáneo, es considerada una capa móvil que absorbe las fuerzas tangenciales. El agua y la grasa de esta capa dan firmeza a la piel y amortiguan los golpes (Rähse, 2020).

## 2.2 Cáncer de piel

El cáncer de piel (CP) se encuentra dentro de los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial. Se estima que en el 2020 el número de casos nuevos alcanzó 1522708 y el número de muertes relacionadas con esta enfermedad fue de 120774, ubicándolo en el quinto lugar de prevalencia, respecto a otras variaciones de esta enfermedad más recurrentes como el cáncer de mama, pulmón, colorrectal y próstata (Organización Mundial de la Salud, 2021), aunque diversas organizaciones de salud declaran que las estadísticas del CP están subestimadas (Sung, et al., 2020).

El CP se clasifica en dos tipos: melanoma y no melanoma. El primero, se origina en las células responsables de producir la pigmentación (melanina) en la piel: los melanocitos (Figura 2-1), los cuales empiezan a crecer sin control. A este tipo de cáncer también se le conoce como melanoma maligno o melanoma cutáneo, y a pesar de que no es el más común, si es el más peligroso, puesto que tiene una alta probabilidad de propagarse si no es diagnosticado y tratado a tiempo (National Cancer Institute, 2021).

El CP no melanoma, se presenta en las células escamosas y en las células basales (Figura 2-1), conociéndose como carcinoma escamocelular y basocelular, respectivamente. Este

---

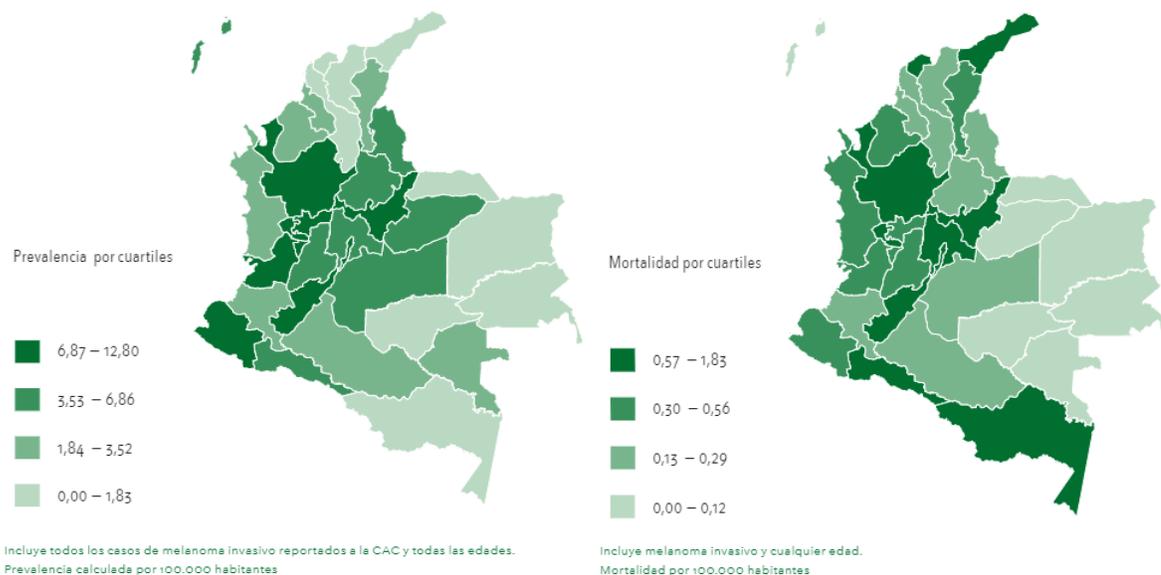
tipo de cáncer se reconoce como el más común y su pronóstico de recuperación es bueno, gran parte debido a que raras veces causa metástasis (Organización Mundial de la Salud, 2017).

El CP puede presentarse en cualquier parte del cuerpo, pero su incidencia es mayor en las áreas más expuestas a la RUV, como son el rostro, el cuello, las manos, los brazos y el cuero cabelludo (National Cancer Institute, 2021).

### **2.2.1 Cáncer de piel en Colombia**

Según las estadísticas del Instituto Nacional de Salud, el número de casos de CP en Colombia asciende de 53622 en 2015 a 128542 en 2019, reportándose anualmente aproximadamente 6000 nuevos casos, de los cuales 3326 corresponden a melanoma para el año 2019 y dicho valor sigue aumentando anualmente (Ministerio de Salud de Colombia, 2020). En Colombia, el melanoma está ubicado en el octavo lugar de frecuencia dentro de otros tipos de cáncer priorizados en el sistema de salud colombiano (Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, 2019). La población que tiene mayor riesgo es aquella con fototipos de piel blanca (I y II), en consecuencia, las personas con este tipo de piel deben aumentar las medidas de prevención (Liga Colombiana contra el Cáncer, 2020).

La Figura 2-2 representa la prevalencia y la mortalidad relacionadas al melanoma, mostrando por regiones los casos reportados por el sistema de salud. Así mismo, se ha descrito que en general en todas las regiones del país, la población más afectada son las personas mayores de 75 años (Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo 2019). Se presenta mayoritariamente carcinoma basocelular (52.7 %), escamocelular (22.6 %) y melanoma (16.1 %), este último mayoritariamente en la población femenina con incidencias entre 0.21 y 9.94 (distribuido por grupos etarios de 0 a 80 años o más) por cada 100000 mujeres; en hombres la incidencia varía entre 0.0 y 4.44 (distribuido por grupos etarios de 0 a 80 años o más) por cada 100000 hombres (Pozzobon, et al., 2018).



**Figura 2-2:** Prevalencia y mortalidad del melanoma en Colombia (2019) ajustada por edad según entidad territorial (Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, 2019).

Las cifras de CP son preocupantes, tanto así que el Ministerio de Salud Colombiano en el año 2020 hizo énfasis en la necesidad de reforzar la política de salud pública para garantizar el acceso al sistema de salud a los pacientes que padecen esta patología, reconociéndose como una prioridad en salud pública. Asimismo, el Ministerio de Salud reveló que los Departamentos y ciudades con mayor incidencia son aquellos con mayores índices de RUV como Bogotá, Boyacá, Valle del Cauca, Casanare, Quindío, Vaupés, Guainía y Amazonas (Ministerio de Salud de Colombia, 2020).

### 2.3 La exposición a la radiación solar como factor principal de estrés oxidativo a nivel dérmico

La radiación solar está comprendida en un 5 % de radiación ultravioleta (RUV) (100 – 400 nm) que se divide en radiación UVA (320 – 400 nm), UVB (290 – 320 nm) y UVC (100 – 280 nm), de las cuales solo las dos primeras logran traspasar la capa de ozono (Allegra, et al., 2020). La RUV es generada principalmente por el sol, pero algunas fuentes artificiales de luz también pueden producirla. La exposición prolongada a la RUV afecta principalmente a la piel, generando efectos negativos agudos y crónicos, que implican

---

lesiones mutagénicas, e indirectamente efectos genotóxicos mediados por el estrés oxidativo (EO) (Pelizzo, et al., 2012).

En la piel, la RUV es absorbida por moléculas de importancia biológica como la melanina, proteínas, lípidos y ADN (Wang, et al., 2019). La reacción entre el ADN y la RUV, modifica sus bases púricas y pirimidínicas causando ruptura entre la unión de genes pudiendo alterar parte del genoma (Pelizzo, et al., 2012; Mesa-Arango, et al., 2017). La radiación mayormente implicada en el daño al ADN es la UVB, cuya absorción genera foto-productos característicos, como los dímeros de ciclobutano pirimidina. Muchos de los daños al ADN son reversibles por mecanismos de reparación propios del organismo, pero desafortunadamente, algunas veces estos fallan, causando muerte celular o anomalía en la proliferación celular e incluso transformación maligna debida a que las ADN-polimerasas replican al ADN alterado (Allegra, et al., 2020).

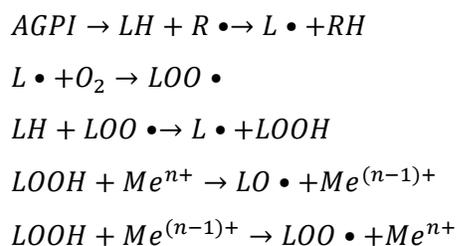
Adicionalmente, la RUV causa daño a las células normales mediante estrés oxidativo. Este término se refiere a la exacerbación de las EAR en un sistema biológico, el cual presenta una disminución en su capacidad endógena antioxidante para contrarrestar el ataque oxidativo, generando un desbalance que perjudica los tres componentes celulares mayoritarios: membranas celulares, proteínas y ADN (Pisoschi & Pop, 2015; Allegra, et al., 2020). La generación de EAR es dada normalmente por el metabolismo celular, pero además por elementos externos como la RUV, el tabaco, sustancias químicas, entre otros (Mesa-Arango, et al., 2017).

Entre las EAR, se encuentran los radicales libres (RL), especies que existen por su cuenta y poseen uno o más electrones no apareados (Halliwell, 2012). La formación de los RL básicamente sigue tres mecanismos:

- a) Por transferencia de un electrón a una molécula.
- b) Por pérdida de un hidrógeno de una molécula.
- c) Por rotura homolítica de un enlace covalente de cualquier molécula.

Los RL generan una serie de reacciones en cadena, en las cuales se transfiere un electrón o electrones no apareados a otras moléculas, repitiéndose innumerables veces esta reacción. La Figura 2-3 muestra a manera de ejemplo el proceso de peroxidación lipídica

de un ácido graso poliinsaturado (AGPI), mediado por el oxígeno. La RUV y la temperatura producen RL ( $R\cdot$ , y  $L\cdot$ ), destacando el lipoperóxido ( $LOO\cdot$ ). Estas EAR reaccionan con otras moléculas, produciendo más RL, resultando en una reacción en cadena.



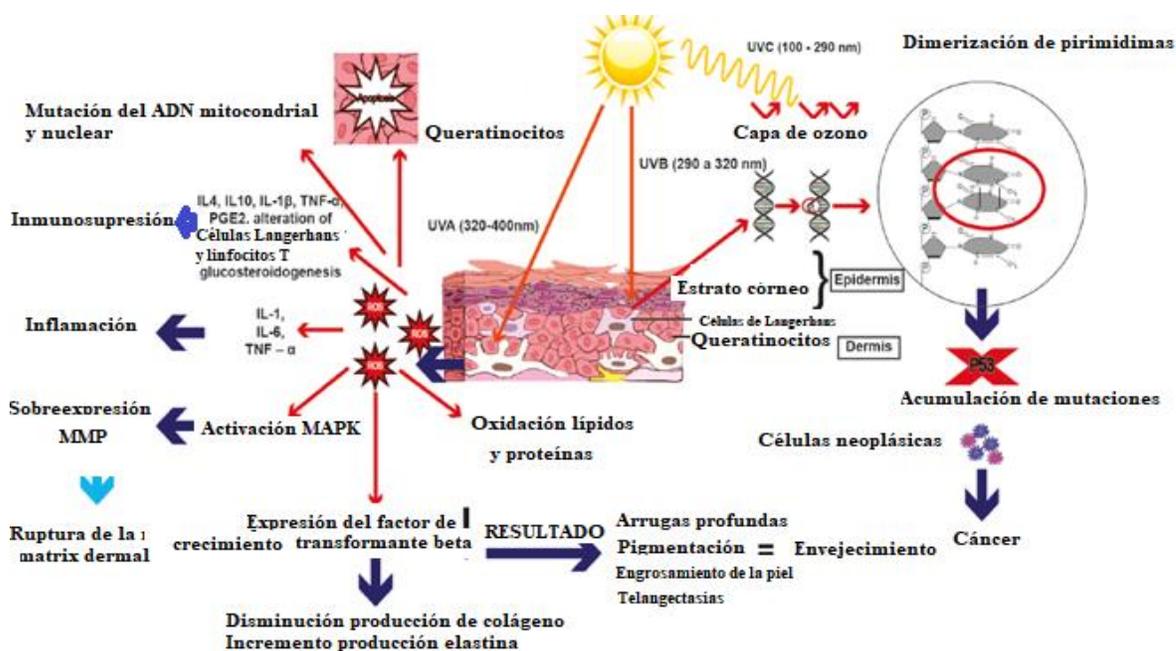
**Figura 2-3:** Ejemplo de reacción en cadena de radicales libres.

Entre las EAR se encuentran el radical libre hidroxilo ( $OH\cdot$ ), el cual es el más reactivo, así como también el radical hidropéroxido ( $HOO\cdot$ ) y el  $H_2O_2$  que son moléculas pequeñas no cargadas eléctricamente que atraviesan fácilmente las membranas celulares. El anión radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), y el radical peróxido ( $RO_2\cdot$ ) son otras EAR así como el ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) derivado de la reacción del  $H_2O_2$  con el  $Cl^-$  (Dominiczak, et al., 2007; Birben, et al., 2012).

Las EAR pueden generarse por la interacción de moléculas biológicas con la RUV. En las células de la piel este evento se presenta mayoritariamente después de una exposición prolongada al sol, causando importantes alteraciones celulares (Figura 2-4) (Mesa-Arango, et al., 2017). Cabe mencionar que dicho proceso ocurre en el melanosoma, que es un compartimento citoplasmático en donde se lleva a cabo el proceso de la melanogénesis (López & Victoria, 2019), seguido de la matriz extracelular en donde el proceso de estrés oxidativo se incrementa especialmente en los fibroblastos (Allegra, et al., 2020).

Entre las alteraciones moleculares que ocurren por interacción directa de RUV con las moléculas biológicas, se encuentran las mutaciones del ADN, como resultado de las modificaciones moleculares en las bases nitrogenadas como la guanina (8-hidroxi-2'-desoxiguanina) y la pirimidina (pirimidina oxidada). Se puede presentar, además, la carbonilación de proteínas de membrana, y la peroxidación lipídica que conlleva a cambios en la morfología y/o muerte celular por estimulación de la apoptosis de queratinocitos epidermales. Desde el punto de vista bioquímico, también se observa un incremento de

citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ; la activación de los receptores de factores de crecimiento epidermal, factores de activación plaquetaria, prostaglandinas, insulina, disminución de la expresión del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B que estimulan metaloproteinasas que llevan a cabo la rotura de la matriz extracelular, y la activación de enzimas como hialuronidasa, colagenasa y elastasa que alteran la producción y el mantenimiento del colágeno, la elastina y el ácido hialurónico (Araújo, et al., 2011; Pouillot, et al., 2011). Todo esto en conjunto conlleva a envejecimiento dérmico y cáncer de piel (Mesa-Arango, et al., 2017; Khare, et al., 2020).



**Figura 2-4:** Efectos en la piel por la exposición prolongada a la radiación ultravioleta (RUV) (Adaptado de Mesa-Arango, et al., 2017).

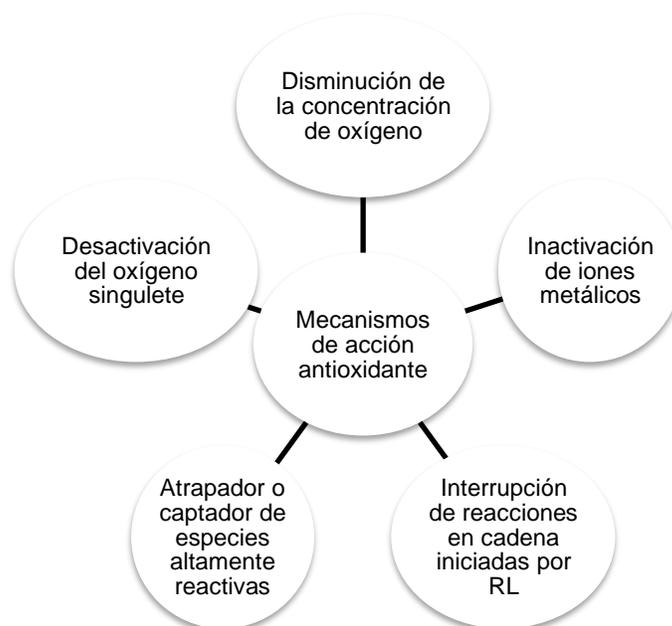
El daño causado por la exposición de la piel a la RUV es evidenciado por cambios sustanciales en la apariencia de esta que van desde la aparición de líneas de expresión, engrosamiento de la piel, hiperpigmentación que se puede manifestar como melasma, xerosis crónica, eritema, vasodilatación, e inflamación (Allegra, et al., 2020, Luze, et al., 2020).

A nivel clínico, los daños que se presentan en la dermis se manifiestan con alteraciones en la matriz extracelular. Los cambios incluyen acumulación y degeneración del material elástico y de sus glicosaminoglicanos; degeneración de las fibras de colágeno y cambios

en las proporciones de los diferentes tipos de colágeno, además de la aparición de lesiones cancerígenas (Wang, et al., 2019).

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

La RUV está directamente implicada en el desbalance oxidativo que se presenta en la piel; la exacerbación de EAR y su impacto negativo en este órgano, solo es neutralizado por un sistema antioxidante robusto capaz de reestablecer la homeostasis en un corto tiempo (Russo, et al., 2008). Un antioxidante, es una sustancia que en concentraciones mínimas es capaz de retardar o prevenir los procesos oxidativos inducidos por las EAR (Halliwell, 2012). Se han descrito diferentes mecanismos por los cuales los antioxidantes las contrarrestan (Figura 2-5) (Rajendran, et al., 2014, Pisoschi & Pop 2015).



**Figura 2-5:** Mecanismos de acción antioxidante

El proceso oxidativo que se presenta en la piel una vez se expone a la RUV, activa mecanismos de protección que involucran antioxidantes endógenos (AnED), que en ocasiones pueden ser insuficientes ante el aumento exagerado de EAR, razón por la cual la inclusión de antioxidantes exógenos (AnEX) juega un rol importante en el restablecimiento del equilibrio oxido-reductor (Pouillot, et al., 2011; Addor, 2017).

Los AnED hacen parte de los mecanismos de protección que tiene el organismo para defenderse ante el ataque de las EAR, en respuesta a un desbalance oxidativo recurrente a nivel celular, de tejidos o de órganos. Estos se dividen en enzimáticos como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, entre otros, y no-enzimáticos como, el glutatión, proteínas como ferritina, transferrina, albúmina, entre otros y antioxidantes de bajo peso molecular como el ácido úrico, la coenzima Q y el ácido lipoico (Pisoschi & Pop 2015). En la Tabla 2-1, se hace referencia a las reacciones específicas que catalizan las enzimas antioxidantes.

**Tabla 2-1:** Antioxidantes endógenos enzimáticos (Birben, et al., 2012).

Enzimas antioxidantes	
Nombre (acrónimo)	Reacción catalizada
Superóxido dismutasa (SOD)	$M^{(n+1)+} - SOD + O_2^{\bullet -} \rightarrow M^{n+} - SOD + O_2$ $M^{n+} - SOD + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+} - SOD + H_2O_2$
Catalasa (CAT)	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ $H_2O_2 + Fe(III) - catalasa \rightarrow H_2O + O = Fe(IV) - catalasa(.+)$ $H_2O_2 + O = Fe(IV) - catalasa(.+) \rightarrow H_2O + Fe(III) + O_2$
Glutatión (GSH) peroxidasa (GSPx)	$2GSH^* + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$
Tiorredoxina (TRX)	$Adenosina\ monofosfato + sulfito + tiorredoxina\ disulfuro$ $= 5' - adenilil\ sulfato + tiorredoxina$ $Adenosina\ 3', 5' - bisfosfato + sulfito + tiorredoxina\ disulfuro$ $= 3' - fosfoadenilil\ sulfato + tiorredoxina$
Peroxirredoxina (PRX)	$2 R' - SH + ROOH = R' - S - S - R' + ROH + H_2O$
Glutatión (GSH) transferasa (GST)	$RX + GSH = HX + R - S - GSH$

catalasa(.+) = enzima catalasa oxidada

La superóxido dismutasa (SOD), es una de las principales enzimas antioxidantes que forman parte del sistema de defensa en contra del daño oxidativo, transformando el radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno. Se han descubierto tres diferentes tipos de esta enzima, la SOD1, presente en el citosol, dependiente de cobre y zinc. La SOD2 presente en la matriz mitocondrial, y la SOD3 encontrada en la matriz extracelular; estas dos últimas dependientes de manganeso (Pisoschi & Pop, 2015).

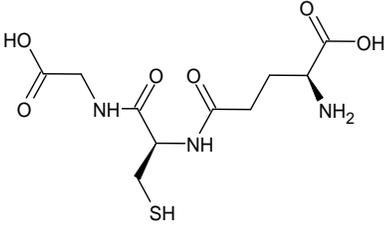
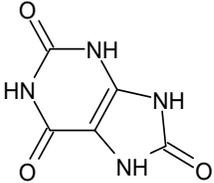
La catalasa (CAT) está involucrada en la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a agua, se encuentra en la mayoría de las células, órganos y tejidos. Hay otras enzimas antioxidantes involucradas en la inactivación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peróxidos orgánicos, como la peroxirredoxina, tiorredoxina

reductasa y el glutatión peroxidasa, transformándolo en agua, alcoholes y oxígeno (Pisoschi & Pop, 2015).

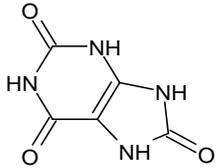
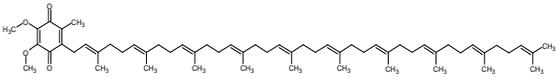
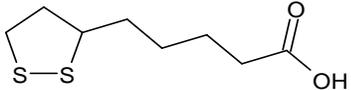
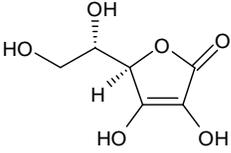
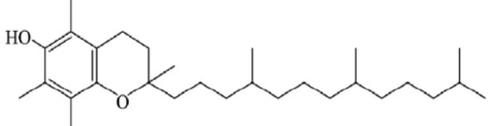
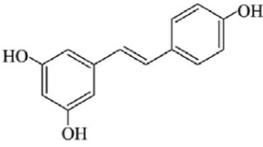
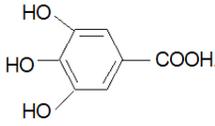
La glutatión peroxidasa (GTPx) tiene la función bioquímica de reducir hidroperóxidos lipídicos y peróxido de hidrógeno libre en alcoholes y agua, respectivamente. La principal diferencia de la GTPx respecto a la CAT, es su alta afinidad con los peróxidos, incluso cuando están presentes en bajas concentraciones (Rajendran, et al., 2014). Por su parte, la glutatión transferasa (GST), es responsable de inactivar metabolitos relacionados con procesos oxidativos como, aldehídos insaturados, epóxidos e hidroperóxidos. Esta enzima se encuentra a nivel citosólico, mitocondrial y en membrana microsomal, en donde posee un rol en el metabolismo de eicosanoides y del glutatión (GSH) (Birben, et al., 2012).

Otro tipo de antioxidantes son los que se clasifican como no enzimáticos que pueden ser endógenos o exógenos, en la Tabla 2-2 se presentan los compuestos más representativos y la descripción de su mecanismo de acción (Pouillot, et al., 2011; Pisoschi & Pop, 2015; Addor, 2017; Michalak, et al., 2021).

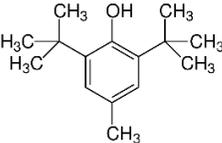
**Tabla 2-2:** Antioxidantes no enzimáticos endógenos y exógenos.

Antioxidantes endógenos		
Compuesto	Estructura	Mecanismo de acción
Glutatión (GSH)		Reduce peróxidos lipídicos y H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en H <sub>2</sub> O y O <sub>2</sub> por acción de GTPx. El glutatión disulfuro (GSSG) se reduce a GSH por la GSH reductasa empleando NADPH como donante de electrones. El GSH dona protones a los lípidos de la membrana y los protege del ataque de agentes oxidantes. Reconstituye las formas activas de la vitamina C y E. Evita que las células entren en procesos apoptóticos.
Ácido úrico		Elimina RL provenientes de la auto oxidación de la hemoglobina o de peróxidos generados por macrófagos. Elimina al oxígeno singlete y a los radicales peroxilo e hidroxilo.

**Tabla 2-2 (cont):** Antioxidantes no enzimáticos endógenos y exógenos.

<b>Antioxidantes endógenos</b>		
<b>Compuesto</b>	<b>Estructura</b>	<b>Mecanismo de acción</b>
Ácido úrico		Elimina RL provenientes de la autooxidación de la hemoglobina, o peróxidos generados por macrófagos. Elimina al oxígeno singlete y a los radicales peroxilo e hidroxilo.
Coenzima Q		Disminuye la producción de RL y regenera a la vitamina E. Disminuye el daño al ADN de los queratinocitos y la producción de metaloproteinasas en fibroblastos.
Ácido lipoico		Repara sistemas antioxidantes endógenos y neutraliza radicales libres.
<b>Antioxidantes exógenos</b>		
Ácido ascórbico (vitamina C)		Promueve la expresión de genes que codifican para enzimas antioxidantes y reparadoras del ADN. Protege a la epidermis de los agentes oxidantes producidos por la RUV. Regenera a la vitamina E.
$\alpha$ -tocoferol (vitamina E)		Elimina RL como lipoperóxidos. Reduce el daño al ADN provocado por las EAR, neutralizando al oxígeno singlete.
Resveratrol		Atrapa EAR actuando como quelante de metales y modula la actividad enzimática. Disminuye la peroxidación de lípidos. Previene el daño del ADN por acción de la RUV.
Ácido gálico		Inhibe la peroxidación de lípidos por la eliminación de EAR.

**Tabla 2-2 (cont):** Antioxidantes no enzimáticos endógenos y exógenos.

Antioxidantes exógenos		
Compuesto	Estructura	Mecanismo de acción
BHT (butilhidroxitolueno)		Inactiva peróxidos terminando con potenciales reacciones en cadena.

El sistema antioxidante endógeno en conjunto con los compuestos antioxidantes exógenos, son la principal estrategia de defensa de la piel ante el estrés oxidativo causado por la exposición a la RUV. Muchos de los mecanismos de acción antioxidante se complementan entre sí, permitiendo el restablecimiento de la homeostasis óxido reductora. Algunos compuestos o enzimas se encuentran en la primera línea de defensa, atrapando o eliminando radicales libres, así mismo algunos de ellos tienen función quelante, retirando metales del medio los cuales están involucrados en la formación de EAR. La siguiente línea de defensa está constituida por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que regeneran a otros antioxidantes, o incluso son capaces de estimular la expresión genética para la producción de enzimas antioxidantes. Por último, se encuentran aquellos compuestos que pueden reducir o incluso reparar el daño que sufren biomoléculas a causa de las EAR como el ADN (Baek & Lee, 2016; Addor, 2017).

El sistema antioxidante de la piel no se distribuye homogéneamente entre sus capas, la capacidad antioxidante epidermal es mucho mayor que en la dermis, la concentración de enzimas antioxidantes como la catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa es mayor en epidermis, así como la presencia mayoritaria de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos ( $\alpha$ -tocoferol, ubiquinol, glutatión, ácido ascórbico). En el estrato córneo, también se encuentran la vitamina E y C, distribuidos de manera diferente, encontrándose en mayor concentración en los niveles más profundos de este estrato (Addor, 2017).

En un órgano como la piel, una de las afecciones más preocupantes a causa de la exposición a la luz ultravioleta, es la aparición de cáncer de piel, melanómico y no melanómico. Una de las principales recomendaciones médicas, para prevenir e incluso tratar esta patología, es la inclusión de alimentos o suplementos ricos en antioxidantes, además del uso de productos tópicos que contengan este tipo de sustancias. Es así como

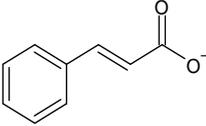
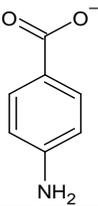
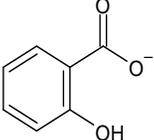
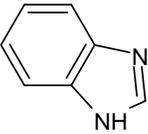
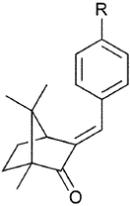
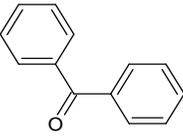
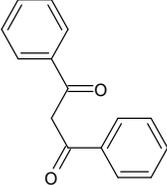
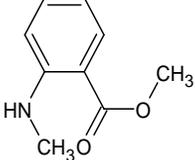
en diversos estudios, se ha encontrado una relación directa entre la reducción en la incidencia de células cancerígenas escamosas con la ingesta de alimentos ricos en antioxidantes como la luteína y la zeaxantina (Michalak, et al., 2021).

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

La RUV es uno de los factores externos que más perjudica a la piel y a pesar de que este órgano posee un sistema de protección endógeno frente a dicha radiación, que es liderado principalmente por la melanina actuando como filtro solar, este resulta insuficiente y paradójicamente exacerba el estrés oxidativo causado por RUV (Wondrak, 2016). Por ello, es necesario adoptar medidas tales como la de evitar la exposición prolongada a la luz solar o utilizar ropa que cubra las zonas expuestas del cuerpo como estrategia de protección. Asimismo, el uso de fotoprotectores se ha convertido en una herramienta primordial en el cuidado de la piel frente a la radiación solar (Wondrak, 2016; Luze, et al., 2020).

Los fotoprotectores son sustancias capaces de interactuar con la RUV por diferentes mecanismos, siendo su principal función evitar que esta radiación alcance las células. Según su mecanismo de acción, estos se clasifican en: a) pantallas o bloqueadores solares constituidos por compuestos inorgánicos que dispersan o reflejan la RUV al comportarse como micro espejos que impiden que la radiación siga su paso a través de la epidermis, y b) filtros solares o filtros químicos que son compuestos de naturaleza orgánica que absorben la RUV y después la emiten en forma de calor o luz (Saewan & Jimtaisong, 2015; Radice, et al., 2016). Algunos de estos compuestos además de la RUV, absorben parte de la radiación infrarroja que también está asociada al envejecimiento dérmico prematuro y cáncer de piel (Radice, et al., 2016). El listado de algunas clases estructurales de filtros y pantallas solares aprobados por la agencia que regula los alimentos y medicamentos en los Estados Unidos (FDA), se presenta en la Tabla 2-3 (Donglikar & Deore, 2016).

**Tabla 2-3:** Clases estructurales de filtros y pantallas solares aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA).

Clasificación	Ingrediente Fotoprotector		Rango de protección
	Clase estructural	Estructura molecular	
Filtros	Cinamatos		UVB
	<i>p</i> -aminobenzoatos		UVB
	Salicilatos		UVB
	Benzimidazoles		UVB
	Alcanforados		UVA II
	Benzofenonas		UVB y UVA II
	Dibenzoilmetanos		UVA I
	Antranilatos		UVA II

**Tabla 2-3 (cont.):** Clases estructurales de filtros y pantallas solares aprobados por la Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA).

Pantallas	Compuestos inorgánicos	Dióxido de Titanio	UVB y UVA II
		Óxido de Zinc	UVB, UVAI, y UVA II

Aunque hoy en día se cuenta con una gran diversidad de compuestos fotoprotectores, muchos de ellos no presentan el desempeño, seguridad y estabilidad adecuados. Por esta razón, la mayoría son formulados en combinación, incluyendo además antioxidantes que eviten su degradación. Un ejemplo típico que se presenta en formulaciones solares es la combinación que suele hacerse entre avobenzona (derivado del dibenzoilmetano; filtro UVA I), y el octocrileno (derivado del cinamato; filtro UVB), aumentando su desempeño en todo el rango del UV, además de la estabilidad del primer filtro. Sin embargo, la avobenzona tiende a degradarse dependiendo de la polaridad y proticidad del disolvente en su formulación, así como también por la sobreexposición a la luz. Sus productos de degradación están asociados a reacciones fotoalérgicas y fototóxicas (Afonso, et al., 2014).

Los compuestos orgánicos derivados de los cinamatos y del ácido *p*-amino benzoico, así como las benzofenonas, son otros de los compuestos relacionados con efectos adversos por su aplicación continua, entre los que se destacan la fotosensibilización, la disrupción endocrina y la inmunosupresión. Adicionalmente, se les ha asociado con reacciones fotoalérgicas y dermatitis de contacto (Radice, et al., 2016).

Es claro que en el campo de la fotoprotección aún hay mucho por explorar, la información recabada respecto a los filtros y pantallas solares que tenemos disponibles es cada vez más completa y aunque se han encontrado efectos adversos en algunos de ellos, su uso aún es válido según su análisis de riesgo beneficio. El objetivo de muchas investigaciones en el campo de la protección solar van orientadas hacia la búsqueda de nuevas y mejores alternativas de los compuestos que se han venido usando en productos fotoprotectores, pero no limitándose a ese objetivo, también ha sido foco de la atención científica el mejorar el perfil de seguridad y eficacia de las sustancias ya existentes, encontrando moléculas con un efecto potencializador de la eficacia y la seguridad de este tipo de productos, mejorando sus beneficios en términos de protección de la piel. Los compuestos de origen natural o incluso el empleo de extractos naturales han venido siendo usados en la

formulación de fotoprotectores, puesto que además de absorber la RUV, tienen propiedades antioxidantes importantes para evitar el daño de las EAR producidas por la RUV, con el beneficio adicional de estabilizar a los filtros solares en una formulación final (Buso, et al., 2017).

La aproximación de los investigadores en fotoprotección se ha vuelto multifactorial, en donde además enfocarse a estrategias que solo abarquen compuestos con un buen perfil de absorción de la RUV, se busca evitar o corregir todos los efectos nocivos que tiene la exposición a la radiación solar, incluyendo dentro de su espectro moléculas con actividad antioxidante, protectora del ADN, estimulantes de la expresión genética de enzimas antioxidantes, entre otras (Buso, et al., 2017; Luze, et al., 2020).

## 2.4 Hongos liquenizados

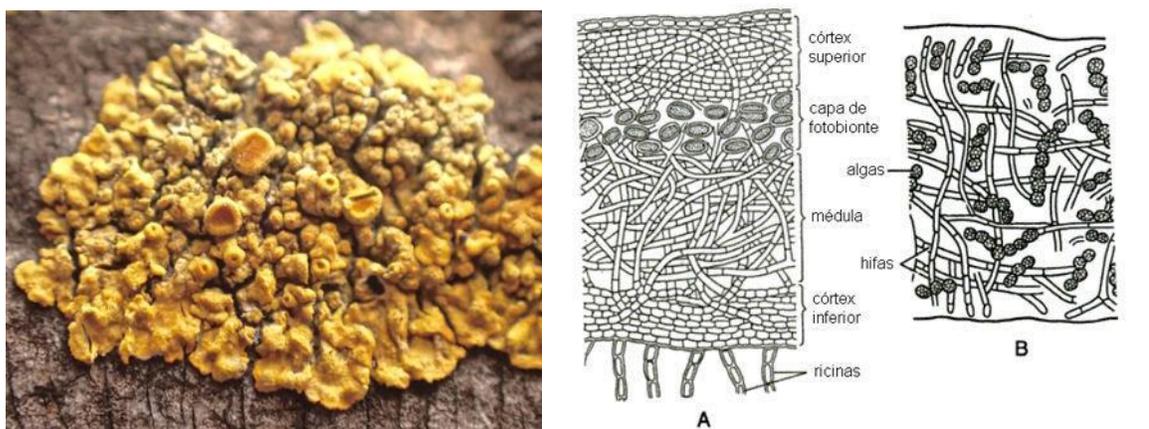
Un hongo liquenizado (HL) o líquen es un organismo resultante de la asociación simbiótica entre un micobionte (parte fúngica) y un fotobionte (un alga verde y/o cianobacteria) (Calcott, et al., 2018). En algunos casos también pueden hacer parte de estos organismos, las levaduras (Spribille, et al., 2016). En esta asociación, el fotobionte al ser un organismo autótrofo, biosintetiza los carbohidratos que el hongo después consume como alimento. El hongo por su parte, biosintetiza metabolitos secundarios a partir de la fuente de carbono que le proporciona el fotobionte y le brinda protección para sobrevivir y adaptarse a las condiciones del medio (De Valencia 2002; Nash 2008).

De las 20000 especies descritas de HL a nivel mundial, la mayoría presenta como fotobionte un alga, solo el 10 % están asociadas con una cianobacteria y entre el 2 y el 4 % pueden asociarse con ambos tipos de fotótrofos (Grimm, et al., 2021). Las algas que frecuentemente se encuentran en la asociación líquénica son del género *Trebouxia*, *Trentepohlia* y *Nostoc*. La diversidad del compañero fotosintético cambia de acuerdo con el tipo de ecosistema en el que se encuentren, y del sustrato que tienen a disposición (Goga, et al., 2020).

En el caso del micobionte, éste generalmente se trata de un hongo del filo o división *Ascomycota*, aunque también se encuentran *Basidiomycota* y anamórficos. El micobionte

es la parte dominante en la simbiosis líquénica, en donde se pueden encontrar las hifas del hongo estrechamente compenetradas al fotobionte.

La morfología líquénica está comprendida por un cuerpo llamado talo, que en un corte transversal consiste en un córtex superior de naturaleza fúngica, una capa fotosintética, la médula, y el córtex inferior para los talos heterómeros (Figura 2-6). Algunas especies desarrollan un cordón central cuya función es de soporte, además de variaciones en el espesor de cada una de sus capas (Goga, et al., 2020). De acuerdo con la distribución morfológica del fotobionte y micobionte en el talo, también se han descrito talos de tipo homómero, en donde las células algales y las hifas se encuentran uniformemente distribuidas a lo largo de su espesor (Pankratov, et al., 2017) (Figura 2-6).



**Figura 2-6:** Hongo liquenizado (GBIF 2021) con esquema representativo de sus partes. A) talo heterómero, B) talo homómero (Adaptado de Asturnatura, líquenes y micorrizas, 2021).

La naturaleza simbiótica de estos organismos es la principal clave para su supervivencia en condiciones ambientales difíciles. Frecuentemente, los HL son colonizadores primarios en un hábitat recién formado, se han encontrado en ecosistemas de dunas, y dominando hábitats de alta montaña y regiones polares. Por lo tanto, no es raro encontrar estos especímenes prosperando en todos los continentes, incluso aquellos dominados por plantas superiores. La fotosíntesis realizada por los HL constituye una parte crucial para la fijación de carbono en la tierra, y se estima que el 8 % de la biota terrestre está dominada por estos organismos (Sadowsky, et al., 2017).

Para el año 2000, se estimaba un número de especies liquénicas identificadas entre 13500 a 30000 en el mundo, en la actualidad se estima que ese número es mucho mayor debido a que en años recientes se ha incrementado la cantidad de HL identificados, por la creciente exploración de lugares remotos, un protocolo de exploración más cuidadoso y nuevas metodologías de secuenciación que se han venido implementando (Calcott, et al., 2018).

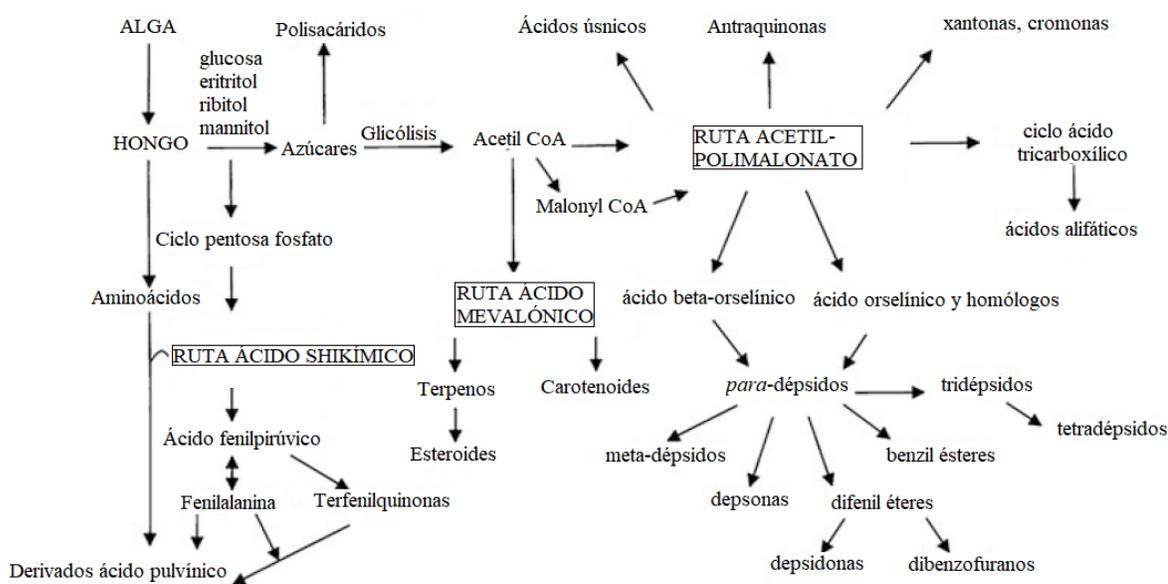
La riqueza liquenológica colombiana se estimaba aproximadamente en 3600 especies para el año 2006, de las cuales solo se han registrado a la fecha ca.1800 (Soto-Medina, et al., 2021). Las especies colombianas se encuentran distribuidas en 94 familias y 313 géneros, evidenciando la riqueza liquénica del país, siendo uno de los países más ricos en este recurso después de Brasil (Aguirre, 2006; Aguirre & Rangel 2008; Wirth, 2004; Moncada, et al., 2012).

La mayoría de los estudios sobre la diversidad liquénica colombiana se ha dado en las regiones Andina y la Amazonía (Soto-Medina, et al., 2021). En la región Andina se destaca el páramo de Sumapaz, un ecosistema de alta montaña (entre 3000 y 4300 m s.n.m.), restringido a la zona occidental de Sudamérica con mayor porcentaje de abundancia en Colombia que presenta una diversidad biológica única, incluyendo HL en gran abundancia. Su extensión alcanza un total de 333420 Ha, constituyéndose en el más grande del mundo. En este ecosistema, los HL crecen bajo condiciones ambientales bastante difíciles al estar constantemente expuestos a la radiación solar, a los cambios constantes de temperatura y humedad, pasando por temperaturas que van desde 0 hasta los 20 °C, alternándose momentos de sequía y de lluvia durante todo el año (Sierra, et al., 2020).

Bajo estas condiciones es de esperar que los HL biosinteticen sustancias que le permitan adaptarse a este medio, constituyéndose en una fuente prometedora de compuestos antioxidantes y fotoprotectores, actividades que han sido corroboradas en diferentes estudios (Valencia-Islas, et al., 2021; Rojas, et al., 2015; Perico-Franco, et al., 2015; Leal, et al., 2018; *inter alia*).

### 2.4.1 Metabolitos secundarios de los hongos liquenzados y sus propiedades biológicas

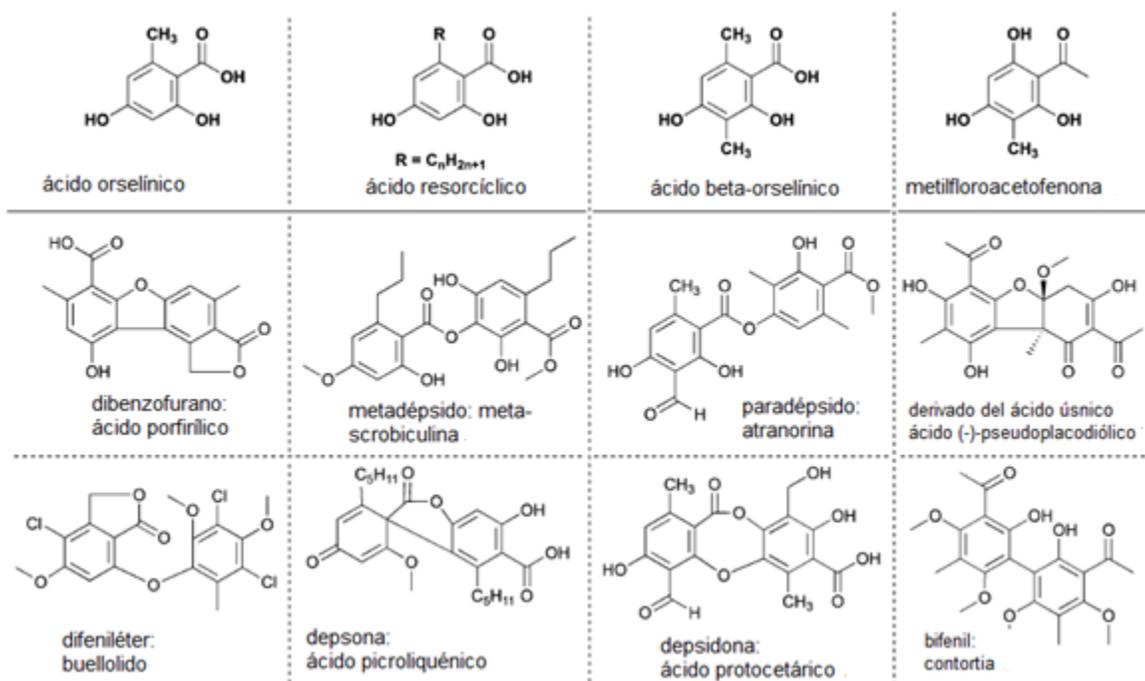
Los metabolitos de origen liquénico se dividen en primarios y secundarios. Los secundarios se relacionan con la capacidad del HL para colonizar y sobrevivir en diferentes ecosistemas y son biosintetizados esencialmente por el micobionte y excretados a través de sus hifas hacía la superficie de la hifa, en donde se depositan en su forma amorfa o cristalina (Ranković, 2015). Cabe mencionar, que muchos de estos metabolitos son únicos en su tipo y son exclusivos de estos organismos, denominándoseles sustancias liquénicas o liquenoquímicos (Goga, et al., 2020) que generalmente son biosintetizadas en gran cantidad por el HL (ca. 0.1 al 30 % del HL seco) siguiendo las rutas metabólicas del acetato-polimalonato, del ácido shikímico y del ácido mevalónico (Goga, et al., 2020) (Figura 2-7):



**Figura 2-7:** Biosíntesis de metabolitos secundarios de hongos liquenzados (Ranković, 2015).

La primera ruta biosintética es responsable de generar las moléculas más comunes de estos organismos: compuestos fenólicos mononucleares, ácidos alifáticos y sus ésteres; dépsidos, depsidonas, depsonas, dibenzofuranos y ácidos úsnicos y sus derivados, que al ser de carácter ácido, son denominados ácidos liquénicos. Estas sustancias resultan de suma importancia para la identificación y clasificación taxonómica de estos organismos porque muchas de éstas son exclusivas de la asociación simbiótica (Goga, et al., 2020). Este tipo de compuestos puede presentar tres patrones aromáticos diferentes: el orcinol, el  $\beta$ -orcinol y la metilfloroacetofenona que pueden unirse a través de un enlace éster, éter

o carbono, formando una gran diversidad de compuestos liquénicos. Algunos ejemplos se ilustran en la Figura 2-8, en donde debajo de cada patrón mono aromático se mencionan algunos de sus compuestos derivados (Calcott, et al., 2018). También se biosintetizan antraquinonas, cromonas, naftoquinonas, y xantonas por esta misma ruta (Huneck, et al., 1996; Ranković 2015).



**Figura 2-8:** Ejemplos de policétidos fenólicos de origen liquénico (Calcott, et al., 2018).

Las terfenilquinonas, ácido pulvínico y sus derivados; compuestos derivados de aminoácidos aromáticos, micosporinas y sus derivados, son obtenidos por la ruta del ácido shikímico mientras que los carotenoides, terpenos, esteroides, y sus derivados, son obtenidos a través de la vía del ácido mevalónico (Figura 2-7) (Nguyen, et al., 2013; Goga, et al., 2020). A la fecha se han aislado más de 1000 metabolitos secundarios a partir de estos organismos.

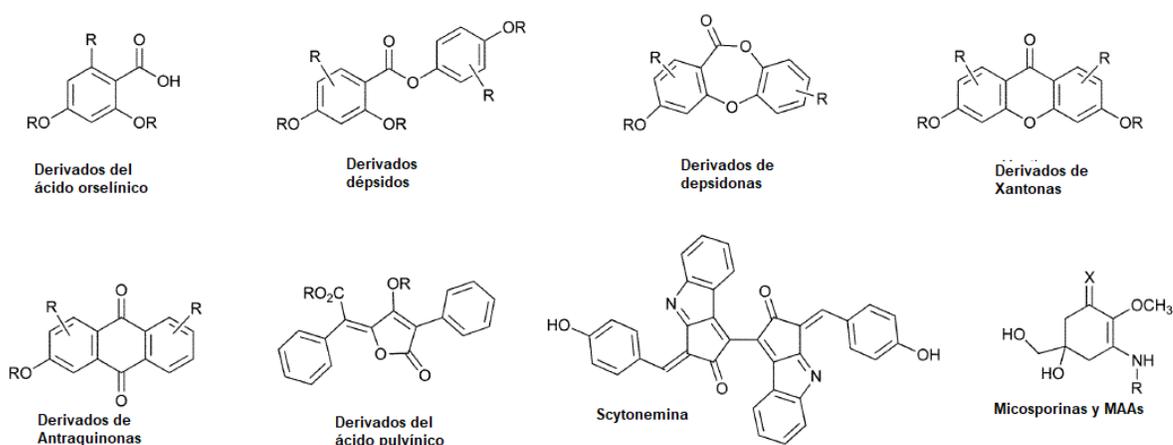
El estudio fitoquímico y farmacológico de los HL se ha fundamentado en la información etnomédica y etnobotánica de sus usos en diferentes comunidades a nivel mundial comprobando diversas actividades biológicas para las sustancias de origen liquénico entre las que destacan: antioxidante (Fernández-Moriano, et al., 2016; White, et al., 2014; Rojas,

et al., 2015; Perico, et al., 2015), fotoprotectora (Nguyen, et al., 2013, Valencia, et al., 2020), citotóxica y antineoplásica (Guo, et al., 2011; Mohammadi, et al., 2020), antimicrobiana (Bhattacharyya, et al., 2016), antidiabética (Thadhani, 2009), moduladora de la biosíntesis de andrógenos (López-Ladino, 2021), entre otras.

### **2.4.2 Actividad antioxidante y fotoprotectora de metabolitos secundarios de líquenes**

La determinación de la actividad antioxidante y fotoprotectora ha llamado la atención de muchos investigadores que trabajan con HL, debido a que estos organismos simbióticos tienen una alta capacidad de soportar condiciones de estrés ambiental provocado por la radiación UV, relacionada a su vez con procesos de estrés oxidativo. Los HL han logrado sobrevivir a este tipo de condiciones adoptando una serie de cambios morfológicos y fisiológicos (Shukla, et al., 2017) que incluyen la biosíntesis de liquenoquímicos, entre ellos de naturaleza fenólica que actúan como pantallas o filtros solares (Nguyen, et al., 2013), además de poseer actividad antioxidante (Fernández-Moriano, et al., 2016; White, et al., 2014). Estos compuestos, al ser los metabolitos secundarios mayoritarios en estos organismos, juegan un papel fundamental en la regulación de su crecimiento y desarrollo en ambientes extremos con condiciones climáticas desfavorables (Shukla, et al., 2017; Nguyen, et al., 2013; White, et al., 2014).

Los liquenoquímicos más comunes que han presentado actividad antioxidante y/o fotoprotectora son de naturaleza policétida aromática (dépsidos, depsidonas, depsonas, dibenzofuranos y cromonas) seguidos de los derivados del ácido shikímico (derivados del ácido pulvínico) y de las micosporinas (Figura 2-9) (Calcott, et al., 2018; Nguyen, et al., 2013).



**Figura 2-9:** Liquenoquímicos con actividad antioxidante y fotoprotectora. (Calcott, et al., 2018; Nguyen, et al., 2013).

Entre los liquenoquímicos de origen policétido, el ácido úsnico, la atranorina, el ácido difractáico, el ácido lecanórico, el ácido lobárico, el ácido estíctico, el ácido salazínico y los orselinatos, son los compuestos que han sido más estudiados y que han presentado dichas propiedades. A su vez, derivados de la ruta del ácido shikímico, las bixantonas, la calicina, y las micosporinas también destacan con estas propiedades (Nguyen, et al., 2013; White, et al., 2014). Estos compuestos ejercen su efecto antioxidante atrapando radicales libres, inhibiendo la peroxidación de lípidos, y activando el sistema antioxidante endógeno (White, et al., 2014). En cuanto a sus propiedades fotoprotectoras, los policétidos destacan por ser filtros que absorben en el UVB mientras que los derivados del ácido shikímico como las micosporinas presentan una fuerte absorción en el UVA (Nguyen, et al., 2013).

## 2.5 *Thamnolia vermicularis*

### 2.5.1 Taxonomía

Reino: Plantae

Phylum: Ascomycota

Clase: Lecanoromycetes

Orden: Pertusariales

Familia: Icmadophilaceae

Subfamilia: Ostropomycetidae

Género: *Thamnolia*

Epíteto específico: *vermicularis*

Especie: *Thamnolia vermicularis*

Autor: (Sw.) Schaer. em. Asah.

Determinador: Sipman, H.

*Thamnolia vermicularis*, presenta un talo erecto o decumbente, formando de vez en cuando mechones por ramificación desde la base a lo largo del pudiente decúbiteo, cilíndrico; puntas apuntadas color blanco o blanco crema y es de tamaño muy variable (1 a 2 mm de ancho pudiendo alcanzar hasta los 8 mm de ancho y 12 cm de largo) (Figura 2-10) (CNALH, 2021). En Colombia se encuentra distribuido en ecosistemas de alta montaña por ejemplo en el páramo de Sumapaz (Instituto de Ciencias Naturales, 2004).



**Figura 2-10:** *Thamnolia vermicularis*. (Fotografía de la autora).

### 2.5.2 Hábitat y distribución

*T. vermicularis*, se encuentra ampliamente distribuida en todos los continentes. Normalmente crece en ecosistemas de tundra o de alta montaña en altitudes aproximadas

a los 4000 m s.n.m. (Onuț-Brännström, et al., 2017). En la Figura 2-11 se muestra la distribución de este HL en el mundo.



**Figura 2-11:** Distribución mundial de *Thamnolia vermicularis* (CNALH, 2023). Los puntos en azul indican los lugares en donde se ha reportado la existencia de la especie.

### 2.5.3 Usos tradicionales y propiedades medicinales

Durante siglos, la medicina tradicional china ha usado a *Thamnolia* sp., bajo el nombre de “té de nieve”, en infusiones para el tratamiento del dolor de garganta, hipertensión, tos, fiebre, neurastenia y enfermedades psiquiátricas (Xiang, et al., 2013; Bi, et al., 2016; Olafsdottir, et al., 2003; Li, et al., 2017). Así mismo, diferentes comunidades en Nepal lo consideran sagrado, no sólo por sus propiedades medicinales, sino por una conexión con el mundo espiritual, ya que consideran que mantiene alejados a los espíritus demoníacos prevaleciendo la paz en el hogar. El polvo de *T. vermicularis* se mezcla con otros HL para hacer inciensos empleados en rituales, y los Sherpas de los himalayas lo emplean como antiséptico, para matar a los gusanos en el suero de leche (Devkota, et al., 2017).

Algunas de las propiedades medicinales derivadas del uso tradicional de *T. vermicularis* han sido comprobadas a nivel farmacológico, entre ellas, las antibióticas, antiinflamatorias, antipiréticas, antiproliferativas y citotóxicas (Guo, et al., 2011), antioxidantes (Luo, et al., 2006) y como posible tratamiento para el Alzheimer (Li, et al., 2017). Los compuestos que se han asociado con dichas actividades son el ácido thamnólico, el ácido barbático, el

ácido baeomicsécico y el ácido esquamático (Xiang, et al., 2013; Li, et al., 2017; Luo, et al., 2006; Lücking, et al., 2014). Asimismo, el dépsido vermicularina también llamado ácido descarboxithamnólico y el terpenoide  $\beta$ -sitosterol, aislados de esta especie, han mostrado efecto antienvjecimiento a nivel celular, estimulando la producción de proteínas y ácido hialurónico en co-cultivos de fibroblastos y queratinocitos. Estas sustancias también evitan la pérdida del colágeno tipo I, inhibiendo la producción de metaloproteinasas de matriz extracelular (Haiyuan, et al., 2019). Por su parte, los polisacáridos de *T. vermicularis* llamados thamnolanos han presentado actividad inmunomoduladora *in vitro* (Olafsdottir, et al., 2003).

## 2.5.4 Compuestos reportados

Los metabolitos que han sido reportados para esta especie se encuentran en la Tabla 2-4 (Xiang, et al., 2013; Li, et al., 2017; Luo, et al., 2006; Lücking, et al., 2014). Otros policétidos que se han reportado con menor frecuencia son: el ácido 3-metilevernico, la atranorina y los thamnoliadépsidos A y B (Xiang, et al., 2013; Guo, et al., 2011). También se han reportado a los polioles: D-arabitol y manitol (Jiang, et al., 2002; Castro et al., 2010) y polisacáridos como la  $\beta$ -D-galactofuranosa (Olafsdottir, et al., 2003) además de los terpenoides 5,8-epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergosta-6,22E-dien-3 $\beta$ -ol, 5,7 $\beta$ -epidioxi-5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -ergosta-6,9,22E-tien-3 $\beta$ -ol, 5 $\alpha$ -ergosta-7,22E-dien-3 $\beta$ -ol, ergosta-5,8,22E-trien-3 $\beta$ -ol y al ácido linoleico (Jiang, et al., 2002).

**Tabla 2-4:** Compuestos reportados para *T. vermicularis*

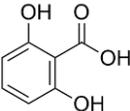
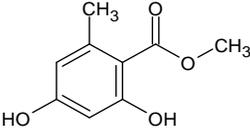
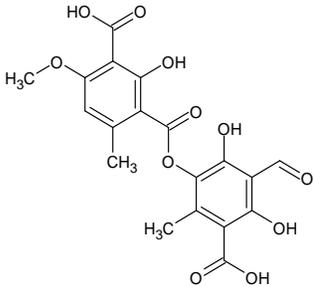
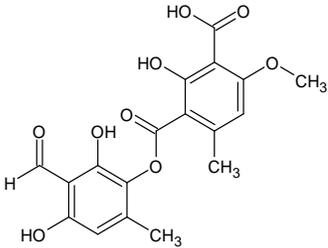
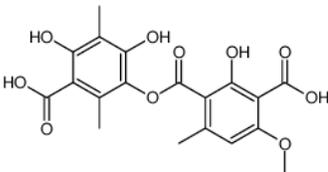
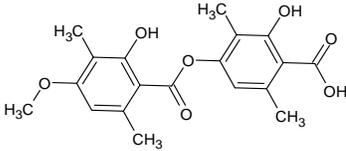
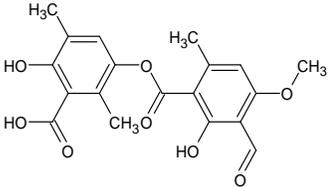
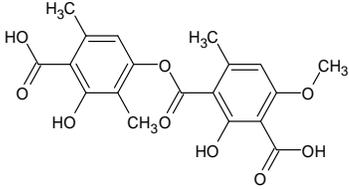
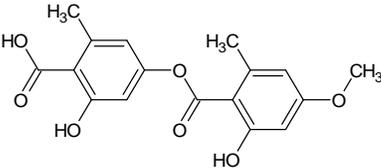
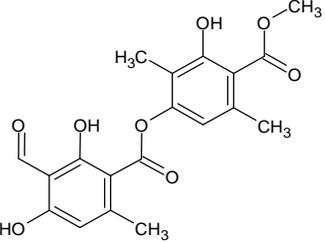
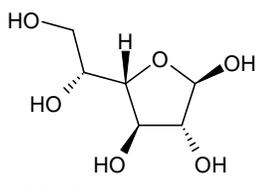
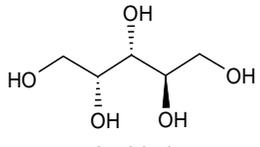
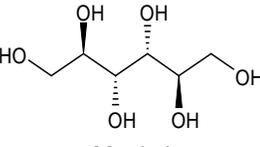
Categoría estructural / Compuesto	Referencia
Monoaromáticos	
 <p>ácido resorcílico</p>	(Lücking, et al., 2014)
 <p>orselinato de metilo</p>	

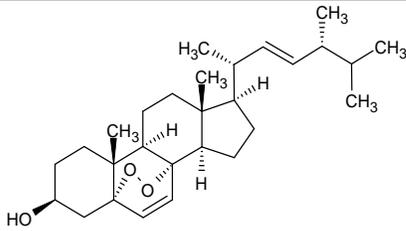
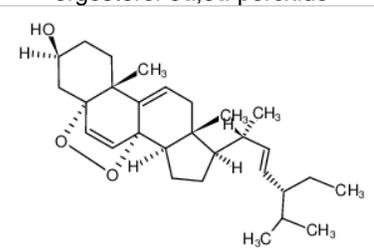
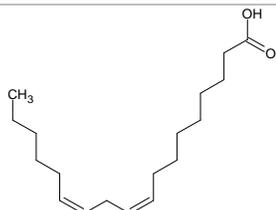
Tabla 2-4 (cont.): Compuestos reportados para *T. vermicularis*

Dépsidos	
 <p>ácido thamnólico</p>	(Xiang, et al., 2013)
 <p>ácido descarboxithamnólico (vermicularina)</p>	
 <p>ácido hipothamnólico</p>	
 <p>ácido barbático</p>	
 <p>ácido baemycesico</p>	

**Tabla 2-4 (cont.):** Compuestos reportados para *T. vermicularis*

Dépsidos	
 <p>ácido esquamático</p>	(Xiang, et al., 2013)
 <p>ácido 3-metilevernico</p>	
 <p>Atranorina</p>	
Monosacáridos	
 <p><math>\beta</math>-D-Galactofuranose</p>	(Jiang, et al., 2002; Castro, et al., 2010; Guo, et al., 2011)
 <p>Arabitol</p>	
 <p>Manitol</p>	

**Tabla 2-4 (cont.):** Compuestos reportados para *T. vermicularis*

Terpenoide	
 <p>ergosterol-5<math>\alpha</math>,8<math>\alpha</math>-peróxido</p>	(Jiang, et al., 2002)
 <p>5,8-epidioxi-5<math>\alpha</math>,8<math>\alpha</math>-ergosta-6,22E-dien-3<math>\beta</math>-ol</p>	
Ácidos grasos	
 <p>Ácido linoléico</p>	(Jiang, et al., 2002)

## 2.6 *Cladonia* cf. *didyma*

### 2.6.1 Taxonomía

Reino: Plantae

Phylum: Ascomycota

Clase: Lecanoromycetes

Orden: Lecanorales

Familia: Cladoniaceae

Subfamilia: Lecanoromycetidae

Género: *Cladonia*

Epíteto específico: *didyma*

Especie: *Cladonia* cf. *didyma*

Autor: (Fée) Vain.

*Cladonia cf. didyma* es una especie de líquen del orden Lecanorales, la cual presenta un talo primario escamuloso, persistente; escámulas (1 - 2 x 1 - 1.5 mm), de crenadas a irregularmente crenadas a lobuladas-lacinadas, esorediadas, con la cara superior brillante. Apotecios bastante comunes (4 - 5 mm de ancho), ascosporas rojas fusiformes (10 - 13 x 5 µm). Picnidios comunes, turbinados, con tallos cortos, con conidios de gelatina roja: falciformes (5 - 7 x 1 µm). Se encuentra generalmente sobre el suelo y sobre rocas (Figura 2-12) (Ohio Moss and Lichen Association, 2021).



**Figura 2-12:** *Cladonia cf. didyma* (Fotografía de la autora).

## 2.6.2 Hábitat y distribución

*Cladonia cf. didyma* se ha reportado en todos los continentes (Teuvo, et al., 2016; Fraga Júnior, et al., 2017). En la Figura 2-13 se representa su distribución mundial. En Colombia, se ubica principalmente en los Departamentos de Boyacá y Cundinamarca (Bernal, et al., 2016).



**Figura 2-13:** Distribución mundial de *Cladonia didyma* (CNALH, 2023). Los puntos en color anaranjado indican los lugares en donde se ha reportado la existencia de la especie.

### 2.6.3 Usos tradicionales y propiedades medicinales

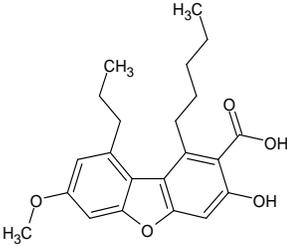
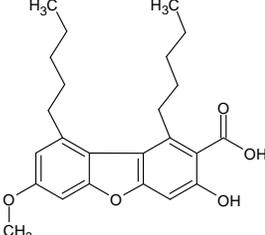
*Cladonia* cf. *didyma* no ha sido reportada en estudios etnomédicos ni etnobotánicos, sin embargo, los HL de este género han sido empleados en la medicina tradicional, especialmente para el tratamiento de enfermedades respiratorias (Coskun, et al., 2015; de Barros Alves, et al., 2014).

Entre las actividades farmacológicamente comprobadas para diferentes especies del género *Cladonia* se encuentran: protector gástrico, citoprotector, inmunoestimulador, antimicrobiano, antiinflamatorio, antipirético, anticancerígeno, y antioxidante (White, et al., 2014; de Barros Alves, et al., 2014).

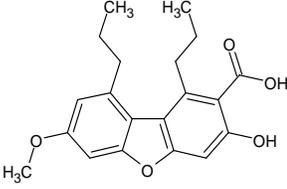
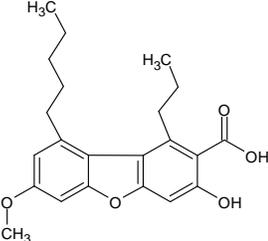
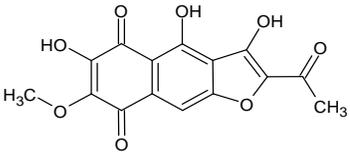
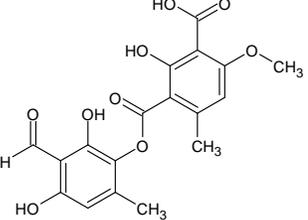
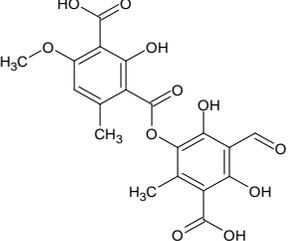
### 2.6.4 Compuestos reportados

Los compuestos reportados para *Cladonia* cf. *didyma* se encuentran en la Tabla 2-5.

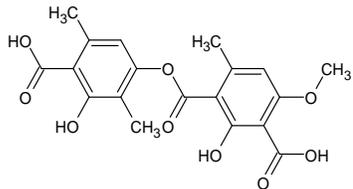
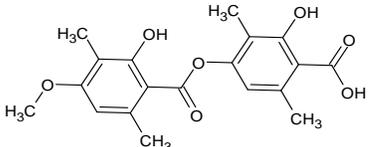
**Tabla 2-5:** Compuestos reportados para *Cladonia* cf. *didyma*.

Categoría estructural / Compuesto	Referencia
Difenil éteres	
 <p style="text-align: center;">ácido didymico</p>	(Fraga Júnior, et al., 2017)
 <p style="text-align: center;">ácido condidymico</p>	

**Tabla 2-5 (cont.):** Compuestos reportados para *Cladonia cf. didyma*.

Categoría estructural / Compuesto	Referencia
Difenil éteres	
 <p style="text-align: center;">ácido subdidymico</p>	(Chester, et al., 1986)
 <p style="text-align: center;">ácido isodidymico</p>	
Quinona	
 <p style="text-align: center;">ácido rhodocladónico</p>	(Fraga Júnior, et al., 2017)
Dépsidos	
 <p style="text-align: center;">ácido descarboxithamnónico (vermicularina)</p>	(Fraga Júnior, et al., 2017)
 <p style="text-align: center;">ácido thamnónico</p>	

**Tabla 2-5 (cont.):** Compuestos reportados para *Cladonia* cf. *didyma*.

Categoría estructural / Compuesto	Referencia
Dépsidos	
 <p>ácido esquamático</p>	(Fraga Júnior, et al., 2017)
 <p>ácido barbático</p>	

## 2.7 Producción biotecnológica de metabolitos de hongos liquenizados

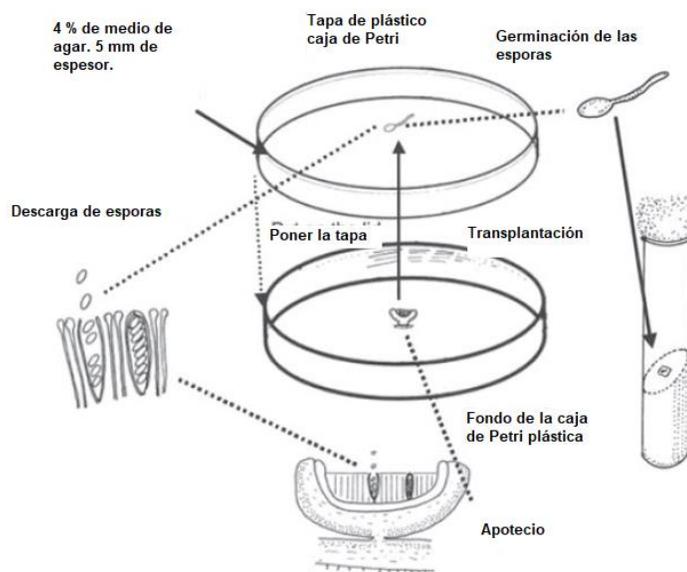
Debido a la amplia gama de actividades biológicas que exhiben los HL, y su potencial aplicación comercial, es necesario la exploración de alternativas de bioproducción de sustancias líquénicas, que no involucren la extracción de grandes cantidades de talos líquénicos, poniendo estos organismos en peligro de extinción por su lenta tasa de crecimiento. Dentro de las alternativas que se han evaluado está el uso de técnicas biotecnológicas que disminuyen la cantidad colectada de talos líquénicos (Pereira, et al., 2020) que comprenden las siguientes modalidades:

- a) Cultivo celular del hongo aposimbiótico o el cultivo directo de fragmentos del líquen.
- b) Resíntesis del talo líquénico.
- c) Inmovilización celular.

La primera modalidad consiste en el cultivo celular del hongo aposimbiótico o el cultivo directo de fragmentos del líquen (Yoshimura, et al., 2002; Verma & Behera, 2015). El fotobionte puede ser cultivado también, dependiendo de los objetivos fijados para la investigación, prefiriéndose el cultivo de la parte fúngica o del líquen completo cuando se

requiere la bioproducción de metabolitos secundarios. Cuando se opta sólo por el cultivo del hongo, éste inicia con la recolección de las esporas, que son germinadas en un medio nutritivo para formar micelio que a su vez es mantenido en un medio de cultivo semi líquido y es sometido a diferentes condiciones de elicitación (luz, pH, concentración de nutrientes, entre otras), con el fin de estimular el proceso de biosíntesis de sustancias. En la Figura 2-14 se ejemplifica la metodología para el aislamiento de esporas después de la descarga del apotecio del HL (Yoshimura, et al., 2002). Una de las condiciones de elicitación que se suelen ensayar en esta técnica es la suplementación del medio con diferentes tipos de azúcares para favorecer la biosíntesis de metabolitos secundarios, sin embargo, solo algunos HL responden positivamente a esta estrategia, acelerando la tasa de crecimiento del talo, sin embargo, no siempre se aumenta la bioproducción de compuestos liquénicos, en especial de aquellos derivados de la ruta de los policétidos y del ácido shikímico.

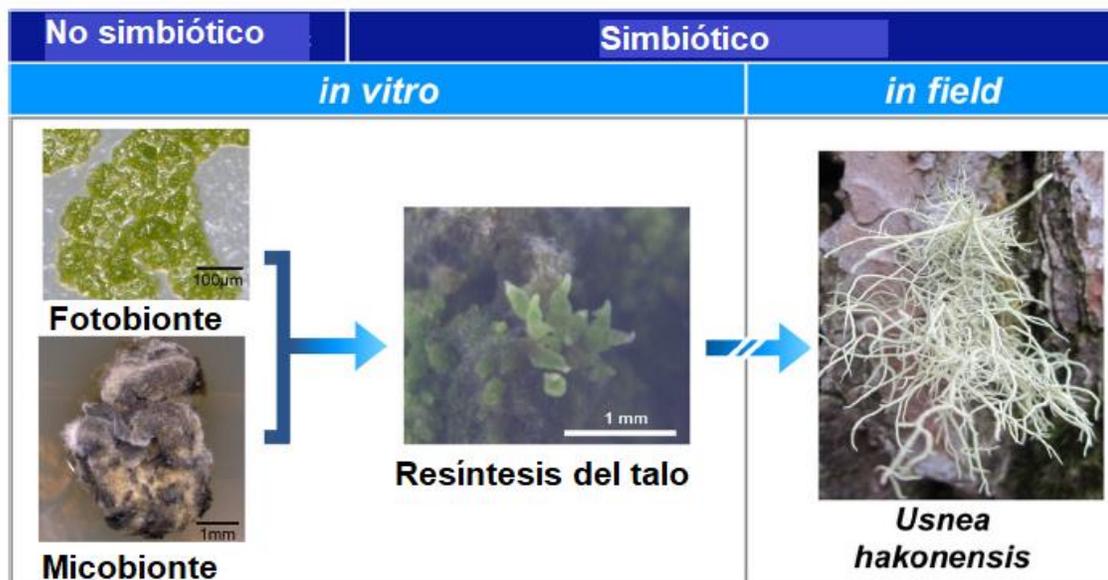
Dado que muchos factores pueden influir en la producción de metabolitos secundarios de HL en un cultivo celular, esta estrategia no resulta viable si el objetivo es tener una fuente alterna de liquenoquímicos, y aunque son bastantes las aproximaciones que se han logrado a largo de diversas investigaciones, aún resulta difícil asemejar las condiciones naturales bajo las cuales el HL produce ciertos metabolitos secundarios (Stocker-Wörgötter, 2008).



**Figura 2-14:** Esquema de aislamiento de esporas después de la descarga del apotecio para el cultivo del hongo aposimbótico (Yoshimura, et al., 2002).

La resíntesis del talo liquénico es una variación de la técnica de cultivo celular; esta consiste en el co-cultivo del micobionte y del fotobionte aislados y provenientes de cultivos independientes. Una vez se inicia la resíntesis del talo liquénico, este es mantenido en un medio de cultivo líquido suplementado con los nutrientes necesarios para mantener y dar soporte al proceso de simbiogénesis permitiendo hacer seguimiento a los diferentes estadios de liquenización: pre-contacto, contacto, envolvimiento de las células de algas, incorporación de ambos simbiontes en una matriz común (formación del pre-talo), y diferenciación del talo (Figura 2-15) (Kono, et al., 2020). La resíntesis del talo más allá de emplearse como un método de obtención de sustancias liquénicas resulta más valiosa en cuanto a la información que proporciona respecto a los genes involucrados en el desarrollo y estabilización de la interacción simbiótica (Kono, et al., 2020).

Cabe mencionar que las técnicas de cultivo celular y resíntesis del talo no son alternativas viables para la bioproducción de sustancias liquénicas, ya que además de ser costosas, requieren de mucha estandarización (Pereira, et al., 2020). En este sentido, la técnica de inmovilización celular resulta más conveniente para la bioproducción de liquenoquímicos al ser más sencilla y permitir la obtención de mejores rendimientos de compuestos.

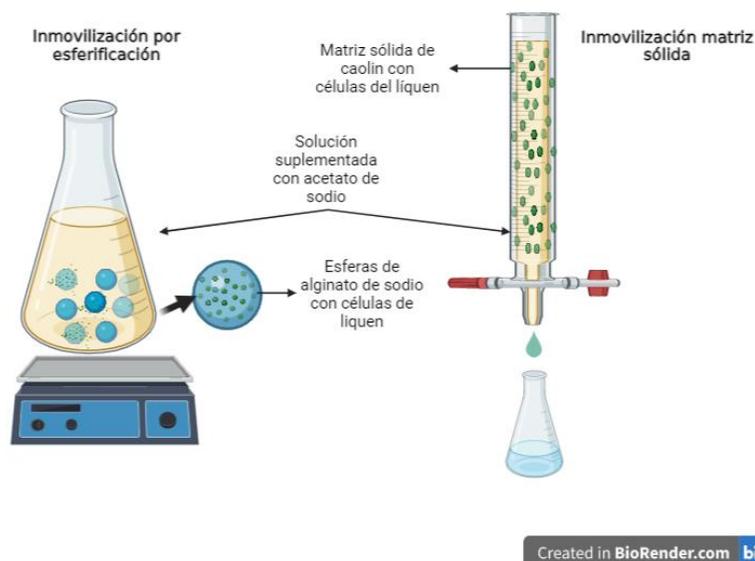


**Figura 2-15:** Ejemplo de la resíntesis del talo liquénico de *Usnea hakonensis*. Izquierda: fotobionte y micobionte aislados, centro: resíntesis del talo comparado con un individuo liquénico encontrado en la naturaleza (derecha). (Kono, et al., 2020).

La técnica de inmovilización celular, como su nombre lo indica, consiste en la inmovilización de células o fragmentos del talo liquénico en una matriz sólida o semisólida inerte, a través de la cual pasa una solución suplementada con un compuesto precursor, generalmente acetato de sodio, que es un precursor de la ruta de los policétidos, la cual es una de las rutas metabólicas preferentes en el liquen, mediada principalmente por el estrés ambiental en donde estos organismos crecen (Pereira, et al., 2020). El uso de acetato de sodio como precursor y única fuente de carbono tiene como propósito general la sustitución inicial de la molécula acetil CoA, precursor original tanto de la ruta de los policétidos como de la ruta de los terpenoides, una manera de estimular al liquen para que active preferentemente la primera ruta, es la activación de las enzimas involucradas en ella, las policétido sintasas (PKSs) que son una familia de complejos enzimáticos que producen los policétidos (dépsidos, dibenzofuranos, depsidonas, entre otros), a través de la elicitación con luz visible, UV, pH, diversos tipos de iones metálicos, entre otros, estos factores simulan el estrés ambiental que tienen en su habitat natural, activando mecanismos de defensa entre ellos la bioproducción de los compuestos liquenoquímicos de interés (Rao & Ravishankar, 2002; Legaz, et al., 2011).

La técnica de inmovilización celular puede presentar dos variaciones (Figura 2-16) según el tipo de matriz que se emplee, una de ellas emplea una matriz sólida que generalmente

es caolín, en el cual es mantenido el HL. En la segunda, se emplea alginato de calcio como matriz de inmovilización, formando esferas semisólidas de este polímero con fragmentos del HL en su interior. Tanto en la matriz de caolín, como en las esferas de alginato de calcio se tiene que asegurar el paso o contacto de la solución del precursor biosintético para que se dé la bioproducción de liquenoquímicos (Bucke & Brown, 1983; Chibata & Wingard, 1983; Mosbach, 1964; Legaz, Vicente, & de Armas, 2011).



**Figura 2-16:** Tipos de inmovilización celular para la obtención de compuestos liquénicos.

El empleo de caolín como matriz de inmovilización ha resultado ser más eficiente en términos de bioproducción de compuestos liquénicos, de acuerdo con los resultados reportados por diferentes investigadores, puesto que esta matriz no presenta problemas al estar en contacto con el precursor de acetato de sodio a diferencia de la matriz de alginato de calcio, la cual al entrar en contacto con el precursor se presenta un intercambio iónico entre el calcio y el sodio desintegrando la esfera de inmovilización (Pereira, et al., 1995; Blanch, et al., 2001; Vicente, et al., 2003; Legaz, et al., 2011; Martins, et al., 2017), destacando también por su facilidad de ejecución, bajos costos, y robustez de los resultados. Es por ello, que en el presente trabajo se seleccionó la técnica de inmovilización celular empleando caolín como matriz.

A su vez, la técnica de inmovilización empleando caolín se ha trabajado con tres tipos diferentes de montaje, cuya variación está en la forma en la que el HL inmovilizado entra

---

en contacto con la solución del precursor biosintético. La primera variación consiste en un sistema fijo, donde la matriz de caolín con el HL embebido recibe una porción de solución de acetato de sodio y esta se deja en contacto durante un tiempo determinado (generalmente 24 h); después del cual la solución con los metabolitos secundarios bioproducidos es retirada y reemplazada por solución fresca. Estos pasos se repiten tantas veces se desee hacer seguimiento del proceso de bioproducción (desde semanas hasta meses) (Martins, et al., 2017).

En la segunda variación, tanto el HL inmovilizado como una porción de la solución del precursor se colocan en un sistema de movimiento rotatorio dejando durante un tiempo determinado (generalmente 24 h); después del cual la solución con los metabolitos secundarios bioproducidos es retirada y reemplazada por solución fresca. Estos pasos también se pueden repetir tantas veces se desee hacer seguimiento del proceso de bioproducción (Martins, et al., 2017).

La tercera variación es denominada sistema de flujo continuo, en el cual se deja pasar solución del precursor por goteo constante a través de la matriz que contiene el HL inmovilizado, y así mismo esta solución es colectada por goteo a la salida del sistema, entonces la principal diferencia con los otros montajes es que siempre hay solución fresca dentro del montaje y no hay saturación de ésta puesto que es recolectada continuamente. El sistema de flujo continuo ha demostrado ser el más eficiente en diversos ensayos de inmovilización de líquenes (Martins, et al., 2017), por lo que este fue el tipo de montaje elegido para la presente investigación.

Una de las condiciones que más tienen impacto en la bioproducción de metabolitos secundarios de líquenes por inmovilización celular, además de las mencionadas, es la concentración del precursor de acetato de sodio, puesto que se ha encontrado una correlación directa entre esta condición y el rendimiento de bioproducción, es así como se suelen ensayar diferentes concentraciones de solución de acetato, entre las más empleadas están 0.1, 1 y 10 mM (Pereira, et al., 1995; Blanch, et al., 2001; Vicente, et al., 2003). Los resultados obtenidos para los diferentes tipos de líquenes inmovilizados no siempre son dependientes de la concentración, así lo demuestran los reportes publicados con diferentes especies, con las cuales se obtienen mayores rendimientos con las concentraciones de acetato más bajas (Legaz, et al., 2011; Martins, et al., 2017). Por lo tanto, es necesario realizar los ensayos correspondientes para cada especie de HL que

se inmovilice, encontrando así las condiciones óptimas para la bioproducción de liquenoquímicos.

### 3. Hipótesis

Dadas las condiciones ambientales propias del páramo de Sumapaz, ecosistema de alta montaña único en el mundo que presenta condiciones ambientales extremas en particular de alta radiación solar, donde los líquenes *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia cf. didyma*, crecen directamente expuestos a ésta, en conjunto con los resultados preliminares de la actividad antioxidante y fotoprotectora de sus extractos, se constituyen en indicadores adecuados para considerarlos como una fuente natural original de sustancias con dichas actividades.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1 Lugares de realización**

El Laboratorio 319 del Departamento de Farmacia fue el lugar en donde se llevaron a cabo los estudios fitoquímicos de los hongos liquenizados. Los ensayos de fotoprotección, actividad antioxidante y estudios biotecnológicos se realizaron en el Laboratorio 126 del Departamento de Química – Universidad Nacional de Colombia. Los ensayos de citoprotección y protección del ADN frente a estrés oxidativo se llevaron a cabo en el Laboratorio 323 del Edificio F1 de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **4.2 Selección de las especies objeto de estudio**

#### **4.2.1 Recolección**

Las especies de líquenes colombianos estudiadas en este trabajo (Tabla 4-1) fueron recolectadas en el Parque Nacional Natural Sumapaz (localidad 20 del Municipio de Bogotá, Colombia) siguiendo las directrices técnicas del Otrosí No. 4 al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 de 2016 (suscrito ante el Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible y la Universidad Nacional de Colombia) que ampara al proyecto: “Bioprospección de líquenes del Páramo de Sumapaz, Colombia como fuente original de sustancias duales con actividad antioxidante y fotoprotectora para la prevención de problemas dérmicos asociados a la radiación solar.” Cabe mencionar que estas especies se encontraban directamente expuestas a la radiación solar en el páramo de Sumapaz.

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

Especie	<i>Thamnolia vermicularis</i>	<i>Cladonia cf. didyma</i>	<i>Lobariella sipmanii</i>	<i>Everniastrum cirrhatum</i>	<i>Peltigera nepolydactyla</i>
Lugar	Parque Nacional Natural Sumapaz. Localidad 20 Sumapaz, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, Colombia.				
Coordenadas geográficas	04° 17.845' N; 074° 12.659' O	04° 17.845' N; 074° 12.659' O	04° 07.899' N; 074° 14.685' O	04° 07.574' N; 074° 14.801' O	04° 09.233' N; 074° 14.353' O
Altitud (m s.n.m)	3754	3754	3842	3832	3700
Temperatura ambiental promedio (°C)	2 – 8				
Sustrato	Rocas y musgo	Suelo y musgo	Suelo y musgo	Suelo y musgo	Suelo y musgo
Vegetación asociada	Musgos, hepáticas y plantas superiores				
Recolectores	José L. Rojas y Norma A. Valencia				
No. COL	609186	609187	609185	609190	609191

#### 4.2.2 Extracción en pequeña escala

El material recolectado se humedeció con agua destilada y se limpió manualmente. Acto seguido, se secó en una estufa de aire circulante a una temperatura ca. 45 °C (5 días). El HL seco, fue fragmentado en molino de discos hasta obtener un polvo fino.

El material líquénico (*Cladonia cf. didyma* (3 g), *Lobariella sipmanii* (2 g), *Thamnolia vermicularis* (3 g), *Everniastrum cirrhatum* (2 g), y *Peltigera nepolydactyla* (2 g)), fue extraído con acetona empleando Soxhlet a presión reducida por 4 horas a una temperatura de 40 °C. Los extractos obtenidos fueron filtrados y concentrados al vacío obteniéndose los extractos secos.

#### 4.2.3 Evaluación preliminar de la actividad antioxidante y fotoprotectora de los extractos

Los extractos secos se sometieron a evaluación de su actividad antioxidante cuantificando el poder captador de radicales libres en el modelo del radical DPPH• (Brand-Williams, et al., 1995) tal y como se describe en la sección 4.4.2.1. Asimismo, se les evaluó su actividad fotoprotectora determinando el Factor de Protección Solar (FPS) *in vitro* (Mansur, et al., 1986) tal y como se describe en la sección 4.4.3.1.

## 4.3 Estudio químico de las especies seleccionadas

### 4.3.1 Procedimientos experimentales generales

Los reactivos empleados fueron grado analítico: ácido acético (AcOH) (99.0 %; Mallinckrodt), ácido fórmico (HCOOH) (99.0 %), bicarbonato de sodio (99.0 %), cloroformo (CHCl<sub>3</sub>, 99.0 %), dioxano (99.2 %), metanol (MeOH, 99.5 %; Merck); acetato de etilo (AcOEt, 99.5 %), éter etílico (Et<sub>2</sub>O) (96.0 %; PanReac), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 99.0 %), *n*-hexano (*n*-Hex, 95.0 %), tolueno (Tol, 99.5 %; Mallinckrodt), acetona (Me<sub>2</sub>CO, 99.0 %), etanol (EtOH, 96.0 %; PanReac), acetonitrilo (AcN, 99.5 %; Mallinckrodt).

La cromatografía en columna abierta (CC) fue realizada sobre gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm, Merck) o en Sephadex<sup>®</sup> LH-20 (Sigma). La cromatografía en capa delgada analítica (CCD) se realizó sobre cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice (Si gel 60 F<sub>254</sub>, Merck). La cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) se llevó a cabo en cromatoplasmas de vidrio (SiliaPlate<sup>™</sup>, 1000 μm, 20 x 20 cm, F<sub>254</sub>, Silyce<sup>™</sup>). El fraccionamiento y separación se verificó por CCD uní y bidimensional, en al menos 3 sistemas de elución diferentes y por el rango del punto de fusión. Las placas cromatográficas eluidas, se revelaron empleando luz UV (254 nm), yodo bisublimado y/o, ácido sulfúrico (10 % más calentamiento a 100 °C). En algunos casos también se utilizó solución de cloruro férrico (5 %) en etanol y solución de vainillina (1 %) en ácido orto-fosfórico como agentes reveladores. Para revelar terpenoides y esteroides se empleó el reactivo Lieberman Burchard consistente en una mezcla de anhídrido acético (10 mL), CHCl<sub>3</sub> (10 mL), y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 gotas) mientras que para revelar azúcares se empleó resorcinol (0.5 g) en HCl (330 mL) diluyendo con agua hasta 1 litro. En la Tabla 4-2 se presentan las fases móviles utilizadas para la elución de las CCD (Huneck, 1999).

**Tabla 4-2:** Sistemas de elución empleados en la cromatografía de capa delgada.

Sistema	Composición	Proporción
A	Tol:dioxano:AcOH	90:25:4
B	<i>n</i> -Hex:Et <sub>2</sub> O:HCOOH	5:4:1
C	Tol:AcOH	85:15
G	Tol:AcOEt:HCOOH	139:83:8

Los puntos de fusión fueron determinados en un fusiómetro Mel-Temp Electrothermal 1101 D 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) fueron adquiridos en un espectrofotómetro Bruker Avance 400, empleando como referencia tetrametilsilano (TMS) y alguno de los siguientes disolventes deuterados:  $\text{CDCl}_3$  (99.8 atom. % D) o  $(\text{CD}_3)_2\text{O}$  (99.8 atom. % D) o *d*-DMSO (99.8 atom. % D). Los espectros fueron procesados mediante el programa MestreNOVA V14.2.3-29241 en versión de prueba (Mestrelab Research, 2022). La espectrometría de masas por impacto electrónico (EMIE) se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Trace 1300 acoplado a un espectrómetro de masas ISQ QD equipado con una columna capilar ZB-5 (30 m, 0.25 mm D.I., 0.25  $\mu\text{m}$ ), fuente de ionización de 70 eV (T 230 °C) y helio como fase móvil (flujo 1.1 mL / min). La temperatura comenzó a 40.0 °C y aumentó a 170.0 °C hasta 6.2 min manteniéndose durante 1.0 min. Luego, aumentó a 300 °C en los siguientes nueve minutos, manteniéndose durante 10 min. Tiempo total de ejecución: 26.2 min.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se llevó a cabo en un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 con detector UV-VIS de arreglo de diodos empleando una columna C-18 (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) y un sistema de gradiente con MeOH y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 1 %. El gradiente fue: MeOH: $\text{H}_3\text{PO}_4$  (50:50) 1 min; MeOH: $\text{H}_3\text{PO}_4$  (70:30) 5 min; MeOH: $\text{H}_3\text{PO}_4$  (100:0) 45 min; MeOH: $\text{H}_3\text{PO}_4$  (50:50) 9 min, velocidad de flujo 0.7 mL / min. Tiempo total de corrida: 60 min.

#### **4.3.2 Confirmación de la identidad taxonómica de las especies objeto de estudio**

A las especies liquénicas *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia* cf. *didyma* se les confirmó su identidad taxonómica empleando las claves de Sipman & Aguirre (1982), corroborando la consistencia de las características morfológicas, anatómicas y químicas del talo con las indicadas en las claves. Para determinar las características químicas del talo se recurrió a las pruebas de coloración empleando los reactivos de la Tabla 4-3.

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

Reactivo	Composición	Coloración positiva	Grupo de sustancias líquénicas presente
C	Hipoclorito de sodio (NaClO) (Solución saturada)	rosado, rojo, anaranjado, verde	Cromonas, xantonas dibenzofuranos y dépsidos
K	Hidróxido de sodio (NaOH) (10 %)	amarillo hasta el rojo o pardo	Dépsidos, depsidonas y quinonas
Pd	<i>p</i> -fenilendiamina (1 g), sulfito de sodio (10 g), agua (100 mL) y detergente líquido comercial (40 gotas)	amarilla que se torna rojizo	Dépsidos y depsidonas
FeCl <sub>3</sub>	Solución de cloruro férrico (5 %, EtOH o agua)	café intenso	OH fenólico

El proceso de confirmación de la identidad de las especies objeto de estudio fue realizado por el MSc. Roberto Dávila Villamizar, director de la Fundación para el Estudio de la Biodiversidad en Colombia (FUNBIOCOL) (Tabla 4-4, y Tabla 4-5). Cabe mencionar, que muestras de referencia de estos HL reposan en el Herbario Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (COL).

**Tabla 4-4:** Características morfológicas y de coloración de los talos de *Thamnolia vermicularis* para confirmación de su identidad taxonómica.

<b>Morfología</b>	Talo erecto o decumbente, formando ocasionalmente mechones por ramificación desde la base o a lo largo del pudiente decumbente, cilíndrico, con puntas puntiagudas, blanco o blanco crema; rara vez con ramas puntiagudas laterales cortas, de tamaño muy variable, usualmente de 1 a 2 mm de ancho, pero alcanzando 8 mm de ancho y 12 cm de altura.	 <p><i>Thamnolia vermicularis</i>. (Fotografía de la autora).</p>
<b>Taxónomo:</b>	MSc. Roberto Dávila	
<b>Pruebas de coloración del talo:</b>	Reactivos: K + Pd +	
<b>No COL</b>	609186	
<b>Familia:</b>	Icmadophilaceae	
<b>Especie</b>	<i>Thamnolia vermicularis</i> (Sw.) Schaer. em. Asah.	

**Tabla 4-5:** Características morfológicas y de coloración de los talos de *Cladonia* cf. *didyma* para confirmación de su identidad taxonómica.

<b>Morfología</b>	Talo primario escamuloso, persistente; escámulas de 1 - 2 x 1 - 1.5 (4) mm, de crenadas a irregularmente crenadas a lobuladas-lacinadas, esorediadas, con la cara superior brillante. Apotecios bastante comunes, 5 - 4 mm de ancho, ascosporas rojas: fusiformes, 10 - 13 x 5 $\mu$ m. Picnidios: comunes, turbinados, con tallos cortos, con conidios de gelatina roja: falciformes, 5 - 7 x 1 $\mu$ m.	 <p><i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i>. (Fotografía de la autora)</p>
<b>Taxónomo:</b>	MSc. Roberto Dávila	
<b>Pruebas de coloración del talo:</b>	Reactivos: K + C + Pd +	
<b>No COL</b>	609187	
<b>Familia:</b>	Cladoniaceae	
<b>Especie</b>	<i>Cladonia</i> cf. <i>didyma</i> (Fée) Vain.	

### 4.3.3 Extracción del líquen *Thamnolia vermicularis*

El hongo liquenizado *T. vermicularis* pulverizado (60.7987 g) se extrajo con Me<sub>2</sub>CO por Soxhlet a presión reducida (4 h, 35 - 40 °C). Durante este proceso precipitó un sólido de color gris claro que se filtró al vacío (2.3987 g). El resto del filtrado se concentró a presión reducida en evaporador rotatorio dando lugar al extracto seco (7.8905 g, 12.98 %).

### 4.3.4 Fraccionamiento del extracto

El extracto seco (6.8901 g) se suspendió en *n*-Hex (200 mL) (fracción I, FI), y se sometió a partición con disolventes iniciando con agua destilada (3 x 100 mL) (fracción II, FII). La parte del extracto que resultó insoluble en ambas fases fue decantada y disuelta en una mezcla de Me<sub>2</sub>CO:MeOH (1:1) (50 mL) (fracción III, FIII). La fracción FII se sometió a partición con Et<sub>2</sub>O (3 x 100 mL) (fracción FIV) y después con AcOEt (3 x 100 mL) (fracción FV). Cada fracción se llevó a sequedad dando lugar a las fracciones de la Tabla 4-6.

**Tabla 4-6:** Fraccionamiento del extracto acetónico de *Thamnolia vermicularis*.

Disolvente	Clave	Peso (g)
<i>n</i> -Hex	FI	0.0970
H <sub>2</sub> O	FII	0.8000
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	FIII	1.1215
Et <sub>2</sub> O	FIV	0.0770
AcOEt	FV	0.0255

#### 4.3.4.1 Obtención del ácido descarboxithamnólico (1)

El sólido gris (2.3987 g) que precipitó durante el proceso de extracción, se lavó por suspensión con mezcla *n*-Hex:CHCl<sub>3</sub> (70:30) y *n*-Hex y se filtró, dando lugar a un sólido color crema (1.1986 g, 1.97 %) soluble en Me<sub>2</sub>CO y DMSO, Pf. (°C): 215. IR (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3395 (O-H), 2959 y 2920 (C-H), 1744 (C=O), 1645 (C=O), 1628 (C=C), 1577 (C=C). 1458 (C-H), 1281 y 1180 (C-O). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 2.20 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9'), 2.52 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9), 3.88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-4), 6.37 (1H, s, H-1'), 6.64 (1H, s, H-5), 10.21 (1H, s, CHO-8'), 11.03 (1H, s, OH-4'). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 111.9 (C-1), 161.1 (C-2), 105.4 (C-3), 159.4 (C-4), 109.4 (C-5), 144.7 (C-6), 166.5 (C-7), 170.2 (C-8), 21.9 (C-9), 106.0 (C-1'), 160.4 (C-2'), 107.8 (C-3'), 159.4 (C-4'), 142.9 (C-5'), 128.9 (C-6'), 194.5 (CHO-8'), 17.5 (C-9'), 56.7 (OCH<sub>3</sub>-4). Esta sustancia fue identificada como ácido descarboxithamnólico (1) por análisis y comparación de sus datos espectroscópicos con lo reportado en literatura (Huneck, et al., 1996). Cantidad adicional (0.7506 g, 1.23 %) de este compuesto se obtuvo a partir de la fracción FIII por recristalización de Me<sub>2</sub>CO.

#### 4.3.4.2 Obtención del arabitol (2)

La fracción FII (0.8000 g) fue sometida a CCDP eluyendo con una fase móvil compuesta por Tol:AcOEt:HCOOH (139:83:8) dando lugar a 7 bandas (FII-1 a FII-7), que se visualizaron con resorcinol, se rasparon y desorbieron con mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1). A partir de la banda FII-1-3 se obtuvo un sólido blanco amorfo (0.0398 g, 0.065 %) soluble en agua, Pf. (°C): 103. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 3.38 (2H, s, H-1), 3.66 (1H, s, H-2), 3.46 (1H, s, H-3), 3.56 (1H, s, H-4), 3.46 (2H, s, H-5). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  ppm 63.4 (C-1), 71.1 (C-2), 72.0 (C-3), 70.2 (C-4), 64.2 (C-5). Esta sustancia fue identificada como arabitol (2) por análisis y comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados por la literatura (Wong, et al., 1995).

#### 4.3.5 Extracción del líquen *Cladonia* cf. *didyma*

El hongo liquenizado *Cladonia* cf. *didyma* seco y molido (69.8205 g) se extrajo con Me<sub>2</sub>CO (0.6 L), usando Soxhlet a presión reducida (4 h, 35 - 40 °C). Acto seguido, este se concentró al vacío dando lugar al extracto seco (1.9701 g, 2.82 %).

### 4.3.6 Fraccionamiento del extracto

El extracto (1.7672 g) se lavó por suspensión con *n*-Hex y se filtró al vacío. El líquido obtenido fue concentrado (fracción I, FI, 0.4805 g) mientras que el sólido lavado (fracción II, FII, 1.1438 g) fue sometido a CC abierta sobre gel de sílice (50 g) eluyendo con un gradiente de *n*-Hex:AcOEt (0.75:0.25 → 0:1), AcOEt:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:0 → 0:1), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Me<sub>2</sub>CO (1:0 → 0:1) Me<sub>2</sub>CO:MeOH (1:0 → 0:1) dando lugar a 184 fracciones (20 mL) que se reunieron en 20 fracciones combinadas de acuerdo a su similitud cromatográfica en CCD (fase móvil C) (Tabla 4-7).

**Tabla 4-7:** Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción II proveniente del extracto de *Cladonia cf. didyma*.

Fase móvil	Proporción %	Fracciones	Fracción combinada	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -Hex:AcOEt	75:25	1 – 12	1 – 6	FII-1	116.5
	60:40	13 – 21	7 – 11	FII-2	51.5
	50:50	22 – 27	12 – 24	FII-3	41.2
	40:60	28 – 33	25 – 46	FII-4	50.1
	30:70	34 – 35			
	20:80	37 – 41	47 – 69	FII-5	14.3
AcOEt	100	42 – 61	70 – 78	FII-6	97.6
AcOEt:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	62 – 72	79 – 80	FII-7	9.3
	60:40	73 – 77	81 – 89	FII-8	11.5
	40:60	78 – 82	90 – 94	FII-9	14.6
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	83 – 89	95 – 100	FII-10	20.9
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Me <sub>2</sub> CO	80:20	90 – 93	101 – 106	FII-11	81.5
	50:50	94 – 98	107 – 113	FII-12	30.5
	40:60	97 – 117	114 – 125	FII-13	27.2
	30:70	118 – 128	126 – 137	FII-14	15.6
Me <sub>2</sub> CO	100	129 – 138	138 – 147	FII-15	8.8
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	80:20	139 – 143	148 – 156	FII-16	70.3
	50:50	144 – 156	157 – 168	FII-17	10.7
	30:70	157 – 160	169 – 172	FII-18	22.6
	20:80	161 – 168	173 – 179	FII-19	21.1
MeOH	100	169 – 184	180 – 184	FII-20	34.3

#### 4.3.6.1 Obtención del 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3)

La fracción FII-1 (116.5 mg) fue sometida a CC sobre gel de sílice (15 g) eluyendo por gradiente de polaridad con mezclas de *n*-Hex:AcOEt (9:1 → 1:1), AcOEt:Me<sub>2</sub>CO (8:2 → 0:1), Me<sub>2</sub>CO:MeOH (1:1 → 1:1), obteniéndose 23 fracciones (10 mL) que se reunieron en

10 fracciones combinadas de acuerdo con su similitud cromatográfica en CCD (fase móvil C) (Tabla 4-8). La fracción combinada FII-1-3 (36.1 mg) fue sometida a recristalización con una mezcla de Me<sub>2</sub>CO:MeOH (1:1) dando lugar a un sólido blanco (31.1 mg, 0.045 %) soluble en CHCl<sub>3</sub>, Pf. (°C): 174. IR (KBr)<sub>v max</sub> (cm<sup>-1</sup>): 3445 (O-H), 2928 (C-H), 2855 (C-H), 1740 (C=O), 1609 (C=C), 1458 (C=C), 1377 (C-H), 1242 (C-O), 1153 (C-O). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 0.50 – 2.50 (46H, *m*, H-1, H-2, H-4, H-9, H-11, H-12, H-14, H-15, H-16, H-17, H-18, H-19, H-20, H-21, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-1'', H-2'', H-3''), 4.17 (1H, *s*, H-3), 5.26 (1H, *s*, H-23), 5.36 (1H, *s*, H-22), 6.08 (1H, *s*, H-7), 6.12 (1H, *s*, H-6), 6.77 (1H, *s*, H-6'), 6.91 (1H, *s*, H-4'), 3.89 (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>-5'). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 28.0 (C-1), 29.1 (C-2), 62.1 (C-3), 37.2 (C-4), 68.9 (C-5), 130.0 (C-6), 129.8 (C-7), 79.0 (C-8), 46.5 (C-9), 45.8 (C-10), 29.2 (C-11), 29.6 (C-12), 31.9 (C-13), 34.0 (C-14), 21.1 (C-15), 22.7 (C-16), 27.1 (C-17), 18.3 (C-18), 16.9 (C-19), 128.0 (C-22), 125.8 (C-23), 93.9 (C-4'), 113.5 (C-6'), 173.3 (C-7'), 14.1 (C-3''), 55.6 (CH<sub>3</sub>-O-5'). Esta sustancia fue identificada como 5α,8α-peroxi ergosteril divaricatinato (**3**) por análisis y comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados por la literatura (Nowak, et al., 2016; Tatipamula, et al., 2019).

**Tabla 4-8:** Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción II-1.

Fase móvil	Proporción %	Fracciones	Fracción combinada	Clave	Peso (mg)
<i>n</i> -Hex:AcOEt	90:10	1 – 2	1 – 2	FII-1-1	4.1
			3 – 4	FII-1-2	9.8
			5 – 7	FII-1-3	36.1
	70:30	3 – 12	8	FII-1-4	16.7
			9 – 10	FII-1-5	15.0
			11 – 12	FII-1-6	6.5
			13 – 16	FII-1-7	6.7
50:50	13 – 16	13 – 16	FII-1-7	6.7	
AcOEt:Me <sub>2</sub> CO	80:20	17 – 19	17 – 19	FII-1-8	4.1
Me <sub>2</sub> CO	100	20 – 22	20 – 21	FII-1-9	3.5
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	50:50	23	22 – 23	FII-1-10	5.7

#### 4.3.6.2 Obtención del ácido barbático (**4**)

La fracción FII-11 (81.5 mg) fue sometida a CC en Sephadex<sup>®</sup> (30 g) eluyendo con mezcla de Me<sub>2</sub>CO:MeOH (1:0 → 1:1). Este proceso condujo a la obtención de 15 fracciones (10 mL) que se reunieron en 7 fracciones combinadas con base en su similitud en CCD (fase móvil C) (Tabla 4-9). La fracción combinada FII-11-6 dio lugar a un sólido

color blanco (10.3 mg, 0.015 %) soluble en MeOH y DMSO, Pf: 185 °C. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 1.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8'), 2.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>-8), 2.55 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9'), 2.58 (3H, s, CH<sub>3</sub>-9), 3.87 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-4), 6.29 (1H, s, H-5'), 6.60 (1H, s, H-5), 10.98 (1H, s, HO-2). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 107.3 (C-1), 161.5 (C-2), 110.4 (C-3), 160.3 (C-4), 106.8 (C-5), 139.5 (C-6), 169.7 (C-7), 9.8 (C-8), 23.8 (C-9), 115.7 (C-1'), 164.5 (C-2'), 114.5 (C-3'), 150.1 (C-4'), 113.0 (C-5'), 139.6 (C-6'), 173.6 (C-7'), 8.5 (C-8'), 23.4 (C-9'), 56.2 (CH<sub>3</sub>-O-4). Esta sustancia fue identificada como ácido barbático (**4**) por análisis y comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados por la literatura (Huneck, et al.,1996).

**Tabla 4-9:** Cromatografía en columna abierta en Sephadex<sup>®</sup> de la fracción FII-11.

Fase móvil	Proporción %	Fracciones	Fracción combinada	Clave	Peso (mg)
Me <sub>2</sub> CO	100	1-9	1-3	FII-11-1	3.6
			4-6	FII-11-2	12.9
			7-10	FII-11-3	16.4
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	50:50	10-15	11	FII-11-4	14.4
			12-14	FII-11-6	10.3
			15	FII-11-7	10.1

#### 4.3.6.3 Obtención del ácido condidymico (**5**)

La fracción FII-3 (41.2 mg) fue sometida a CC en Sephadex<sup>®</sup> (30 g) eluyendo con Me<sub>2</sub>CO y mezcla de Me<sub>2</sub>CO:MeOH (1:1). Este proceso condujo a la obtención de 10 fracciones (10 mL) que se reunieron en 7 fracciones combinadas de acuerdo con su similitud en CCD (fase móvil C) (Tabla 4-10). La fracción combinada FII-3-5 dio lugar a un sólido color blanco (12.1 mg, 0.017 %) soluble en CHCl<sub>3</sub> y Me<sub>2</sub>CO, Pf: 154 °C. IR (KBr)  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>): 3422 (O-H), 2951 (C-H), 2924 (C-H), 2855 (C-H), 1655 (C=O), 1628 (C=C), 1609 (C=C), 1570 (C=C), 1250 (C-O), 1146 (C-O). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 0.86 - 0.95 (6H, *m*, 2x-CH<sub>3</sub>-, H-5', H-5''), 1.28 - 1.39 (8H, *m*, 4x-CH<sub>2</sub>-, H-3', H-3'', H-4', H-4''), 1.60 - 1.71 (4H, *m*, 2x-CH<sub>2</sub>-, H-2', H-2''), 3.05 (2H, s, H-1''), 3.53 (2H, s, H-1'), 3.90 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-6), 6.77 (1H, s, H-7), 6.89 (1H, s, H-5), 6.95 (1H, s, H-4). RMN  $^{13}\text{C}$  (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 138.5 (C-1), 119.1 (C-2) 150.7 (C-3), 97.6 (C-4), 94.0 (C-5), 158.7 (C-6), 113.4 (C-7), 138.5 (C-8), 174.0 (C-9), 158.7 (C-10), 158.7 (C-11), 115.8 (C-12), 115.8 (C-13), 37.2 (C-1''), 33.2 (C-1'), 32.3 (C-2''), 31.6 (C-2'), 31.3 (C-3'', C-3'), 22.6 (C-4', C-4''), 14.0 (C-5', C-5''), 55.6

(OCH<sub>3</sub>-6). EMIE *m/z*: 398.3 [M]<sup>+</sup>. Esta sustancia fue identificada como ácido condidymico (**5**) por análisis y comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados por la literatura (Huneck, 1999).

**Tabla 4-10:** Cromatografía en columna abierta en Sephadex® de la fracción FII-3.

Fase móvil	Proporción %	Fracciones	Fracción combinada	Clave	Peso (mg)
Me <sub>2</sub> CO	100	1-8	1	FII-3-1	2.7
			2-3	FII-3-2	5.5
			4	FII-3-3	1.9
			5-7	FII-3-4	4.0
			8	FII-3-5	12.1
Me <sub>2</sub> CO:MeOH	50:50	9-10	9	FII-3-6	8.3
			10	FII-3-7	3.4

#### 4.3.6.4 Obtención del ácido isodidymico (**6**)

La fracción FII-4 (50.1 mg) fue sometida a recristalización de Me<sub>2</sub>CO dando lugar a un sólido color blanco (13.5 mg, 0.019 %) soluble en cloroformo. Pf: 150 °C. IR (KBr)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3422 (O-H), 2924 (C-H), 2851 (C-H), 1736 (C=O), 1655 (C=C), 1605 (C=C), 1462 (C=C), 1199 (C-O), 1161 (C-O). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 0.83 - 0.9 (6H, *m*, 2x-CH<sub>3</sub>-, H-5", H-3'), 1.28 - 1.40 (4H, *m*, 2xCH<sub>2</sub>-, H-3", H-4"), 1.64 - 1.76 (4H, *m*, 4x-CH<sub>2</sub>-, H-2', H-2"), 3.07 (2H, *bt*, *J* = 8.0 Hz, CH<sub>2</sub>-1"), 3.54 (2H, *t*, *J* = 8.0 Hz, CH<sub>2</sub>-1'), 3.91 (3H, *s*, OCH<sub>3</sub>-6), 6.78 (1H, *d*, *J* = 2.4 Hz, H-7), 6.92 (1H, *d*, *J* = 2.4 Hz, H-5), 6.97 (1H, *s*, H-4). RMN <sup>13</sup>C (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  ppm 138.5 (C-1), 115.8 (C-2), 160.5 (C-3), 97.7 (C-4), 94.1 (C-5), 158.8 (C-6), 113.5 (C-7), 138.5 (C-8), 175.3 (C-9), 158.7 (C-10), 158.8 (C-11), 115.8 (C-12), 119.0 (C-13), 34.9 (C-1'), 37.3 (C-1"), 31.9 (C-2"), 25.8 (C-2'), 14.0 (C-3'), 22.7 (C-3"), 29.7 (C-4"), 13.7 (C-5"), 55.6 (CH<sub>3</sub>-O-6). EIMS *m/z*: 370.2 [M]<sup>+</sup>. Esta sustancia fue identificada como ácido isodidymico (**6**) por análisis y comparación de sus datos espectroscópicos y espectrométricos con los reportados por la literatura (Huneck, 1999).

## 4.4 Estudio biológico de los líquenes seleccionados

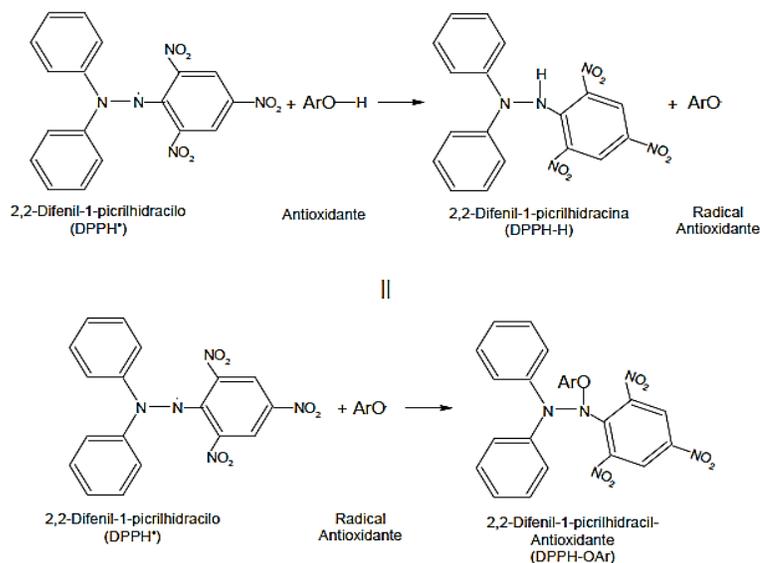
### 4.4.1 Procedimientos experimentales generales

Los reactivos empleados para los ensayos de actividad antioxidante y fotoprotectora fueron los patrones antioxidantes: ácido gálico (98.0 %, Merck), butilhidroxitolueno (BHT) (99.0 %, Sigma Aldrich), patrones fotoprotectores: bemotrizinol (BEM, tinosorb S<sup>®</sup>), octil metoxicinamato (OMC, uvinul<sup>®</sup> MC 80), avobenzona (AVO; parsol-1789<sup>®</sup>). El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH•) (90.0 %, 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), ácido linoleico (99.0 %, Sigma Aldrich), FeCl<sub>2</sub> (99.0 %, JT Baker), FeCl<sub>3</sub> (98.0 %, Merck), K<sub>3</sub>(Fe(CN)<sub>6</sub>) (94.0 %, PanReac), EtOH absoluto (PanReac), HCl (37.0 %, JT Baker), ácido tricloroacético (99.5 %, Merck). El equipo empleado para las determinaciones espectrofotométricas fue un espectrofotómetro marca Shimadzu (Modelo: UV-1700. PharmaSpec).

### 4.4.2 Determinación de la actividad antioxidante

#### 4.4.2.1 Cuantificación del poder captador de radicales libres DPPH•

La capacidad captadora de radicales libres de los extractos acetónicos, compuestos aislados de *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia cf. didyma*, y los antioxidantes BHT y ácido gálico, fueron evaluados en el modelo de radicales libres DPPH• según la metodología descrita por Brand-Williams, et al., 1995. Los resultados se expresaron en términos de concentración efectiva cincuenta (CE<sub>50</sub>), que se define como la concentración necesaria de una sustancia para reducir la concentración inicial del DPPH• en un 50 %. Una vez que el antioxidante reacciona con el radical libre, según la reacción general descrita en la Figura 4-1, su concentración disminuye hasta alcanzar un valor constante o estado estacionario.



**Figura 4-1:** Reacción entre el radical libre DPPH y un antioxidante.

Para determinar la concentración del radical libre, se construyó una curva de calibración de absorbancia vs concentración de DPPH• (10 – 100  $\mu\text{M}$  en EtOH) a 515 nm. Los resultados se ajustaron a una función lineal de acuerdo con la Ec. 4-1:

$$Abs_{550\text{ nm}} = 9.55 * 10^{-3} [DPPH \bullet] + 1.21 + 10^{-2}$$

**Ec. 4-1**

El progreso de la reacción entre el radical libre y las diferentes muestras se monitoreó cada 30 minutos, cuantificando la disminución de la concentración del radical libre vs el tiempo hasta alcanzar el estado estacionario.

Con la finalidad de determinar la  $CE_{50}$  se prepararon disoluciones stock de las muestras a ensayar (extractos: 950 mg/L – *T. vermicularis* y 1000 mg/L – *C. didyma*; compuestos: 3189 a 4211  $\mu\text{M}$ ), DPPH• (100  $\mu\text{M}$ ), controles (BHT: ca. 5000  $\mu\text{M}$  y ácido gálico: ca. 6000  $\mu\text{M}$ ). Acto seguido, se permitió la reacción entre cada muestra y el radical libre DPPH• a diferentes relaciones de concentración (mg extracto / mg DPPH• o [antioxidante] / [DPPH•]), previamente establecidas evaluando al menos diez relaciones de concentración para cada sistema en estudio.

Para cada relación estudiada, se determinó la variación de la concentración del DPPH• vs tiempo hasta alcanzar un valor constante. Esto permitió calcular el porcentaje remanente de DPPH• en función del tiempo hasta alcanzar el estado estacionario (Ec. 4-2):

$$\% \text{ Remanente de DPPH} \bullet = \frac{[DPPH \bullet]_t}{[DPPH \bullet]_0} \times 100$$

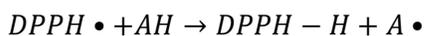
**Ec. 4-2**

Donde,  $[DPPH \bullet]_t$ : Concentración remanente de DPPH• al reaccionar con muestra al tiempo t.  
 $[DPPH \bullet]_0$ : concentración inicial de DPPH• al tiempo cero.

Con este valor y las relaciones de concentración (mg extracto / mg DPPH• o relación molar: [antioxidante] / [DPPH•]) para cada sistema evaluado, se construyó la gráfica para determinar  $CE_{50}$ . Un valor de  $CE_{50}$  menor indica un mayor poder captador de radicales libres DPPH•.

#### 4.4.2.2 Determinación de la reactividad para captar radicales libres

La reactividad de los compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma* y los controles (BHT y ácido gálico) para captar al DPPH•, se determinó a partir de la constante de velocidad de reacción de segundo orden ( $k_2$ ) a  $25.0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  siguiendo la metodología descrita por Rojas, et al., 2015. El progreso de la reacción de reducción del DPPH• (Figura 4-2) por parte de los compuestos en función del tiempo se monitoreó a partir de la disminución de la concentración del radical evaluada espectrofotométricamente cada 6 minutos, durante dos horas.



**Figura 4-2:** Reacción entre el radical libre DPPH• y un antioxidante (AH: antioxidante, R•: radical). Considerando que la cinética que siguen estas reacciones es de segundo orden (Rojas, et al., 2015; Suja, et al., 2004; Espín, et al., 2000) la ley de velocidad está dada por la Ec. 4-3:

$$-\frac{d[DPPH \bullet]}{dt} = k_2 \times [AH]_0 \times [DPPH \bullet]_t$$

**Ec. 4-3**

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

Las condiciones experimentales que se establecieron ( $[DPPH\cdot]_0 \ll [AH]_0$ ), aseguraron que estas reacciones siguieran una cinética de *pseudo*-primer orden (Leal, et al., 2018; Rojas, et al., 2015; Valencia-Islas, et al., 2020; Espín, et al., 2000), estableciéndose las siguientes ecuaciones de velocidad:

$$[DPPH\cdot]_t = [DPPH\cdot]_0 e^{-k_{obs}t} \quad \text{Ec. 4-4}$$

$$\ln [DPPH\cdot]_t = \ln [DPPH\cdot]_0 - k_{obs}t \quad \text{Ec. 4-5}$$

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

La dependencia del  $\ln [DPPH\cdot]$  en función del tiempo (s) (Ec. 4-5) se ajusta a una línea recta, donde la pendiente es  $k_{obs}$  a la temperatura de ensayo.

La ley de velocidad para esta reacción de *pseudo*-primer orden, está dada por la Ec. 4-6:

$$-\frac{d[DPPH\cdot]}{dt} = k_{obs} \times [DPPH\cdot]_t = k_2 \times [AH]_0 \times [DPPH\cdot]_t$$

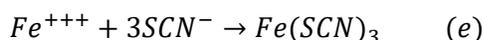
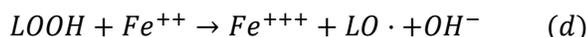
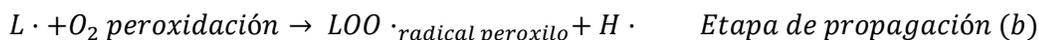
**Ec. 4-6**

A partir de  $k_{obs}$  y de la concentración inicial de cada compuesto  $[AH]_0$ , se calculó la constante cinética de segundo orden  $k_2$  ( $M^{-1}\cdot s^{-1}$ ). Los valores de  $k_2$  fueron el resultado del promedio de dos determinaciones independientes. Este valor es indicativo de la reactividad de cada compuesto frente al radical DPPH•.

#### 4.4.2.3 Capacidad inhibidora de la peroxidación de lípidos

La capacidad inhibidora de la peroxidación lipídica de los extractos acetónicos, compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*, y controles BHT y ácido gálico, se determinó siguiendo la metodología descrita por Mitsuda, et al., (1966) en el modelo del ácido linoleico, con algunos cambios. La reacción entre el hidroperóxido formado a partir del ácido linoleico durante el proceso de peroxidación y el ion ferroso ( $Fe^{++}$ ) (Figura 4-3) da origen al radical peroxilo y a los iones hidróxido y férrico. Este último reacciona con

tiocianato de amonio, formando el complejo coloreado de tiocianato de hierro III, que se cuantifica espectrofotométricamente a 500 nm ( $\lambda_{\text{máx}}$ ).



**Figura 4-3:** Peroxidación lipídica y cuantificación de hidroperóxidos (LOOH).

Bajo las condiciones de este ensayo, la presencia de un agente inhibidor de la peroxidación de lípidos evitaría la formación hidroperóxidos conllevando a una baja concentración del complejo formado y por ende a un valor bajo de absorbancia. Este ensayo inició con la preparación de disoluciones stock de cada una de las sustancias a evaluar (50, 100, 200 y 500 ppm) en EtOH. Estas disoluciones (0.250 mL) se mezclaron con buffer de fosfatos (1.0 mL, 0.2 M a pH 7.0) y emulsión de ácido linoleico (1.25 mL, tween 20, 0.02 M; ácido linoleico, 0.02 M; buffer de fosfatos, 0.2 M a pH 7) en frasco ámbar. También se prepararon 3 blancos control (mezcla de reacción, en ausencia de compuestos a evaluar). Las mezclas se incubaron a  $37.0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  y luego de 24 horas, se tomó una alícuota (0.100 mL) de cada una de estas y se le adicionó EtOH (4.7 mL, 75.0 % v/v), tiocianato de amonio (0.100 mL, 30.0 % p/v) y  $FeCl_2$  (0.100 mL, 1.0 % p/v en HCl, 3.5 % p/v) y a los 30 min se midió su absorbancia ( $\lambda$  500 nm). La lectura se repitió a las 48 horas de iniciada la reacción. Con los valores de absorbancia se calcularon los % de inhibición de peroxidación del ácido linoleico (% IPL) de acuerdo con la Ec. 4-7:

$$\%IPL = \left(1 - \frac{A_m}{A_b}\right) \times 100$$

**Ec. 4-7**

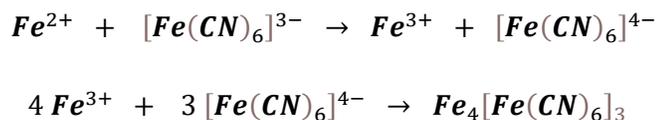
Donde,  $A_m$ : Absorbancia de la muestra.  $A_b$ : Absorbancia del blanco.

El % IPL es resultante del promedio de dos o tres determinaciones independientes. Entre mayor sea este valor (cercaos al 100 %), mayor poder inhibidor de la peroxidación de lípidos posee una sustancia.

#### 4.4.2.4 Poder reductor férrico

El poder reductor férrico (PRF) de los extractos acetónicos, compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*, y controles BHT y ácido gálico, se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Oyaizu, (1986). Este ensayo mide la capacidad de una sustancia para reducir el ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) siendo el ion férrico importante para la reacción de formación del radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno en la reacción de Fenton, por tanto, al ser reducido al ion ferroso se evita la formación de dicho radical, siendo un mecanismo acción de algunos antioxidantes (Birben, et al., 2012).

La reducción del ion férrico se determinó a través de la formación del complejo coloreado de azul de Turnbull ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ) (Figura 4-4) cuya concentración fue medida espectrofotométricamente ( $\lambda$  700 nm).



**Figura 4-4:** Reacciones de reducción del ion férrico y formación del complejo coloreado azul de Turnbull.

Para el ensayo se prepararon disoluciones de cada una de las sustancias a evaluar (50, 100, 200 y 500 ppm) en EtOH. Una alícuota (0.5 mL) de estas disoluciones se mezcló con buffer de fosfatos (1.0 mL, 0.2 M, pH 6.6) y  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (1.0 mL, 1.0 % p/v) en frasco ámbar y se incubó a  $25.0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  (20 min). Luego, se adicionó ácido tricloroacético (1.0 mL, 10 % p/v). Una alícuota (2.5 mL) de esta solución se mezcló con agua destilada (2.5 mL) y  $\text{FeCl}_3$  (0.5 mL, 0.1 %) y se le determinó su absorbancia ( $\lambda$  700 nm). Valores altos de absorbancia son indicativos de mayor formación de complejo y por ende mayor PRF. Los resultados se reportan como el promedio de dos o tres determinaciones independientes.

### 4.4.3 Determinación de la actividad fotoprotectora

#### 4.4.3.1 Evaluación de la actividad fotoprotectora frente a la radiación UVB mediante la estimación del factor de protección solar

El factor de protección solar (FPS) estima la capacidad de una sustancia para absorber la radiación UVB ( $\lambda$  290 a 320 nm). Este factor se determinó *in vitro*, de acuerdo con la metodología de Mansur, et al., (1986) empleando los fotoprotectores control: bemotrizinol (**BEM**, filtro UVA - UVB), octil metoxicinamato (**OMC**, filtro UVB) y avobenzona (**AVO**, filtro UVA)).

Para determinar el FPS se prepararon soluciones (10, 50, 100 y 200 ppm) de cada una de las muestras a evaluar (extractos, compuestos o patrones fotoprotectores) en EtOH y a cada disolución se le determinó la absorbancia entre 290 y 320 nm a intervalos de medición de 5 nm en celdas de cuarzo empleando EtOH como blanco. Con los datos de absorbancia y mediante la ecuación Ec. 4-8, se obtuvo el FPS. Los resultados fueron el promedio de tres réplicas realizadas de manera independiente.

$$SPF_{ESPECTROFOTOMÉTRICO} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Ec. 4-8

Donde,

EE: factor de eritema

Abs: absorbancia

I: factor de intensidad solar

CF: factor de corrección = 10

Esta ecuación involucra una constante (Tabla 4-11) resultante del producto de un factor de eritema ( $EE(\lambda)$ ) con la intensidad solar ( $I(\lambda)$ ) asociadas a las longitudes de onda entre 290 y 320 nm (Sayre, et al., 1979).

**Tabla 4-11:** Valores de la constante, producto de un factor de eritema ( $EE(\lambda)$ ) con la intensidad solar ( $I(\lambda)$ ) asociadas a las longitudes de onda entre 290 y 320 nm (Sayre, et al., 1979).

Longitud de onda (nm)	290	295	300	305	310	315	320	Total
$EE(\lambda) \times I(\lambda)$	0.0150	0.0817	0.2874	0.3278	0.1864	0.0839	0.0180	1.000

El FPS, resulta del "cociente entre la mínima cantidad de energía para producir eritema mínimamente detectable (dosis mínima de eritema: MED) en la piel con fotoprotector y en ausencia de éste" (Pelizzo, et al., 2012). La FDA da una escala para clasificar un fotoprotector de acuerdo con su valor de FPS: FPS de 2 a 12: baja; FPS de 12 a 30: moderada; FPS superior a 30: alta protección frente a radiación UVB (U.S. Food and Drug Administration, 2020).

#### 4.4.3.2 Evaluación de la actividad fotoprotectora frente a la radiación UVA mediante la estimación de la longitud de onda crítica y relación UV-r\*

La longitud de onda crítica ( $\lambda_{crit}$ ) permite evaluar el efecto fotoprotector de una sustancia frente a la radiación UVA, definiéndolo 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. La determinación de este parámetro se llevó a cabo de acuerdo con la metodología de Millot, et al., (2012), incluyendo algunas modificaciones, empleando los fotoprotectores control: bemotrizinol (**BEM**, filtro UVA - UVB), octil metoxicinamato (**OMC**, filtro UVB), avobenzona (**AVO**, filtro UVA)). Para ello, se prepararon disoluciones de las sustancias a evaluar (extractos, compuestos o patrones fotoprotectores a 10, 50, 100 y 200 ppm) en EtOH y a cada disolución se le determinó la absorbancia entre 290 y 400 nm a intervalos de medición de 1 nm en celdas de cuarzo. Con estos datos y empleando la ecuación 4.9, se calculó el área bajo la curva en dicho intervalo y se obtuvo la  $\lambda_{crit}$ . Este parámetro se presenta como el resultado del promedio de tres réplicas independientes.

$$\int_{290 \text{ nm}}^{\lambda_{crit}} Abs(\lambda) d\lambda = 0.9 \times \int_{290 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} Abs(\lambda) d\lambda$$

Ec. 4-9

Donde, Abs: absorbancia de la muestra evaluada.

Teniendo en cuenta la  $\lambda_{crit}$  la FDA clasifica los fotoprotectores en una escala de 0 a 4 (U.S. Food and Drug Administration, 2020): 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  $\lambda_{crit} \geq 370$ . Entre mayor es el valor de longitud de onda crítica, mayor es la capacidad fotoprotectora de la sustancia frente a la radiación UVA.

Adicionalmente, se determinó la relación UVA/UVB (UV-r\*) que también permite establecer la capacidad fotoprotectora de una sustancia frente a radiación UVA. Para ello, se siguió la metodología de Springsteen, et al., (1999) empleando las mismas diluciones de las muestras utilizadas para la determinación de la longitud de onda crítica. UV-r\* se calculó mediante la Ec. 4-10, siendo necesario evaluar las áreas bajo la curva de los espectros de absorbancia vs  $\lambda$  entre 320 - 400 nm y entre 290 – 320 nm para cada una de las diluciones evaluadas. Los resultados son el promedio de tres determinaciones realizadas de manera independiente.

$$Relación\ UV - r^* = \frac{\sigma_{UVA}}{\rho_{UVB}} = \frac{\int_{320nm}^{400nm} Abs(\lambda)d(\lambda)}{\int_{290nm}^{320nm} Abs(\lambda)d(\lambda)}$$

**Ec. 4-10**

De acuerdo con el valor UV-r\* se puede establecer el grado de fotoprotección frente a la radiación UVA clasificándose del siguiente modo:  $0.0 < 0.2$  “no protege”;  $0.2 < 0.4$  “moderada”;  $0.4 < 0.6$  “buena”;  $0.6 < 0.8$  “superior” y  $0.8 \geq$  “máximo” (Springsteen et al. 1999).

Cabe mencionar que, de acuerdo con la FDA (Donglikar & Deore, 2016) para que un fotoprotector sea considerado de amplio espectro debe cumplir con los requisitos de presentar un FPS mayor 15 y  $\lambda_{crit.}$  mayor a 370 nm. Lo cual indica que este protege frente a la radiación UVA y UVB.

#### **4.4.3.3 Determinación del efecto protector de células sometidas a estrés oxidativo por radical hidroxilo**

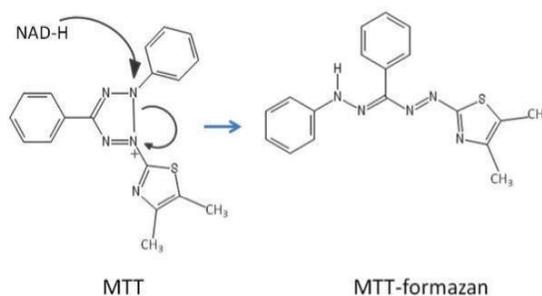
El efecto citoprotector de los compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma* frente al estrés oxidativo causado por el radical hidroxilo (OH•), se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Russo, et al., (2008) y algunas modificaciones realizadas por Perico-Franco, et al., (2015).

El ensayo se llevó a cabo con un cultivo de queratinocitos inmortalizados humanos (HaCat) que crecieron en el medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM, Gibco Invitrogen), suplementado con suero fetal bovino (10 % v/v), penicilina G sódica (100 unidades/mL), estreptomycin B (25 ppm), piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales (1x: 0.1 mM) y NaHCO<sub>3</sub> con Hepes 1 M. La viabilidad celular se midió por el método del MTT (bromuro de 3-(3,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Mosmann, 1983; Carmichael, et al., 1987)

que se basa en la reducción enzimática celular del MTT a formazán (Figura 4-5), lo cual se aprecia como un cambio de color de la solución de ensayo (amarillo a púrpura) que es cuantificable espectrofotométricamente.

Las células se sembraron en placas de 96 pozos el día anterior al experimento, a una densidad de  $7 \times 10^3$  células por pozo (200  $\mu\text{L}$ ) a partir de un cultivo de partida con confluencia del 70 al 80 %. Las células se incubaron (24 h, 37 °C) en atmósfera húmeda (5 % de  $\text{CO}_2$ ).

Antes del inicio del ensayo, fue necesario determinar la citotoxicidad de los compuestos, la cual se llevó a cabo a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Para ello, una solución de cada uno de los compuestos (100  $\mu\text{M}$  en DMEM y DMSO), se puso en contacto con las células dejando en incubación (24 h, 37 °C) en atmósfera húmeda (5 % de  $\text{CO}_2$ ). Se aseguró que la cantidad máxima de DMSO por pozo fuera máximo 0.28 %, para evitar toxicidad por el disolvente. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinó la viabilidad celular por el método del MTT (Mosmann, 1983; Carmichael, et al., 1987). Para ello, se colocó una solución de MTT en el medio de cultivo (1 mg/mL, 20  $\mu\text{L}$ ) a los pozos que contenían las células con los diferentes tratamientos, dejando en contacto por 2 h, luego se retiró el medio de cultivo con el MTT, se adicionó DMSO (200  $\mu\text{L}$ ) y se homogeneizó la placa para medir la densidad óptica del formazán formado ( $\lambda$  540 nm) en un lector multi-modal de microplacas de alto desempeño (BioTek Synergy HT), en el modo de detección absorbancia UV-visible (Perico-Franco, et al., 2015).



**Figura 4-5:** Transformación enzimática del MTT a formazán por células viables.

Para el ensayo de citoprotección la concentración de los compuestos a evaluar fue 15, 30 y 50  $\mu\text{M}$  disueltos en DMSO (máx 0.28 %) (50  $\mu\text{L}$ ), los cuales se adicionaron a las células para después ser expuestas al radical hidroxilo producido *in situ* con luz UV (254 nm, 5

---

min) a partir de peróxido de hidrógeno (2.5 mM). Transcurrida la exposición, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco y se incubó hasta el día siguiente (37 °C en atmósfera húmeda, al 5 % de CO<sub>2</sub>). La viabilidad celular se determinó por el método del MTT. A partir de los datos de absorbancia se calculó el porcentaje de viabilidad celular, comparando frente a una muestra control de células no expuestas a estrés oxidativo, cuya viabilidad se consideró del 100 %. La actividad citoprotectora de los compuestos se determinó al compararlos con el control de células expuestas a estrés oxidativo por el radical OH• sin previa adición de los compuestos (Perico-Franco, et al., 2015).

#### **4.4.3.4 Determinación del efecto protector de ADN sometido a estrés oxidativo por radical hidroxilo**

La capacidad de las sustancias de origen liquénico para proteger al ADN frente al daño oxidativo generado por el radical hidroxilo (OH•) se determinó por el método Russo, et al., (2008), con algunas modificaciones realizadas por Perico-Franco, et al., (2015). El radical hidroxilo fue producido *in situ* por fotólisis del peróxido de hidrógeno mediada por luz UV. Para el ensayo se obtuvo ADN de leucocitos humanos, a partir de sangre periférica (5 mL) utilizando EDTA como anticoagulante. Para ello, la sangre se centrifugó (3000 rpm x 5 min) y el plasma se separó en alícuotas de 1 mL (en criotubos) y se congeló a -70 °C hasta su uso. El paquete globular se suspendió en TTS y se centrifugó (14000 rpm, 3 min.). El sobrenadante se desechó y el pellet se lavó con TTS (1 mL) para centrifugar de nuevo (14000 rpm, 3 min.). Este proceso se repitió hasta que el pellet adquirió apariencia color blanco o transparente. Acto seguido, el pellet se resuspendió en NaCl (5 mM, 570 µL), luego se adicionó SDS al 10 % (30 µL) y la mezcla se homogeneizó con vórtex. A continuación, se adicionó NaCl saturado (200 µL), se agitó con vórtex y se centrifugó (14000 rpm, 10 min). El sobrenadante se recolectó y se lavó con mezcla CHCl<sub>3</sub>:alcohol isoamílico (49:1) (500 µL) y se centrifugó nuevamente (14000 rpm, 10 min). El sobrenadante se transfirió a un vial con EtOH absoluto frío (1600 µL) para precipitar el ADN. El ADN precipitado se lavó con EtOH al 70 % (300 µL) y se centrifugó (14000 rpm, 10 min). El sobrenadante se decantó y el ADN se dejó secar en Speed Vac a T ambiente y se suspendió en agua.

El ADN obtenido de leucocitos humanos (151 ng/µL) se mezcló con PBS (1X, 5 mM, pH 7.4), los compuestos a ensayar (50 y 100 µM, 10 µL) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2.5 mM, 6 µL). La mezcla se

homogeneizó e irradió con luz UV (254 nm, 5 min, 22 °C). Luego, se le adicionó buffer de carga (6 X, consistente en azul de bromofenol azul (0.03 %), xileno cianol FF (0.03 %), EDTA (60 mM), pH 7.6 y glicerol (60 %), 6 µL) y se analizó por electroforesis en gel agarosa (1 %) en buffer de tris-borato (1X, 45 mM, 1 mM EDTA) y GelRed® como agente revelador (0.5 µL). Para ello, se colocó cada muestra en un carril de los pozos del gel, incluyendo ADN sin tratar como control de cada corrida electroforética (80 V/cm, 1 h, T ambiente). Al término de ésta, el gel de agarosa fue fotografiado en un equipo VisionWorksLS (UVP®, CA, USA) y la intensidad de las bandas de ADN fue cuantificada por densitometría.

#### **4.4.4 Determinación de la posible penetración cutánea de los liquenoquímicos aislados**

Es deseable que, durante la etapa de descubrimiento y desarrollo, las moléculas que van a ejercer su acción tópica a nivel cutáneo cumplan con parámetros fisicoquímicos que den cuenta de su desempeño para atravesar o distribuirse en el estrato córneo de la piel y llevar a cabo su efecto local sin ser absorbidos a circulación sistémica. Los parámetros que se proponen en este sentido son la lipofilicidad, el área de superficie polar topológica (TPSA), el peso molecular y el número de anillos aromáticos que presentan en la estructura dichos compuestos (Santos, et al., 2021).

La lipofilicidad es un parámetro que indica la afinidad relativa que puede presentar un futuro agente dermatológico por las capas lipofílicas de la piel (particularmente la epidermis y su estrato córneo) o por el medio acuoso que lo rodea (Santos, et al., 2021). En este sentido, el carácter lipofílico de una molécula se puede establecer a partir de su coeficiente de reparto (P), que resulta de la relación de su concentración en un sistema compuesto por dos fases inmiscibles entre sí en equilibrio a una temperatura dada (Santos, et al., 2021). Para fines biológicos, el sistema de fases inmiscibles que suele emplearse está compuesto por *n*-octanol y agua que asemeja a una membrana biológica. P se expresa mediante la ecuación 4-11 (Bharate, et al., 2016; Silverman & Holladay, 2014):

$$P = \frac{C_o}{C_w}$$

Donde,  $C_o$ : concentración de un soluto en la fase orgánica.  $C_w$ : concentración del mismo soluto en la fase acuosa.

Con fines prácticos,  $P$  se expresa como el logaritmo en base 10 de  $P$  (LogP) para dar indicios de la lipofilia de una molécula. Moléculas con valor de LogP entre 1 y 4 poseen lipofilia adecuada para ejercer su acción tópica a nivel cutáneo (Santos, et al., 2021).

De manera adicional, la energía libre de Gibbs de transferencia ( $\Delta G_{o \rightarrow w}^{-\theta}$ ) es un parámetro asociado con  $P$  (ecuación 4-12) que indica la viabilidad termodinámica que presenta el proceso del paso de un mol de compuesto, desde una fase hidrofílica a una lipofílica en un sistema en equilibrio a una temperatura dada mediante un mecanismo de difusión pasiva.

$$\Delta_t G_{o \rightarrow w}^{-\theta} = -RT \ln P$$

**Ec. 4-12**

Donde,  $R$  es la constante universal de los gases ( $8.314 \text{ J / mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ),  $T$  es la temperatura absoluta en kelvin y  $P$  es el coeficiente de reparto.

Considerando que un agente dermatológico va a ejercer su efecto a nivel tópico, éste debe difundirse pasivamente en la matriz lipídica intercelular de la epidermis (particularmente en su estrato córneo de naturaleza lipofílica), por lo que valores negativos de la energía libre de Gibbs indicarían la favorabilidad termodinámica del proceso, es decir que se favorece el paso del agente hacia el estrato córneo por un mecanismo de difusión pasiva.

Por su parte, la TPSA de una molécula, es un parámetro muy útil para predecir sus propiedades de transporte pasivo a través de membranas. Esta se define como la suma de las superficies de los átomos polares (generalmente oxígeno, nitrógeno e hidrógeno) en una molécula y correlaciona con los enlaces de hidrógeno (tanto donadores como aceptores) que puede formar la molécula siendo inversa a su lipofilidad. Para que una molécula destinada a uso tópico en dermatología pueda presentar un óptimo desempeño, es deseable que su TPSA  $\leq 100 \text{ \AA}^2$  (Santos, et al., 2021).

Respecto al peso molecular de los compuestos y el número de anillos aromáticos en su estructura, se ha establecido que un valor  $\leq 500 \text{ Da}$  y un número menor o igual a 2 anillos es adecuado para un desempeño óptimo como posible agente dermatológico tópico (Santos, et al., 2021).

La determinación de estos parámetros fisicoquímicos para los compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma* se realizó *in silico* usando los programas computacionales

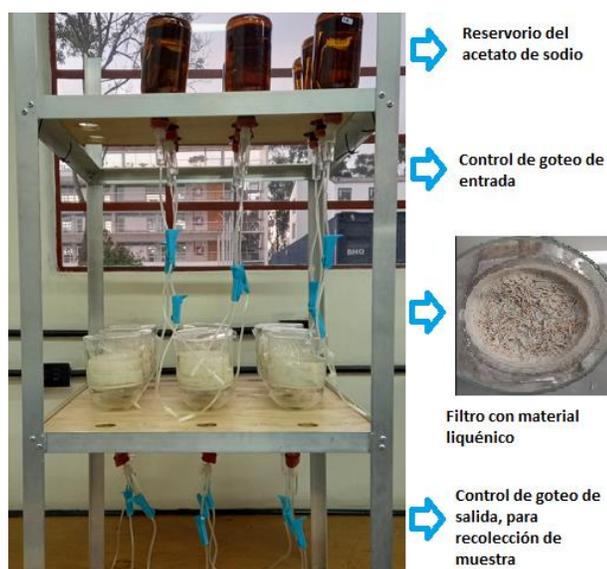
SwissADME (Daina, et al., 2017) y Molinspiration (Ertl, et al., 2000). Estos programas emplean bases de datos de estructuras moleculares y sus propiedades fisicoquímicas *in vitro*, las cuales fueron comparadas con las moléculas en estudio, y así cada uno de los programas calculan cada uno de los parámetros.

Para el cálculo de estos parámetros, las estructuras moleculares de los compuestos se cargaron a los diferentes programas en línea, ya sea a través de su código SMILES o construyendo la estructura en la interfaz que poseen éstos.

## **4.5 Bioproducción de compuestos liquénicos por inmovilización celular**

La técnica biotecnológica que se trabajó en el presente estudio para la posible bioproducción de metabolitos secundarios por el líquen, fue la inmovilización celular en matriz sólida con flujo continuo. Para ello, se construyó el equipo de la Figura 4-6. Los talos liquénicos (3.0 g peso seco) de *T. vermicularis* se lavaron con agua doblemente destilada y se cortaron en trozos (ca. 1 cm de largo), luego se mezclaron con la matriz sólida (caolín grado USP, 30 g, previamente hidratada con agua destilada por 2 h) y la mezcla resultante se adicionó dentro del biorreactor (un embudo de vidrio con frita de vidrio sinterizado: cap. ca. 200 mL, diámetro interno ca. 10.0 cm) colocando previamente un disco de papel filtro en el fondo del biorreactor antes de la adición de la mezcla (Martins, et al., 2017).

Los biorreactores fueron suplementados continuamente con solución de acetato de sodio (0.1, 1.0 y 10 mM, pH 8, ajustado con NaOH) a temperatura ambiente bajo fotoperiodos de luz natural (Figura 4-6). Para la adición de esta solución se empleó un equipo de venocllisis con goteo continuo controlado (+/- 0.02 mL /min x 24 h). A la salida del biorreactor (cola del embudo) también se adaptó un equipo de venocllisis para permitir la salida controlada del producto de bioproducción (30 mL / 24 h), el cual fue recibido en matraces Erlenmeyer (50 mL).



**Figura 4-6:** Equipo para bioproducción de metabolitos de líquenes mediante inmovilización de talos líquénicos.

El producto de bioproducción (ca. 30 mL) fue colectado cada 24 h durante los primeros 7 días del ensayo. Posteriormente, este mismo volumen se colectó semanalmente (hasta 5 semanas). A fin de obtener los diferentes grupos de metabolitos bioproducidos, las muestras colectadas se procesaron por extracción líquido-líquido empleando dos mezclas de disolventes con diferente polaridad. Para ello, las muestras inicialmente se extrajeron con una mezcla de  $\text{Et}_2\text{O}:\text{AcOEt}$  (60:40, 3 x 10 mL) y luego con  $\text{CHCl}_3:\text{AcN}$  (65:35, 3 x 10 mL). Las fases orgánicas se combinaron de acuerdo con su polaridad y posteriormente se llevaron a sequedad. Los residuos se re-constituyeron en la mezcla de extracción correspondiente (2 mL) para ser analizados y cuantificados por espectrofotometría ( $\lambda$  366 nm) (Pereira, et al., 2017).

De manera adicional, se llevó a cabo el seguimiento de la bioproducción de compuestos por CCD. Para ello, los residuos de extracción líquido-líquido (5 - 10  $\mu\text{L}$  aprox.) se aplicaron sobre cromatofolios de gel de sílice y se eluyeron en el sistema C (Tabla 4-2) revelando con luz UV a  $\lambda$  254 y 366 nm y con ácido sulfúrico al 10 %.

Considerando que el ácido descarboxithamnólico (**1**) fue el compuesto mayoritario en el líquen *T. vermicularis* y que a su vez este compuesto fue el que presentó la mayor actividad antioxidante, fotoprotectora y propiedades fisicoquímicas adecuadas para un desempeño óptimo como agente dermatológico, este se escogió para llevar a cabo su bioproducción

empleándose como estándar para la cuantificación de los metabolitos bioproducidos por *T. vermicularis*.

Para cuantificar los metabolitos bioproducidos, se construyeron curvas de calibración de **1** disuelto en las mezclas de disolventes empleadas para la extracción (5 - 300 ppm). La cantidad de metabolitos bioproducidos está expresada como mg equivalentes de ácido descarboxithamnólico / mg de residuo. Asimismo, al final del estudio se hizo la cuantificación del total de **1** bioproducido en cada tratamiento mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) empleando el método descrito en el punto 4.3.1.

La viabilidad del talo líquénico durante el tiempo del ensayo se verificó mediante la técnica modificada de tinción de rojo neutro (Finter, 1969). Para ello, un pedazo del talo inmovilizado de cada uno de los biorreactores fue retirado al inicio y al final del ensayo y fue cortado transversalmente con una cuchilla de bisturí. El corte resultante se colocó sobre un portaobjetos y se le adicionó rojo neutro (1%, 1 gota, ca. 15 min), retirando el exceso del colorante por goteo de agua. Las muestras teñidas se observaron al microscopio (40X) y se fotografiaron para su análisis. El rojo neutro es un colorante vital, que solo puede colorear las células que tienen la función de la membrana intacta. Por lo tanto, aquellos talos con células capaces de retener el colorante se observaron coloreados (rojo) y se consideraron viables según la metodología de Finter (1969), la cual fue modificada para llevar a cabo la determinación de manera cualitativa.

## 4.6 Análisis Estadístico

Los resultados fueron el resultado del promedio de dos a tres determinaciones independientes y los valores se expresan como media  $\pm$  desviación estándar, o  $\pm$  error estándar. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) para la comparación de medias utilizando el software Real Statistics Resource Pack (versión 7.2) («Real Statistics Resource Pack» 2021).

## 5. Resultados y discusión

### 5.1 Selección de las especies *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia* cf. *didyma*

Las especies estudiadas fueron seleccionadas tomando como base los resultados del tamizaje del poder captador de radicales libres ( $CE_{50}$  (mg muestra / mg DPPH•)) y capacidad fotoprotectora *in vitro* frente a la radiación UVB (FPS) de los extractos acetónicos de los HL *Lobariella sipmanii* ( $CE_{50} = 2.13$  y FPS = 29.25), *Everniastrum cirrhatum* ( $CE_{50} = 5.95$  y FPS = 31.74), *Peltigera nepolydactyla* ( $CE_{50} = 6.40$  y FPS = 8.71), *Thamnolia vermicularis* ( $CE_{50} = 0.9338$  y FPS = 21.19) y *Cladonia* cf. *didyma* ( $CE_{50} = 1.140$  y FPS = 19.43), siendo *T. vermicularis* y *C. cf. didyma* las seleccionadas para este estudio dada la actividad dual prometedoras que presentaron sus extractos. Asimismo, cabe mencionar que todas estas especies están presentes en el páramo de Sumapaz, un ecosistema de alta montaña (3500 - 4700 m s.n.m.) que posee condiciones ambientales extremas, entre ellas, elevada exposición a la radiación UV (asociada con estrés oxidativo) con cambios extremos de temperatura y humedad impredecibles, que pueden favorecer que estos organismos biosinteticen metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes y/o fotoprotectoras que les permitan protegerse frente a tales condiciones ambientales (Nash 2008; Ranković 2015).

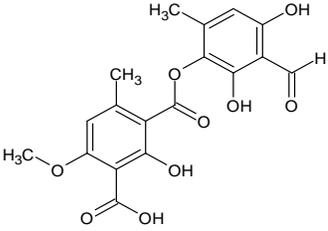
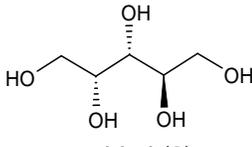
### 5.2 Estudio químico de *Thamnolia vermicularis*

#### 5.2.1 Obtención de las sustancias líquénicas

El HL seco y pulverizado se extrajo con  $Me_2CO$ , empleando Soxhlet a presión reducida hasta agotamiento del material. Durante este proceso precipitó un sólido que se filtró y purificó por recristalización sucesiva con *n*-Hex: $CHCl_3$  (70:30) y  $Me_2CO$  (100%) dando lugar al ácido descarboxithamnólico (1). El extracto restante se sometió a partición líquido - líquido con disolventes de diferente polaridad obteniendo 5 fracciones primarias (FI, FII, FIII, FIV, y FV). A partir de FII (proveniente de la partición del extracto con  $H_2O$ ) se purificó al arabitól (2) por CCD preparativa como se indicó en la sección experimental 4.3.4.2. Adicionalmente a partir de FIII (proveniente de la partición del extracto con  $Me_2CO:MeOH$ ),

se obtuvo mayor cantidad de **1** (sección experimental 4.3.4.21). El estudio químico de *T. vermicularis* condujo a la obtención del dépsido ácido descarboxithamnólico (**1**), y del poliol arabitol (**2**), ambos previamente reportados para la especie (Castro, et al., 2010; Guo, et al., 2011; Xian, et al., 2013) siendo **1** el metabolito mayoritario en este estudio (Tabla 5-1).

**Tabla 5-1:** Compuestos obtenidos de *Thamnolia vermicularis*.

Compuesto	Peso (mg)	Rendimiento (%)*	Origen
 <p>ácido descarboxithamnólico (<b>1</b>)</p>	1949	3.20	Precipitado durante extracción y FIII
 <p>arabitol (<b>2</b>)</p>	39.8	0.065	FII

\*Expresado como porcentaje de masa de compuesto aislado respecto del material líquénico seco de partida (60.7987 g).

## 5.2.2 Caracterización estructural de los compuestos

La estructura química de los compuestos obtenidos de *T. vermicularis* fue determinada a partir de la comparación de sus constantes físicas y datos espectroscópicos de IR, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en experimentos uni- y/o bidimensionales con los reportados en la literatura para dichos compuestos (Wong, et al., 1995; Huneck, et al., 1996; Díaz-Santos, 2008).

### 5.2.2.1 Ácido descarboxithamnólico (1)

El espectro de absorción al IR de **1** (Figura 6-1, anexo) presentó bandas características para grupo hidroxilo ( $3395\text{ cm}^{-1}$ ), aromaticidad ( $1628$  y  $1577\text{ cm}^{-1}$ ), grupos carbonilo ( $1744$  y  $1655\text{ cm}^{-1}$ ) y enlaces C-O de éster y/o éter ( $1281$  y  $1180\text{ cm}^{-1}$ ). El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Tabla 5-2, Figura 6-2, anexo) evidenció la presencia de señales para dos metilos sobre anillo aromático ( $\delta_{\text{H}}$  2.20 y 2.52) y un metoxilo ( $\delta_{\text{H}}$  3.88); para dos hidrógenos aromáticos

( $\delta_H$  6.37 y 6.64) y para hidrógenos de aldehído ( $\delta_H$  10.21) y de fenol asociado por puente de hidrógeno a un grupo carbonilo ( $\delta_H$  11.03).

El espectro de RMN  $^{13}C$  de **1** (Tabla 5-2, Figura 6-3, anexo) permitió establecer dieciocho átomos de carbono diferentes en la molécula, de los cuales doce son de naturaleza aromática ( $\delta_C$  105.4 - 161.1), dos son metilos sobre anillo aromático ( $\delta_C/\delta_H$  21.9/ 2.52 (C-9/H-9), y 17.5/2.20 (C-9'/H-9')), uno es un metoxilo ( $\delta_C/\delta_H$  56.7/3.88 OCH<sub>3</sub>-4) y tres son carbonos carbonílicos: uno de éster ( $\delta_C$  166.5 (C-7), otro de ácido carboxílico ( $\delta_C$  170.2 (C-8)) y otro de formilo ( $\delta_C/\delta_H$  194.5/10.21 (C-8')). De los doce carbonos aromáticos, cinco son geminales a función oxigenada ( $\delta_C$  161.1 (C-2), 153.6 (C-4), 160.4 (C-2'), 159.4 (C-4'), 142.9 (C-5')), tres son geminales a carbonilo ( $\delta_C$  106.0 (C-1), 105.4 (C-3), 107.8 (C-3')), dos son geminales a metilo ( $\delta_C$  144.7 (C-6) y 128.9 (C-6')) y dos son metinos ( $\delta_C$  109.4 (C-5) y 111.9 (C-1')).

**Tabla 5-2:** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido descarboxithamnólico (**1**)

Posición	$\delta_C$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult., J (Hz)	
	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>
1	111.9	111.4	-	-
2	161.1	159.8	-	-
3	105.4	104.8	-	-
4	159.4	160.5	-	-
5	109.4	105.5	6.64, 1H, s	6.64, 1H, s
6	144.7	144.2	-	-
7	166.5	165.9	-	-
8	170.2	169.6	-	-
9	21.9	21.4	2.52, 3H, s	2.51, 3H, s
1'	106.0	107.3	6.37, 1H, s	6.36, 1H, s
2'	160.4	158.9	-	-
3'	107.8	108.8	-	-
4'	153.6	153.0	-	-
5'	142.9	142.4	-	-

**Tabla 5-2 (cont.):** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido descarboxithamnólico (1)

Posición	$\delta_c$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult., J (Hz)	
	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>
6'	128.9	128.4	-	-
8' (CHO)	194.5	193.9	10.21, 1H, s	10.20, 1H, s
9'	17.5	16.9	2.20, 3H, s	2.19, 3H, s
CH <sub>3</sub> -O	56.7	56.2	3.88, 3H, s	3.87, 3H, s
4'-OH	-	-	11.03, 1H, s	11.02, 1H, s

<sup>a</sup>Experimental registrado en DMSO-d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C, 101 MHz);  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup>Reportado registrado en DMSO-d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C 101 MHz) (Díaz M, et al., 2008).

Las constantes físicas y espectroscópicas de **1** coinciden con lo reportado en la literatura (Tabla 5-2) para el ácido descarboxithamnólico, un dépsido biosintetizado por la ruta del acetato polimalonato reportado previamente para la especie *Thamnolia vermicularis* (Castro, et al., 2010; Guo, et al., 2011), que además es muy abundante en la misma.

### 5.2.2.2 Arabitol (2)

El espectro de RMN <sup>1</sup>H (Tabla 5-3, Figura 6-4, anexo) para el compuesto **2** presentó señales características para dos metilenos ( $\delta_H$  3.38 y 3.46) y tres metinos ( $\delta_H$  3.66, 3.46 y 3.56) geminales a grupos hidroxilo. El espectro de RMN <sup>13</sup>C (Tabla 5-3, Figura 6-5, anexo) presentó señales para cinco carbonos alifáticos geminales a hidroxilos que mediante el espectro bidimensional HMQC (Figura 6-6, anexo) se asignaron con sus correspondientes hidrógenos:  $\delta_c/\delta_H$  63.4/3.38 (C-1/H-1), 64.2/3.46 (C-5/H-5), 71.1/3.66 (C-2/H-2), 72.0/3.46 (C-3/H-3), y 70.2/3.56 (C-4/H-4).

**Tabla 5-3:** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el arabitól (2)

Posición	$\delta_c$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult., J (Hz)	
	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>
1	63.4	63.2	3.38, 2H, s	3.84, 2H, dd, J = 2.89, 11.64
2	71.1	70.7	3.66, 1H, s	3.93, 1H, td, J = 3.95, 6.26
3	72.0	71.5	3.46, 1H, s	3.75, 1H, t, J = 2.89, 6.26
4	70.2	70.6	3.56, 1H, s	3.67, 1H, td, J = 6.26, 12.47
5	64.2	65.8	3.46, 2H, s	3.58, 2H, d, J = 2.10, 8.31

<sup>a</sup>Experimental registrado en DMSO-d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C, 101 MHz);  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup> Reportado registrado en DMSO-d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C, 101 MHz) (Perico-Franco, 2011).

Las constantes físicas y espectroscópicas de **2** coinciden con lo reportado en la literatura (Tabla 5-3) para el arabitol, un metabolito primario tipo polirol reportado previamente para la especie *T. vermicularis* (Choi, et al., 2017).

## 5.3 Estudio químico de *Cladonia cf. didyma*

### 5.3.1 Obtención de las sustancias liquénicas

El líquen *C. cf. didyma* pulverizado se extrajo con acetona utilizando Soxhlet. El extracto se lavó con *n*-Hex y después se sometió a CC abierta como se indicó en la sección experimental (4.3.6) dando lugar a 20 fracciones combinadas (FII-1-FII-20). La fracción FII-1 fue sometida a CC abierta obteniendo 10 fracciones combinadas (FII-1-1, FII-1-10). A partir de la fracción FII-1-3 se obtuvo por recristalización de mezcla de Me<sub>2</sub>CO:MeOH (1:1) al 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxiergosteril divaricatinato (**3**). La fracción primaria FII-3 fue sometida a CC por exclusión de tamaño molecular según se indicó en la sección experimental (4.3.7.3), dando como resultado 7 fracciones combinadas (FII-3-1 a FII-3-7). A partir de la fracción FII-3-5 precipitó el ácido condidymico (**5**) como un sólido color blanco. El ácido barbático (**4**) se obtuvo de la fracción primaria FII-11 que fue sometida a CC por exclusión de tamaño molecular eluyendo según se describió en la sección 4.3.7.2. Este proceso condujo a la obtención de 7 fracciones combinadas (FII-11-1 a FII-11-7) y a partir de la fracción FII-11-6 precipitó **4**. Finalmente, a partir de la recristalización de Me<sub>2</sub>CO de la fracción FII-4 se obtuvo al ácido isodidymico (**6**).

**Tabla 5-4:** Compuestos aislados de *Cladonia cf. didyma*

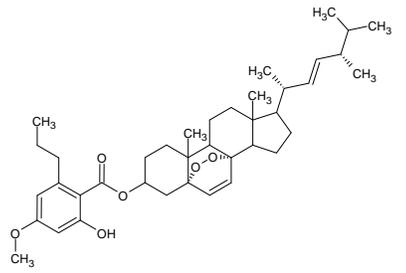
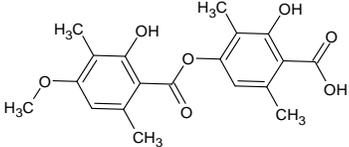
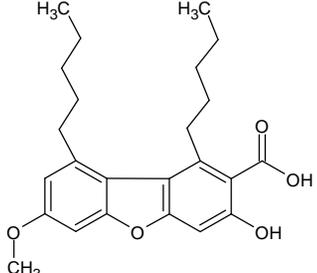
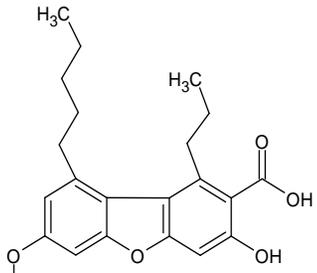
Compuesto	Peso (mg)	Rendimiento (%)*	Origen
 <p>5<math>\alpha</math>,8<math>\alpha</math>-peroxiergosteril divaricatinato (<b>3</b>)</p>	31.1	0.045	FII-1-3

Tabla 5-4 (cont.): Compuestos aislados de *Cladonia* cf. *didyma*

Compuesto	Peso (mg)	Rendimiento (%)*	Origen
 <p>ácido barbático (4)</p>	10.3	0.015	FII-11-6
 <p>ácido condidymico (5)</p>	12.1	0.017	FII-3-5
 <p>ácido isodidymico (6)</p>	13.5	0.019	FII-4

\*El rendimiento se expresa como porcentaje en masa de compuesto aislado respecto del material liquénico seco de partida (69.8205 g).

### 5.3.2 Caracterización estructural de los compuestos

La estructura química de los compuestos obtenidos de *C. cf. didyma* fue determinada a partir de la comparación de sus constantes físicas y datos espectroscópicos de IR, RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en experimentos uni- y/o bidimensionales y/o espectrométricos con los reportados en la literatura (Huneck, 1999; Nowak, et al., 2016).

### 5.3.2.1 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (**3**)

El espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **3** (Tabla 5-5; Figura 6-8, anexo) mostró dos dobletes para hidrógenos de olefina cíclica ( $\delta_{\text{H}}$  6.12 (H-6) y 6.08 (H-7)) y alifática ( $\delta_{\text{H}}$  5.36 (H-22) y 5.26 (H-23)), respectivamente, así como señales de hidrógeno para metilos, metilenos y metinos característicos de núcleo esteroidal ( $\delta_{\text{H}}$  0.50 - 2.50, *m*) y una señal para un metino geminal a una función oxigenada ( $\delta_{\text{H}}$  4.15 (H-3)). Adicionalmente se observaron señales para dos hidrógenos de tipo aromático ( $\delta_{\text{H}}$  6.77 (H-6') y 6.91 (H-4')) y un metoxilo  $\delta_{\text{H}}$  3.89 (CH<sub>3</sub>-O-5').

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **3** (Tabla 5-5; Figura 6-9, anexo) corroboró la presencia de la olefina cíclica ( $\delta_{\text{C}}$  130.0 (C-6) y 129.8 (C-7)) y alifática ( $\delta_{\text{C}}$  128.0 (C-22) y 125.8 (C-23)) así como de los metilos angulares ( $\delta_{\text{C}}$  18.3 (C-18), 16.9 (C-19)), metilenos y metinos del núcleo esteroidal ( $\delta_{\text{C}}$  21.1 - 46.5); del metino base de oxígeno ( $\delta_{\text{C}}$  62.1 (C-3)) y de un grupo epóxido ( $\delta_{\text{C}}$  68.9 (C-5) y 79.0 (C-8)). Asimismo, se observan señales para metinos aromáticos ( $\delta_{\text{C}}$  93.9 (C-4') y 113.5 (C-6')), un carbonilo de tipo éster ( $\delta_{\text{C}}$  173.3 (C-7')) y para un metoxilo ( $\delta_{\text{C}}$  55.6 (CH<sub>3</sub>-O-5')).

A partir de las correlaciones H $\rightarrow$ C observadas en el espectro bidimensional HMBC de **3** (Tabla 5-5; Figura 6-11, anexo): a) H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4.17) con C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  29.1) y C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  68.9); b) H-9 o H-11 o H-14 (*ca.*  $\delta_{\text{H}}$  0.7) con C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  79.0); c) H-22 ( $\delta_{\text{H}}$  5.36) con C-21 ( $\delta_{\text{C}}$  20.9) y d) H-23 ( $\delta_{\text{H}}$  5.26) con C-24 ( $\delta_{\text{C}}$  39.6); se corroboró que **3** tiene en su estructura la 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril (Nowak, et al., 2016). A partir de las correlaciones H $\rightarrow$ C observadas en el mismo espectro: e) H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4.17) con C-7' ( $\delta_{\text{C}}$  173.3); f) H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  6.91) con C-5' ( $\delta_{\text{C}}$  160) y C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  113.5) y g) H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  6.77) con C-5' ( $\delta_{\text{C}}$  160) y con C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  93.9), se determinó que **3** estaba sustituido con un grupo divaricatinato en C-3 (Tatipamula et al., 2019). Las constantes físicas y espectroscópicas de **3** coinciden con las descritas en la literatura para el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato, un esteroil biosintetizado por la ruta del acetato mevalonato que ha sido reportado para HL (Huneck, et al., 1996) y que hasta donde tenemos conocimiento es por primera vez reportado para *C. cf. didyma*.

**Tabla 5-5:** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxiergosteril divaricatinato (3)

Posición	$\delta_c$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult., J (Hz)		HMBC	
	Exp. <sup>a</sup>	Rep.	Exp. <sup>a</sup>	Rep.	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>
1	28.0	34.7 <sup>b</sup>	0.50 - 2.50, 46H, <i>m</i>	1.73, 24H, <i>dd</i> , J = 13.8, 3.4 <sup>b</sup>		C-2, C-3, C-5, C-6, C-10, C-19
2	29.1	30.1 <sup>b</sup>	0.50 - 2.50, 46H, <i>m</i>			
3	62.1	66.5 <sup>b</sup>	4.17, 1H, <i>m</i>	3.98, 1H, <i>m</i> <sup>b</sup>	C-2, C-5, C-7'	
4	37.2	37.0 <sup>b</sup>	0.50 - 2.50, 46H, <i>m</i>			
5	68.9	82.2 <sup>b</sup>	-			
6	130.0	135.4 <sup>b</sup>	6.12, 1H, <i>s</i>	6.25, 1H, <i>d</i> , J = 8.5 <sup>b</sup>		C-5, C-8, C-10
7	129.8	130.8 <sup>b</sup>	6.08, 1H, <i>s</i>	6.52, 1H, <i>d</i> , J = 8.6 <sup>b</sup>		C-5, C-8, C-9, C-14
8	79.0	79.4 <sup>b</sup>	-			
9	46.5	51.1 <sup>b</sup>	-		C-8	C-7, C-8
10	45.8	36.9 <sup>b</sup>	-			
11	29.2	20.6 <sup>b</sup>	0.50 - 2.50, 46H, <i>m</i>	1.23; 1.55, 24 H, <i>m</i> <sup>b</sup>		
12	29.6	39.4 <sup>b</sup>	0.50 - 2.50, 46H, <i>m</i>	1.27; 1.98, 24 H, <i>m</i> <sup>b</sup>		
13	31.9	44.6 <sup>b</sup>	-	-		
14	34.0	51.7 <sup>b</sup>	0.50 - 2.50, 46H, <i>m</i>	1.59, 24 H, <i>m</i> <sup>b</sup>	C-8	C-6, C-7, C-8, C-9, C-13
15	21.1	23.4 <sup>b</sup>	0.50 - 2.50, 46H, <i>m</i>	1.42; 1.66, 24 H, <i>m</i> <sup>b</sup>		
16	22.7	28.7 <sup>b</sup>	0.50 - 2.50, 46H, <i>m</i>	1.33; 1.81, 24 H, <i>m</i> <sup>b</sup>		C-13, C-14, C-18; C-18
17	27.1	56.2 <sup>b</sup>	0.50 - 2.50, 46H, <i>m</i>	1.25, 1H, <i>m</i> <sup>b</sup>		C-12, C-16
18	18.3	12.9 <sup>b</sup>	0.50 - 2.50, 46H, <i>m</i>	0.83, 1H, <i>s</i> <sup>b</sup>		C-13, C-14, C-17
19	16.9	18.2 <sup>b</sup>	0.50 - 2.50, 46H, <i>m</i>	0.89, 1H, <i>s</i> <sup>b</sup>		C-1, C-5, C-9, C-10
20	-	39.7 <sup>b</sup>	-	2.05, 1H, <i>m</i> <sup>b</sup>		
21	-	20.9 <sup>b</sup>	-	1.00, 1H, <i>d</i> , J = 6.7 <sup>b</sup>		C-17, C-20, C-22

**Tabla 5-5 (cont.):** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxiesterol divaricatinato (3)

Posición	$\delta_c$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult., J (Hz)		HMBC	
	Exp. <sup>a</sup>	Rep.	Exp. <sup>a</sup>	Rep.	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>
22	128.0	135.2 <sup>b</sup>	5.36, 1H, s	5.16, 1H, <i>dd</i> , J = 7.5, 15.3 <sup>b</sup>	C-21	C-17, C-21, C-23, C-24
23	125.8	132.3 <sup>b</sup>	5.26, 1H, s	5.14, 4H, <i>dd</i> , J = 8.0, 15.3 <sup>b</sup>	C-24	C-20, C-22, C-24, C-28
24	-	42.8 <sup>b</sup>	-	1.86, 1H, <i>m</i> <sup>b</sup>		C-22, C-23, C-25, C-26, C-27, C-28
25	-	33.1 <sup>b</sup>	-	1.6, 1H, <i>m</i> <sup>b</sup>		C-24, C-26, C-27
26	-	19.6 <sup>b</sup>	-	0.82, 1H, <i>d</i> , J = 6.8 <sup>b</sup>		C-24, C-25, C-27
27	-	20.0 <sup>b</sup>	-	0.83, 1H, <i>d</i> , J = 6.6 <sup>b</sup>		C-24, C-25, C-26
28	-	17.6 <sup>b</sup>	-	0.91, 1H, <i>d</i> , J = 6.8 <sup>b</sup>		C-24, C-24, C-25
4'	93.9	99.5 <sup>c</sup>	6.91, 1H, s	6.39, 1H, <i>d</i> <sup>c</sup>	C-5', C-6'	
6'	113.5	109.5 <sup>c</sup>	6.77, 1H, s	6.41, 1H, <i>d</i> <sup>c</sup>	C-4', C-5'	
7'	173.3	166.7 <sup>c</sup>	-	-		
3''	14.1	14.5 <sup>c</sup>	-	0.88, 1H, <i>s</i> <sup>c</sup>		
CH <sub>3</sub> -O-5'	55.6	55.8 <sup>c</sup>	3.89, 3H, s	3.78, 3H, <i>s</i> <sup>c</sup>		

<sup>a</sup>Experimental registrado en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 400 MHz, <sup>13</sup>C 101 MHz);  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup>Reportado registrado en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 60 MHz; <sup>13</sup>C 100 MHz) (Huneck, et al., 1996, Nowak, et al., 2016); <sup>c</sup>Registrado en DMSO-d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C 100 MHz) (Tatipamula, et al., 2019).

### 5.3.2.2 Ácido barbático (4)

El espectro de RMN <sup>1</sup>H de **4** (Tabla 5-6; Figura 6-12, anexo) presentó ocho señales simples indicativas de la presencia de cuatro metilos sobre anillo aromático ( $\delta_H$  1.91, 3H; 2.01, 3H; 2.55, 3H y 2.58, 3H), un metoxilo ( $\delta_H$  3.87, 3H), dos metinos aromáticos ( $\delta_H$  6.60, 1H y 6.29, 1H) y un fenol asociado por puente de hidrógeno a un grupo carbonilo ( $\delta_H$  10.98, 1H).

El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de **4** (Tabla 5-6; Figura 6-13, anexo) indicó diecinueve carbonos diferentes en la molécula, siete de ellos corresponden a carbonos hidrogenados de cuatro metilos sobre el anillo aromático, a un metoxilo y a dos metinos aromáticos, tal y como lo permitieron establecer las correlaciones observadas en el espectro HMQC (Figura 6-14) ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  23.8/2.58 (C-9/H-9), 9.8/2.01 (C-8/H-8), 8.5/1.91 (C-8'/H-8'), 23.4/2.55 (C-9'/H-9'), 56.2/3.87 (4-OCH<sub>3</sub>), 113.0/6.29 (C-5'/H-5') y 106.8/6.60 (C-5/H-5). Asimismo, se aprecian dos carbonilos, uno de éster ( $\delta_{\text{C}}$  169.7) y otro de ácido carboxílico ( $\delta_{\text{C}}$  173.6) y diez carbonos aromáticos cuaternarios, de los cuales cuatro son geminales a funciones oxigenadas ( $\delta_{\text{C}}$  150.0, 160.3, 161.5 y 164.5) permitiendo deducir la presencia de dos anillos aromáticos polisustituidos.

**Tabla 5-6:** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido barbático (**4**)

Posición	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)		$\delta_{\text{H}}$ (ppm) integración, mult., J (Hz)		HMBC
	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>
1	107.3	111.1	-		
2	161.5	154.2	-		
3	110.4	105.8	-		
4	160.3	164.7			
5	106.8	108.1	6.60, 1H, s	6.58, 1H, s	C-1, C-3, C-4, C-9
6	139.5	141.7			
7	169.7	171.4			
8	9.8	8.5	2.01, 3H, s	1.99, 3H, s	C-2
9	23.8	24.3	2.58, 3H, s	2.55, 3H, s	C-5
OH-2	-	-	10.98, 1H, s	10.73, 1H, s	C-1, C-2, C-3
1'	115.7	163.8	-		
2'	164.5	111.9	-		
3'	114.5	164.0	-		
4'	150.1	117.8	-		
5'	113.0	142.4	6.29, 1H, s	6.68, 1H, s	C-1', C-4', C-9'

**Tabla 5-6 (cont.):** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido barbático (4)

Posición	$\delta_C$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult., J (Hz)		HMBC
	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>
6'	139.6	117.8	-		
7'	173.6	174.8	-		
8'	8.5	9.9	1.91, 3H, s	1.98, 3H, s	C-1', C-3'
9'	23.4	25.4	2.55, 3H, s	2.46, 3H, s	C-6', C-4', C-2'
CH <sub>3</sub> -O-4	56.2	56.7	3.87, 3H, s	3.85, 3H, s	C-4

<sup>a,b</sup>Espectro registrados en DMSO-d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C 101 MHz);  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup>Espectro registrado en DMSO-d<sub>6</sub> (<sup>1</sup>H, 270 MHz); acetona-d<sub>6</sub> (<sup>13</sup>C) (Huneck, et al., 1996).

A partir de las correlaciones H→C observadas en el espectro bidimensional HMBC de **4** (Tabla 5-6; Figura 6-15, anexo): a)  $\delta_H$  10.98 (HO-2) con  $\delta_C$  107.3 (C-1), 161.5 (C-2) y 110.4 (C-3); b)  $\delta_H$  6.60 (H-5) con  $\delta_C$  107.3 (C-1), 110.4 (C-3), 160.3 (C-4) y 23.8 (C-9); c)  $\delta_H$  2.01 (H-8) con  $\delta_C$  161.5 (C-2); d)  $\delta_H$  2.58 (H-9) con  $\delta_C$  106.8 (C-5); e)  $\delta_H$  6.29 (H-5') con  $\delta_C$  115.7 (C-1'), 150.1 (C-4') y 23.4 (C-9'); f)  $\delta_H$  1.91 (H-8') con  $\delta_C$  115.7 (C-1') y 114.5 (C-3'); g)  $\delta_H$  2.55 (H-9') con  $\delta_C$  139.6 (C-6'), 150.1 (C-4') y 164.5 (C-2') se dedujo un patrón de  $\beta$ -orcinol pentasustituido en ambos anillos aromáticos y su unión mediante un enlace éster a través de C-1 y C-3' dando lugar a un dépsido. Las constantes físicas y espectroscópicas de **4** coinciden con las descritas en la literatura para el ácido barbático, un dépsido biosintetizado por la ruta del acetato polimalonato aislado previamente de *C. cf. didyma* (Huneck, 1999).

### 5.3.2.3 Ácido condidymico (5)

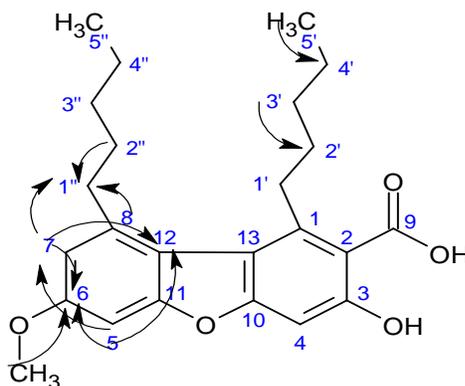
En el espectro de absorción al infrarrojo de **5** (Figura 6-16, anexo) se aprecian bandas indicativas de la presencia de grupo hidroxilo (3422 cm<sup>-1</sup>), aromaticidad (1628, 1609 y 1570), grupo carbonilo (1655 cm<sup>-1</sup>) y enlaces C-O de éster y/o éter (1250 y 1146 cm<sup>-1</sup>).

El espectro de RMN <sup>1</sup>H de **5** (Tabla 5-7; Figura 6-17, anexo) evidenció la presencia de hidrógenos para dos grupos metilos ( $\delta_H$  0.86 - 0.95, 6H) y ocho metilenos ( $\delta_H$  1.28 - 1.39, 4H y 1.60 - 1.71, 4H; 3.05, 2H y 3.53, 2H) de tipo alifático formando cadenas dada la

multiplicidad (señales múltiples) que presentan, de los cuales, los metilenos en  $\delta_H$  3.05 y 3.53 se encuentran en posición bencílica dado su valor de desplazamiento químico. Asimismo, se evidencia la presencia de un metoxilo ( $\delta_H$  3.90) y tres metinos de naturaleza aromática ( $\delta_H$  6.77, 6.89 y 6.95) en **5**.

El espectro de RMN  $^{13}C$  de **5** (Tabla 5-7; Figura 6-18, anexo) en combinación con las correlaciones observadas en su espectro bidimensional HMQC (Figura 6-19, anexo) permitieron corroborar la presencia de las cadenas alifáticas ( $\delta_C/\delta_H$  33.2/3.53 (C-1'/H-1'), 37.2/3.05 (C-1''/H-1''), 31.6 y 32.3 /1.60 - 1.71 (C-2'/H-2' y C-2''/H-2''), 31.3/1.28 - 1.39 (C-3'/H-3' y C-3''/H-3'') y 22.6/1.28 - 1.39 (C-4'/H-4' y C-4''/H-4'')); del grupo metoxilo ( $\delta_C/\delta_H$  55.6/3.90 (OCH<sub>3</sub>-6) y de dos anillos aromáticos en los que hay tres metinos ( $\delta_C/\delta_H$  97.6/6.95 (C-4/H-4), 94.0/6.89 (C-5/H-5), 113.4/6.77 (C-7/H-7)) y nueve carbonos cuaternarios, cuatro de ellos geminales a funciones oxigenadas ( $\delta_C$  150.7 (C-3), 158.7 (C-6), 158.7 (C-10 y C-11)), indicando que dichos anillos están polisustituídos. Asimismo, se dedujo la presencia de un carbonilo de ácido carboxílico ( $\delta_C$  174.0 (C-9)).

A partir de las correlaciones H→C observadas en el espectro bidimensional HMBC de **5** (Tabla 5-7; Figura 6-20, anexo): a)  $\delta_H$  1.28 - 1.39 (H-3') con  $\delta_C$  31.6 (C-2') y b)  $\delta_H$  0.86 - 0.95 (H-5') con  $\delta_C$  22.6 (C-4') y 31.3 (C-3'), se confirmó que dichas cadenas alifáticas son de cinco átomos de carbono (*n*-pentilos). Asimismo, a través de las correlaciones H→C observadas en el mismo espectro c)  $\delta_H$  6.89 (H-5) con  $\delta_C$  115.8 (C-12), 158.7 (C-6); d)  $\delta_H$  6.77 (H-7) con  $\delta_C$  94.0 (C-5) y; e)  $\delta_H$  3.05 (H-1'') con  $\delta_C$  113.4 (C-7), 138.5 (C-8) y 32.3 (C-2''), se confirmó un patrón de orcinol en ambos anillos aromáticos los cuales están sustituidos por dichas cadenas alifáticas.



**Figura 5-1:** Correlaciones observadas (H → C) en el espectro HMBC para el ácido condidymico (**5**).

Con base en datos previos (Huneck, 1999), se estableció que los anillos aromáticos se unen mediante un enlace éter entre C-10 y C-11 y carbono-carbono entre C-12 y C-13 característico de un patrón estructural dibenzofurano (Milot, et al., 2012). El espectro de masas de **5** (Figura 6-21, anexo) indicó un ion molecular de  $m/z$  398.3 que concuerda con el peso molecular del compuesto. Las constantes físicas y espectroscópicas de **5** coinciden con las descritas en la literatura para el ácido condidymico, un dibenzofurano biosintetizado por la ruta del acetato polimalonato reportado previamente para *C. cf. didyma* (Huneck, 1999).

**Tabla 5-7:** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido condidymico (**5**)

Posición	$\delta_c$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult., $J$ (Hz)		HMBC
	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>
1	138.5	139.7	-	-	-
2	119.1	117.3	-	-	-
3	150.7	158.7	-	-	-
4	97.6	97.4	6.95, 1H, s	6.98, 1H, s	-
5	94.0	95.8	6.89, 1H, s	6.80, 1H, <i>d</i> , $J = 2$	C-6
6	158.7	159.5	-	-	-
7	113.4	114.2	6.77, 1H, s	6.94, 1H, <i>d</i> , $J = 2$	C-5, C-12
8	138.5	138.7	-	-	-
9	174.0	172.3	-	-	-
10	158.7	159.7	-	-	-
11	158.7	159.2	-	-	-
12	115.8	116.4	-	-	-
13	115.8	117.8	-	-	-
1'	33.2	33.5	3.53, 2H, s	3.08, 1H, <i>m</i>	-
2'	31.6	32.8	1.60 - 1.71, 4H, <i>m</i>	1.19 - 1.96, 12H, <i>m</i>	-
3'	31.3	32.2	1.28 - 1.39, 8H, <i>m</i>	-	C-2'

**Tabla 5-7 (cont.):** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido condidymico (5)

Posición	$\delta_c$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult., J (Hz)		HMBC
	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>
4'	22.6	23.2	1.28 - 1.39, 8H, <i>m</i>	1.19 - 1.96, 12H, <i>m</i>	-
5'	14.0	13.9	0.86 - 0.95, 6H, <i>m</i>	0.82, 6H, <i>m</i>	C-4', C-3'
1''	36.9	39.3	3.05, 2H, <i>s</i>	3.50, 2H, <i>m</i>	C-2'', C-7, C-8
2''	32.3	25.6	1.60 - 1.71, 4H, <i>m</i>	1.19 - 1.96, 12H, <i>m</i>	-
3''	31.3	-	1.28 - 1.39, 8H, <i>m</i>	-	-
4''	22.6	-	1.28 - 1.39, 8H, <i>m</i>	1.19 - 1.96, 12H, <i>m</i>	-
5''	14.0	14.3	0.86 - 0.95, 6H, <i>m</i>	1.14, 6H, <i>m</i>	-
CH <sub>3</sub> -O-6	55.6	55.9	3.90, 3H, <i>s</i>	3.96, 3H, <i>s</i>	C-6

<sup>a</sup> Espectro registrados en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 400 MHz, <sup>13</sup>C 101 MHz);  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup> Espectro registrado en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C, 100 MHz) (Huneck, et al., 1996).

### 5.3.2.4 Ácido isodidymico (6)

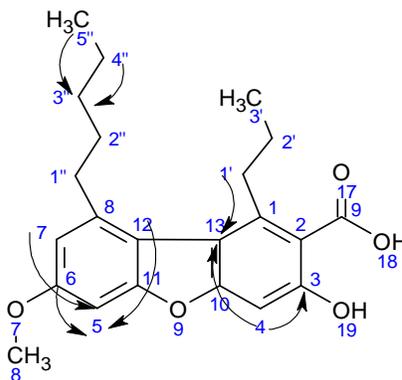
En el espectro de absorción al infrarrojo de **6** (Figura 6-22, anexo) se aprecian bandas indicativas de la presencia de grupo hidroxilo (3422 cm<sup>-1</sup>), aromaticidad (1655 y 1462), grupo carbonilo (1736 cm<sup>-1</sup>) y enlaces C-O de éster y/o éter (1199 y 1161 cm<sup>-1</sup>).

El espectro de RMN <sup>1</sup>H de **6** (Tabla 5-8; Figura 6-23, anexo) es muy similar a él del ácido condidymico (**5**), difiriendo de éste en la región de los hidrógenos alifáticos, en donde presenta señales solo para seis metilenos ( $\delta_H$  1.28 - 1.40, 4H y 1.64 - 1.76, 4H, 3.07, 2H y 3.54, 2H) en lugar de ocho, dando indicios de que al menos una de las cadenas alifáticas sobre los anillos aromáticos es diferente en tamaño a la de **5**.

El espectro de RMN <sup>13</sup>C de **5** (Tabla 5-8; Figura 6-24, anexo) en combinación con las correlaciones observadas en sus espectros bidimensionales COSY y HMQC (Figuras 25 y 26, anexo) corroboraron que una de las cadenas alifáticas posee tres átomos de

carbono ( $\delta_C/\delta_H$  34.9/3.54 (C-1'/H-1'), 25.8/1.64 - 1.76 (C-2'/H-2') y 14.0/0.83 - 0.9 (C-3'/H-3')) deduciéndose que la otra presenta cinco ( $\delta_C/\delta_H$  37.3/3.07 (C-1''/H-1''), 31.9/1.64 - 1.76 (C-2''/H-2''), 22.7/1.28 - 1.40 (C-3''/H-3''), 29.7/1.28 - 1.40 (C-4''/H-4'') y 13.7/0.83 - 0.9 (C-5''/H-5'')).

A partir de las correlaciones H→C observadas en el espectro bidimensional HMBC de **6** (Tabla 5-8; Figura 6-27, anexo): a)  $\delta_H$  0.83 - 0.9 (H-5'') con  $\delta_C$  22.7 (C-3''); b)  $\delta_H$  1.28 - 1.40 (H-3'') con  $\delta_C$  29.7 (C-4''); c)  $\delta_H$  3.07 (H-1'') con  $\delta_C$  22.7 (C-3'') y 113.5 (C-7) se estableció que la cadena alifática de cinco carbonos está sustituyendo a uno de los anillos aromáticos (anillo A), mientras que la correlación d)  $\delta_H$  3.54 (H-1') con  $\delta_C$  119.0 (C-13) confirma que la cadena alifática de tres carbonos está sustituyendo al otro (anillo B). Asimismo, a través de las correlaciones H→C observadas en el mismo espectro d)  $\delta_H$  6.92 (H-5) con  $\delta_C$  115.8 (C-12), 158.8 (C-6); e)  $\delta_H$  6.78 (H-7) con  $\delta_C$  94.1 (C-5) y; f)  $\delta_H$  6.97 (H-4) con  $\delta_C$  160.5 (C-3) y 119.0 (C-13) se confirmó un patrón estructural dibenzofurano en donde los ambos anillos aromáticos poseen un patrón de orcinol.



**Figura 5-2:** Correlaciones observadas (H → C) en el espectro HMBC para el ácido isodidymico (**6**).

El espectro de masas de **6** (Figura 28) presentó un ion molecular de  $m/z$  370.2 concordante con el peso molecular del compuesto. Las constantes físicas y espectroscópicas de **6** coinciden con las descritas en la literatura para el ácido isodidymico, un dibenzofurano biosintetizado por la ruta del acetato polimalonato aislado previamente de *C. cf. didyma* (Chester, et al., 1986).

**Tabla 5-8:** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido isodidymico (6).

Posición	$\delta_c$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult., J (Hz)		HMBC
	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>
1	138.5	139.7	-	-	
2	115.8	117.3	-	-	
3	160.5	158.7	-	-	
4	97.7	97.4	6.97, 1H, s	6.97, 1H, s	C-11, C-10, C-2
5	94.1	95.8	6.92, 1H, d, J = 2.4	6.78, 1H, d, J = 2	C-12, C-6
6	158.8	159.5	-	-	
7	113.5	114.2	6.78 1H, d, J = 2.4	6.91, 1H, d, J = 2	C-5, C-12, C-6
8	138.5	138.7	-	-	
9	175.3	172.3	-	-	
10	158.7	159.7	-	-	
11	158.8	159.2	-	-	
12	115.8	116.4	-	-	
13	119.0	117.8	-	-	
1'	34.9	39.3	3.54, 2H, t, J = 8.0	3.50, 2H, m	C-3', C-1
2'	25.8	25.6	1.64 - 1.76, 4H, m	1.20 - 1.85, 4H, m	
3'	14.0	14.3	0.83 - 0.9, 6H, m	0.80 - 1.02, 6H, m	C-2'
1''	37.3	33.5	3.07, 2H, bt, J = 8.0	3.07, 2H, bt	C-2'', C-7, C-12, C-8
2''	31.9	32.8	1.64 - 1.76, 4H, m	1.20 - 1.85, 4H, m	C-1''
3''	22.7	32.2	1.28 - 1.40, 4H, m	-	

**Tabla 5-8 (cont.):** Datos de Resonancia Magnética Nuclear para el ácido isodidymico (6).

Posición	$\delta_c$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm) integración, mult., J (Hz)		HMBC
	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>	Rep. <sup>b</sup>	Exp. <sup>a</sup>
4''	29.7	23.2	1.28 - 1.40, 4H, <i>m</i>	1.20 - 1.85, 4H, <i>m</i>	
5''	13.7	13.9	0.83 - 0.9, 6H, <i>m</i>	0.80 - 1.02, 6H, <i>m</i>	
CH <sub>3</sub> -O-6	55.6	55.9	3.91, 3H, <i>s</i>	3.90, 3H, <i>s</i>	C-6

<sup>a</sup>Espectro registrados en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C, 100 MHz);  $\delta$  en ppm. <sup>b</sup>Espectro registrado en CDCl<sub>3</sub> (<sup>1</sup>H, 400 MHz; <sup>13</sup>C, 100 MHz) (Huneck, et al., 1996).

## 5.4 Estudio de la actividad biológica de *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia cf. didyma*

### 5.4.1 Actividad antioxidante de extractos y compuestos aislados

#### 5.4.1.1 Capacidad captadora de radicales libres

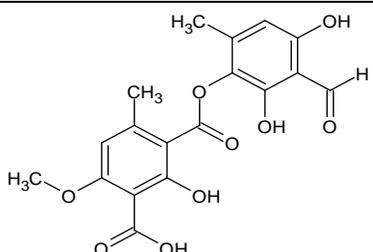
El estrés oxidativo es una condición fisiológica a la cual se somete el organismo cuando existe un desbalance entre sus especies oxidantes (producidas por múltiples procesos fisiológicos y factores internos y/o externos) y sus defensas antioxidantes endógenas que las contrarrestan (Lichtenberg & Pinchuk, 2015). Dicho desbalance se ha relacionado con múltiples enfermedades crónicas como el cáncer, la diabetes, las enfermedades neurodegenerativas y las cardiovasculares (Pisoschi & Pop, 2015), por ello, la búsqueda de agentes antioxidantes toma un papel importante en el campo de la investigación médica como estrategia para reforzar las defensas antioxidantes del organismo contribuyendo así a la prevención de dichos padecimientos (Rajendran, et al., 2014).

Muchos de los métodos experimentales que hoy en día se utilizan para la determinación de la actividad antioxidante abarcan ensayos *in vitro* e *in vivo* (Kuskoski, et al., 2005) Entre estos, los que permiten evaluar el poder captador de radicales libres son los más utilizados, siendo los más representativos aquellos que incluyen agentes cromógenos como el ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico (ABTS), el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) y la N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina (DMPD). Los modelos *in vitro* del ABTS y el

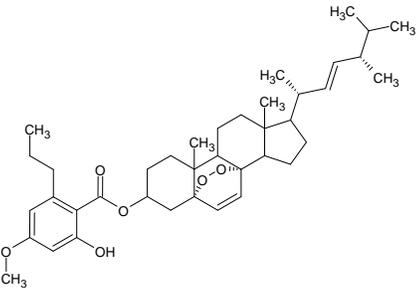
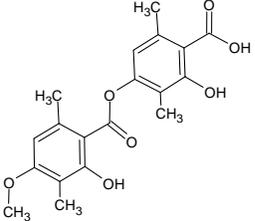
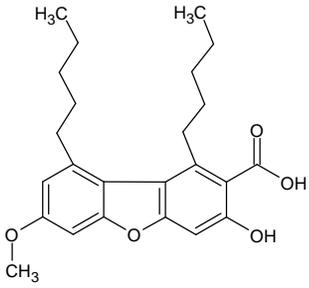
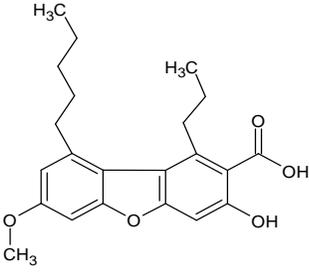
DPPH•, a pesar de involucrar radicales libres de naturaleza sintética, son los más empleados, pues constituyen métodos de fácil ejecución, que emplean radicales libres estables permitiendo obtener resultados reproducibles de una manera rápida, que correlacionan bastante bien con aquellos que se obtienen cuando se emplean radicales libres de naturaleza biológica que se generan *in situ* como el radical hidroxilo (OH•) y el anión radical superóxido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), entre otros (Kuskoski, et al., 2005; Halliwell, 2012).

La capacidad captadora de radicales libres de los extractos acetónicos, compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*, y controles BHT y ácido gálico, fue evaluada en el modelo del radical libre DPPH• (Brand-Williams, et al., 1995) determinando la concentración efectiva cincuenta (CE<sub>50</sub>), interpretada como la concentración de antioxidante necesaria para reducir en un cincuenta por ciento la concentración inicial del radical libre DPPH•. Un valor de CE<sub>50</sub> bajo indica un mayor poder captador de radicales libres. En la Tabla 5-9 se presentan los valores de CE<sub>50</sub> expresados en mg muestra / mg DPPH• o mol compuesto / mol DPPH•.

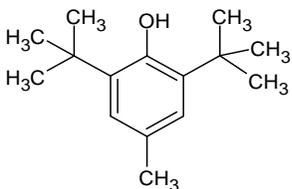
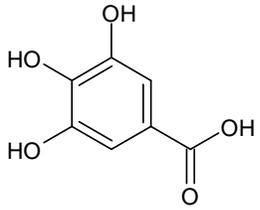
**Tabla 5-9:** Poder captador de radicales libres (CE<sub>50</sub>) de extractos y compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*.

Muestra	Actividad captadora de radicales libres (CE <sub>50</sub> )	
	mol muestra / mol DPPH•	mg muestra / mg DPPH•
 <p>Ácido descarboxithamnónico (1)</p>	0.3077	0.2937

**Tabla 5-9 (cont.):** Poder captador de radicales libres (CE<sub>50</sub>) de extractos y compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*.

Muestra	Actividad captadora de radicales libres (CE <sub>50</sub> )	
	mol muestra/ mol DPPH•	mg muestra/ mg DPPH•
 <p>5α,8α-peroxiesterol divaricatinato (3)</p>	6.163	9.704
 <p>Ácido barbático (4)</p>	11.79	10.78
 <p>Ácido condidymico (5)</p>	0.6694	0.6765
 <p>Ácido isodidymico (6)</p>	1.700	1.597
Extracto de <i>Cladonia cf. didyma</i> (ECd)	-	1.140
Extracto de <i>Thamnolia vermicularis</i> (ET)	-	0.9338

**Tabla 5-9 (cont.):** Poder captador de radicales libres ( $CE_{50}$ ) de extractos y compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*.

Muestra	Actividad captadora de radicales libres ( $CE_{50}$ )	
	mol muestra/ mol DPPH•	mg muestra/ mg DPPH•
 <p>BHT</p>	0.1035	0.05784
 <p>Ácido gálico</p>	0.04287	0.02045

Tomando como base el poder captador de radicales libres de los extractos de *T. vermicularis* (**ET**) y *C. cf. didyma*, (**ECd**) (Tabla 5-9) y comparando con los controles antioxidantes (BHT y ácido gálico), ambos extractos resultaron menos activos, sin embargo, mostraron un valor de  $CE_{50}$  cercano al determinado para otras especies líquénicas que han sido fuente de agentes antioxidantes promisorios ( $CE_{50}$  *Lobariella pallida* = 0.850,  $CE_{50}$  *Usnea roccellina* = 0.978 mg extracto / mg DPPH•) (Rojas, et al., 2015), siendo más activo **ET** que **ECd**.

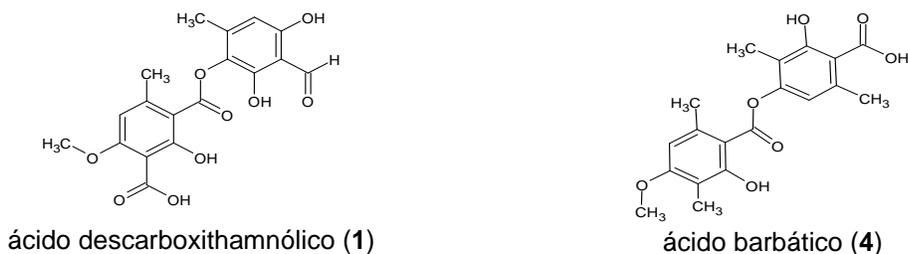
Con relación a los compuestos 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxiesterol divaricatinato (**3**) y ácido barbático (**4**) aislados de **ECd** estos no resultaron activos, mientras que el ácido isodidymico (**6**) resultó un agente ligeramente activo. Por su parte, el ácido condidymico (**5**) fue un agente captador de radicales libres más activo ( $CE_{50}$  = 0.6765 mg de **5** / mg DPPH) que el extracto, considerándose entonces uno de sus principios activos.

Respecto a los compuestos ácido descarboxithamnólico (**1**) y arabitol (**2**) aislados de **ET**, este último no fue sometido a ensayo dada su naturaleza química de polirol. Por su parte, el compuesto **1** resultó ser un agente captador de radicales libres muy activo constituyéndose en el principio activo del extracto. Cabe mencionar, que **1** mostró una

capacidad captadora de radicales libres ( $CE_{50}$  **1** = 0.3077) comparable a la de los antioxidantes control ( $CE_{50}$  BHT = 0.1035 y  $CE_{50}$  ácido gálico = 0.04287 mol compuesto / mol DPPH•). La actividad antioxidante del compuesto **1** ya había sido reportada con anterioridad (Rojas, et al., 2015), comprobándose su actividad en la presente investigación, en contraste los compuestos de *C. cf. didyma* **5** y **6** a los que se les reportan por primera vez esta actividad como captadores de radicales libres.

Comparando la estructura química y el poder captador de radicales libres de los compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*, resulta difícil establecer si la actividad está relacionada con el patrón estructural de dépsido o dibenzofurano que presentan dichos compuestos, ya que tanto el ácido descarboxithamnólico (**1**), que es un dépsido, como el ácido condidymico (**5**), que es un dibenzofurano, resultaron los más activos mientras que el ácido barbático (**4**), que es un dépsido, y el ácido isodidymico (**6**), que es un dibenzofurano, resultaron inactivo y ligeramente activo, respectivamente. Comparando la estructura de los dépsidos **1** y **4** (Figura 5-3), considerando que **1** fue activo y **4** inactivo, es de destacar que ambos poseen un patrón estructural de  $\beta$ -orcinol, sin embargo **1** posee un hidroxilo adicional en el anillo B, lo cual le permitiría formar radicales fenoxilo estabilizados por resonancia de manera más eficiente que **4**, corroborando que el farmacóforo en **1** está en el anillo aromático B, tal y como estudios previos lo han establecido (Rojas, et al., 2015).

Comparando la estructura química de los dibenzofuranos **5** y **6**, su única diferencia radica en la longitud de sus cadenas sustituyentes, siendo ambas de la misma extensión en **5** y una de ellas más corta en **6**, sin embargo, desde el punto de vista químico esta característica estructural no permite explicar las diferencias en su actividad que estaría gobernada con su capacidad para formar radicales libres a través de los grupos fenólicos. No obstante, los anillos fenólicos de los compuestos **5** y **6**, encajan en un patrón de sustitución de orcinol, que resulta menos activo vs el patrón de  $\beta$ -orcinol por lo cual el patrón estructural no permite explicar la actividad captadora de radicales libres de estos compuestos.



**Figura 5-3:** Comparación estructural del ácido descarboxithamnólico (1) vs el ácido barbático (4).

#### 5.4.1.2 Reactividad de los compuestos para captar radicales libres

La reactividad de los compuestos 1, 3, 4, 5 y 6 para captar al radical libre DPPH• se determinó experimentalmente a partir de la constante de velocidad de reacción de segundo orden ( $k_2$ ) a  $25.0 \pm 0.1$  °C, permitiendo la reacción de cada uno de los liquenoquímicos con el radical libre DPPH• a diferentes relaciones de concentración. El comportamiento observado del Ln [DPPH•] vs t para todos los sistemas estudiados siguió una tendencia lineal característica para una cinética de *pseudo*-primer orden de donde a partir de la pendiente ( $k_{obs}$ ) y la concentración inicial del liquenoquímico se calculó  $k_2$  a la temperatura del estudio. Los resultados de esta determinación se presentan en la Tabla 5-10.

**Tabla 5-10:** Reactividad de compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma* para captar 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> )	$k_2$ promedio (M <sup>-1</sup> * s <sup>-1</sup> )	± sd (M <sup>-1</sup> * s <sup>-1</sup> )
1	10:1	413.4	0.0000904142	0.2187	0.2159	0.0040
	20:1	826.7	0.0001762001	0.2131		
3	10:1	571.4	0.0000230651	0.0404	0.0387	0.0023
	20:1	854.1	0.0000316688	0.0371		
4	20:1	986.7	0.0000069579	0.0071	0.0062	0.0013
	30:1	1480.0	0.0000078131	0.0053		
5	20:1	890.9	0.0001184859	0.1330	0.1302	0.0040
	30:1	1319.8	0.0001680846	0.1274		
6	10:1	467.9	0.0000510546	0.1091	0.1077	0.0020
	20:1	959.2	0.0001019056	0.1062		
BHT <sup>a</sup>	-	-	-	-	5.64	0.12
Ácido gálico <sup>b</sup>	-	-	-	-	40.0	4.0

<sup>a</sup>Rojas, et al., 2015; <sup>b</sup>Mishra, et al., 2012.

Como se aprecia en la Tabla 5-10, todos los liquenoquímicos estudiados presentaron valores de  $k_2$  significativamente menores ( $p < 0.05$ ) a los determinados para los patrones antioxidantes BHT y ácido gálico, lo que los hace menos reactivos para captar radicales libres. Cabe mencionar que los antioxidantes se pueden clasificar en tres categorías considerando los tiempos que tardan para alcanzar el estado estacionario (aquel donde el % remanente de DPPH• en función del tiempo permanece constante): a) Cinética lenta (cuando tardan *ca.* 7 o más horas para alcanzar el estado estacionario) como BHT, ácido gálico y ácido cafeico, entre otros. b) Cinética intermedia (cuando tardan hasta *ca.* 30 minutos para alcanzar el estado estacionario) como alfa-tocoferol y c) cinética rápida (cuando tardan cerca de un minuto para alcanzar el estado estacionario) como isoeugenol y ácido ascórbico, entre otros (Brand - Williams, et al., 1995). Bajo esta consideración los liquenoquímicos **1**, **3**, **4**, **5** y **6** pueden ser clasificados como antioxidantes de cinética lenta porque tardaron *ca.* 24 horas para alcanzar dicho estado.

Entre los compuestos aislados, **1** resultó ser el más reactivo ( $k_2 = 0.2159 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) seguido de **5** ( $k_2 = 0.1302 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), **6** ( $k_2 = 0.1077 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), **3** ( $k_2 = 0.0387 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) y **4** ( $k_2 = 0.0062 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) que resultó el menos reactivo. Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado para  $\text{CE}_{50}$  (mol compuesto / mol DPPH•) donde **1**, es la sustancia que presentó la mayor capacidad captadora de radicales libres ( $\text{CE}_{50} = 0.3077$ , mol muestra / mol DPPH•) vs **4**, que fue la que presentó la menor capacidad captadora ( $\text{CE}_{50} = 11.791$ , mol muestra / mol DPPH•). Comparando la estructura de los dépsidos **1** y **4** vs su reactividad, ambos poseen un patrón estructural de  $\beta$ -orcinol, sin embargo **1** posee un hidroxilo adicional en el anillo B, lo cual le permitiría formar radicales fenoxilo estabilizados por resonancia de manera más eficiente que **4**, lo cual explicaría su mayor reactividad.

#### 5.4.1.3 Poder reductor férrico

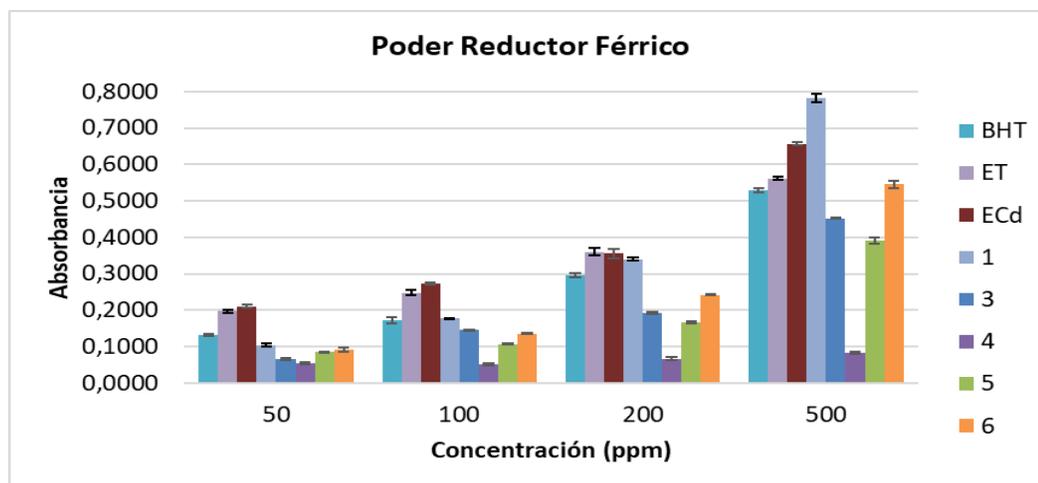
El poder reductor férrico (PRF) permitió evaluar la capacidad de los compuestos liquénicos para actuar como agentes donadores de electrones a especies oxidadas, estabilizándolas y evitando las reacciones en cadena que suelen darse en los procesos oxidativos (Fernández-Moriano, et al., 2016). En este ensayo, los iones férricos ( $\text{Fe}^{+++}$ ) se reducen a ferrosos ( $\text{Fe}^{++}$ ) dependiendo de la capacidad reductora de la sustancia liquénica. Esta capacidad reductora se puede cuantificar espectrofotométricamente de manera indirecta a

través de la formación del complejo coloreado azul de Turnbull ( $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ ) a  $\lambda$  700 nm (Benzie & Strain, 1996). Por lo tanto, un incremento en la concentración del complejo está asociado con un mayor poder reductor férrico de la sustancia evaluada viéndose reflejado en un aumento en el valor de absorbancia (Oyaizu 1986). Los resultados de PRF para los extractos y compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma* se muestran en la Tabla 5-11 y Figura 5-2.

**Tabla 5-11:** Poder reductor férrico de los extractos acetónicos y compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*.

Muestra	Poder reductor férrico (PRF $\pm$ sd) <sup>(a)</sup> (Absorbancia)			
	50 ppm	100 ppm	200 ppm	500 ppm
1	0.104 $\pm$ 0.004	0.177 $\pm$ 0.001	0.340 $\pm$ 0.004	0.782 $\pm$ 0.011
3	0.067 $\pm$ 0.003	0.146 $\pm$ 0.002	0.193 $\pm$ 0.004	0.452 $\pm$ 0.001
4	0.054 $\pm$ 0.003	0.053 $\pm$ 0.003	0.067 $\pm$ 0.005	0.082 $\pm$ 0.003
5	0.085 $\pm$ 0.002	0.108 $\pm$ 0.001	0.167 $\pm$ 0.002	0.392 $\pm$ 0.009
6	0.093 $\pm$ 0.005	0.136 $\pm$ 0.001	0.242 $\pm$ 0.002	0.546 $\pm$ 0.011
ECd	0.211 $\pm$ 0.005	0.274 $\pm$ 0.003	0.356 $\pm$ 0.013	0.657 $\pm$ 0.004
ET	0.197 $\pm$ 0.005	0.248 $\pm$ 0.007	0.360 $\pm$ 0.010	0.561 $\pm$ 0.004
BHT	0.132 $\pm$ 0.003	0.173 $\pm$ 0.008	0.296 $\pm$ 0.006	0.529 $\pm$ 0.006
ácido gálico	0.740 $\pm$ 0.013	1.273 $\pm$ 0.005	2.331 $\pm$ 0.091	3.913 $\pm$ 0.001

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



**Figura 5-4:** Poder reductor férrico de extractos y compuestos aislados de *T. vermicularis* (ET) y *C. cf. didyma* (ECd). ácido descarboxithamnólico (1), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3), ácido barbático (4), ácido condidymico (5), ácido isodidymico (6) y butirato de hidroxitolueno (BHT).

Como se aprecia (Tabla 5-11 y Figura 5-4), todas las muestras evaluadas mostraron que su capacidad reductora es dependiente de la concentración, logrando los valores más altos a 500 ppm. El patrón ácido gálico resultó ser el agente reductor férrico más eficiente en todo el rango de concentración evaluado, siendo congruente con lo reportado para este compuesto que es reconocido por su elevada capacidad como antioxidante (Yen, et al., 2002). Respecto a los extractos, estos resultaron menos activos que el ácido gálico, pero más activos que el patrón BHT en todo el rango de concentraciones. Adicionalmente, a concentraciones inferiores a 500 ppm, los extractos resultaron ser más activos que los compuestos aislados de ellos, probablemente debido a un efecto sinérgico entre sus constituyentes, sin embargo, a esta concentración, el compuesto **1** (ácido descarboxithamnólico) ( $0.782 \pm 0.011$ ) resultó ser el agente reductor férrico más potente, incluso que el BHT ( $0.529 \pm 0.006$ ), dando indicios de que este compuesto es el principal principio activo del extracto de *T. vermicularis* (**ET**). Por su parte, el compuesto **6** (ácido isodidymico) resultó ser el más activo de los aislados del extracto de *C. cf. didyma* en todo el rango de concentración evaluado seguido de **3** (5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato), **5** (ácido condidymico) y **4** (ácido barbático) pero todos ellos fueron menos activos que **1** como agentes reductores férricos.

Comparando la estructura química y el poder reductor férrico de los compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*, resulta difícil establecer si dicho poder está relacionado con el patrón estructural de dépsido o dibenzofurano que presentan los compuestos, pues el ácido descarboxithamnólico (**1**), que es un dépsido y el ácido isodidymico (**6**), que es un dibenzofurano, resultaron ser los mejores reductores férricos, mientras que el dépsido ácido barbático (**4**) fue inactivo. Cabe mencionar que el poder reductor de iones férricos de **1** y la inactividad de **4**, son acordes con el poder captador de radicales libres que presentaron estos compuestos en el presente estudio.

Por su parte, el compuesto **3** también presentó cierto poder reductor férrico en este estudio. Comparando su estructura con la de **6**, se deduce la presencia del grupo divaricatinato en ambos compuestos, dando indicios de que posiblemente este grupo sea importante para reducir iones férricos dada su naturaleza química de ser un compuesto fenólico.

Para los compuestos aislados de *Cladonia cf. didyma*, **3**, **5** y **6** es la primera vez que se reportan datos de actividad antioxidante como captadores de radicales libres y reductores

férricos, constituyéndose la presente investigación como un aporte al conocimiento de los compuestos de origen liquénico.

#### 5.4.1.4 Poder inhibidor de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un proceso oxidativo mediado por radicales libres que se propagan a través de reacciones en cadena y que conlleva a la oxidación de biomoléculas de naturaleza lipídica como son los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas y las lipoproteínas transportadoras de colesterol. Dichas biomoléculas resultan alteradas en sus propiedades fisicoquímicas, biológicas y funcionales y pueden conducir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y aterosclerosis (Halliwell 2000). Por ello, el evitar este proceso oxidativo es deseable y la cuantificación del poder inhibidor de la peroxidación de lípidos constituye otro mecanismo de acción que se evalúa durante la búsqueda de potenciales agentes antioxidantes (Pisoschi & Pop 2015).

Este ensayo determinó la capacidad de las muestras para interrumpir las reacciones en cadena que conducen a la formación de hidroperóxidos lipídicos a partir del ácido linoleico. El ensayo se llevó a cabo a las 24 y 48 h. La Tabla 5-12 y Figura 5-5 resumen los máximos valores de porcentaje de inhibición de la peroxidación del ácido linoleico (% IPL) obtenidos durante estas determinaciones.

**Tabla 5-12:** Poder inhibidor de la peroxidación lipídica de extractos y compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*.

Muestra	Inhibición de la peroxidación lipídica (% IPL $\pm$ sd) <sup>a</sup>			
	50 ppm	100 ppm	200 ppm	500 ppm
<b>BHT</b>	81.98 $\pm$ 0.22	83.80 $\pm$ 0.74	82.64 $\pm$ 0.21	82.91 $\pm$ 0.22
<b>ácido gálico</b>	43.46 $\pm$ 0.07	45.14 $\pm$ 0.07	50.14 $\pm$ 0.60	56.29 $\pm$ 0.07
<b>ECd</b>	65.13 $\pm$ 0.07	70.06 $\pm$ 0.44	72.44 $\pm$ 0.21	77.96 $\pm$ 0.67
<b>ET</b>	37.57 $\pm$ 0.07	59.61 $\pm$ 0.60	65.13 $\pm$ 0.37	42.67 $\pm$ 1.05
<b>1</b>	40.57 $\pm$ 0.89	49.04 $\pm$ 1.71	49.25 $\pm$ 0.97	49.72 $\pm$ 0.60
<b>3</b>	27.21 $\pm$ 1.04	42.83 $\pm$ 0.67	45.09 $\pm$ 1.34	51.98 $\pm$ 0.22
<b>4</b>	55.08 $\pm$ 0.15	53.45 $\pm$ 0.07	52.03 $\pm$ 0.45	51.30 $\pm$ 1.19
<b>5</b>	43.51 $\pm$ 0.89	49.56 $\pm$ 1.41	52.93 $\pm$ 0.22	51.51 $\pm$ 0.30
<b>6</b>	45.46 $\pm$ 1.26	61.34 $\pm$ 1.26	68.18 $\pm$ 0.67	66.34 $\pm$ 1.49

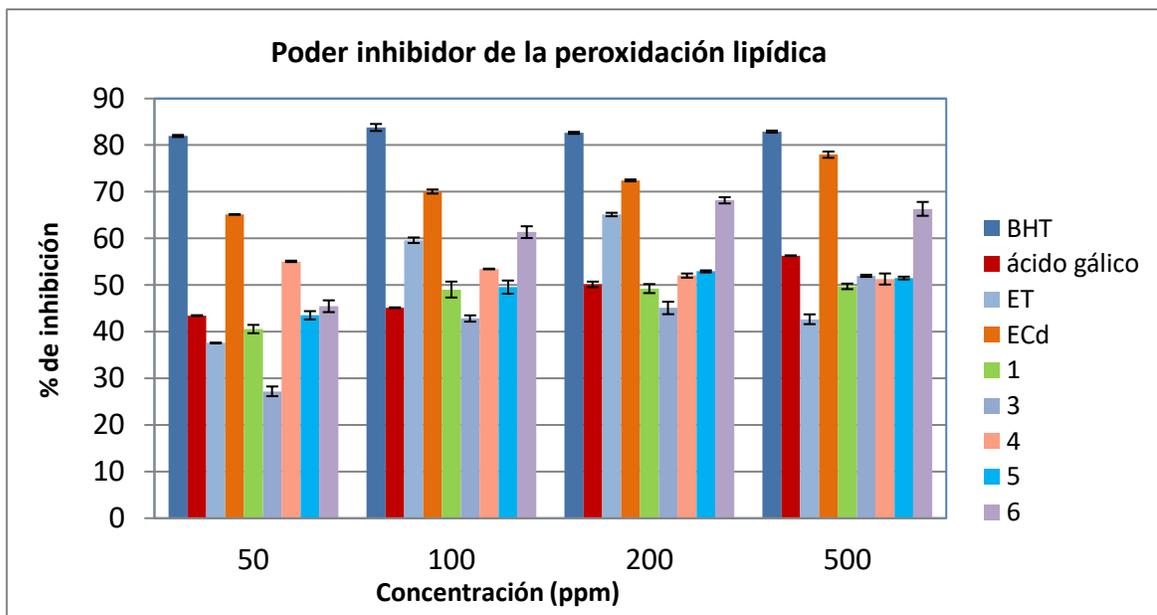
<sup>a)</sup> Cada valor representa el promedio de dos o tres medidas independientes  $\pm$  la desviación estándar (sd).

Los valores de % IPL para el extracto de *C. cf. didyma* (**ECd**), los liquenoquímicos ácido descarboxithamnólico (**1**), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (**3**), ácido condidymico (**5**) ácido isodidymico (**6**) y el patrón ácido gálico, mostraron un comportamiento dependiente de la concentración presentando su mayor valor a la máxima concentración evaluada (500 ppm). Para el extracto de *T. vermicularis* (**ET**) su máximo valor de inhibición fue alcanzado a 200 ppm mientras que para el patrón BHT y el compuesto **4** (ácido barbático) éste se alcanzó a 50 ppm (mínima concentración evaluada).

BHT presentó valores de % IPL por encima del 80 % en todo el rango de concentración evaluado (50 – 500 ppm). Estos valores no presentaron diferencias significativas ( $p > 0.5$ ) mostrando un destacado desempeño como inhibidor de la peroxidación lipídica, lo cual está asociado con su carácter lipofílico y con su capacidad para donar átomos de hidrógeno a los radicales libres en medio oleoso, inhibiendo así las reacciones en cadena y la formación de los lipoperóxidos.

Por su parte, el patrón ácido gálico fue menos activo como inhibidor de la peroxidación lipídica que BHT, a pesar de ser el agente captador de radicales libres y reductor férrico más potente en este estudio. Lo anterior se puede asociar a su carácter hidrofílico que no es tan compatible con el carácter hidrofóbico del ensayo.

En cuanto a los extractos, el **ECd** fue el que presentó el mayor % IPL en todo el rango de concentración evaluado, siendo incluso más activo que el ácido gálico ( $p < 0.5$ ) pero menos activo que BHT ( $p < 0.5$ ). Respecto a los compuestos, **6** resultó ser el más activo, aún más que el ácido gálico ( $p < 0.5$ ) pero menos que BHT ( $p < 0.5$ ). Las sustancias liquénicas **1**, **3**, **4** y **5** presentaron % IPL entre el 27 al 55 % (entre 50 y 500 ppm), lo cual permite inferir que su actividad antioxidante es intermedia, si se les compara con BHT. El poder inhibidor de la peroxidación lipídica del **ECd** puede deberse a un efecto sinérgico entre los compuestos **3**, **4**, **5** y **6**, aislados de éste, los cuales presentan grupos fenólicos en su estructura y un carácter lipofílico, como lo corroboran sus valores de log P (Log P entre 4 y 9).



**Figura 5-5:** Poder inhibitor de la peroxidación lipídica de extractos y compuestos aislados de *T. vermicularis* (ET) y *C. cf. didyma* (ECd). ácido descarboxithamnólico (1), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3), ácido barbático (4), ácido condidymico (5), ácido isodidymico (6) y butirato de hidroxitolueno (BHT).

## 5.4.2 Actividad fotoprotectora de extractos y compuestos aislados de *Thamnolia vermicularis* y *Cladonia cf. didyma*

### 5.4.2.1 Actividad fotoprotectora frente a la radiación UVB mediante estimación del factor de protección solar (FPS)

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer («International Agency for Research on Cancer, 1992 - National Cancer Control Policy» s. f.), ha declarado a la radiación UV como un carcinógeno humano comprobado, causante de cáncer de piel. Razón por la cual, el uso de compuestos en formulaciones destinadas a la piel, que la protegen de la incidencia directa de esta radiación, es beneficioso para prevenir dicho cáncer (Lorencini, et al., 2014). La radiación UV constituye una parte de la luz solar que alcanza a la Tierra, dividiéndose en tres regiones de acuerdo con su longitud de onda, de éstas, la radiación UVB (280–320 nm) es absorbida en un 90 % por los gases de la atmósfera, viéndonos expuestos al 10 % que llega al planeta. Cuando dicha radiación incide sobre nosotros, afecta principalmente a la epidermis, siendo absorbida por los cromóforos epidermales como la melanina, sin embargo, después de una exposición

---

directa y constante, se produce un exceso de EAR como el radical hidroxilo (OH•) que conlleva a estrés oxidativo en dicho órgano. Por ello, se hace necesario encontrar agentes que presenten capacidad fotoprotectora frente a esta radiación, como estrategia para prevenir problemas dérmicos asociados a la radiación solar.

La capacidad de una sustancia para proteger en contra de la radiación UVB se mide a través del factor de protección solar (FPS), parámetro que resulta del cociente entre la mínima cantidad de energía necesaria para producir eritema mínimamente detectable (dosis mínima de eritema (ME)) en la piel con y sin fotoprotección (Diffey, 1984). De acuerdo con la FDA, los protectores solares pueden presentar diferentes niveles de fotoprotección frente a la radiación UVB tomando como base su valor de FPS: 2 a 12: “bajo”; 12 a 30: “moderado” y mayor de 30: “alto” (U.S. Food and Drug Administration, 2020). A mayor valor de FPS, mayor capacidad fotoprotectora frente a la radiación UVB. Según la regulación de diferentes países, a los protectores solares que van a salir a comercialización, como medida de su desempeño, se les debe determinar el FPS *in vivo* sobre un grupo de voluntarios humanos, lo cual además de constituir un proceso dispendioso para su ejecución, requiere de consideraciones éticas muy estrictas (U.S. Food and Drug Administration, 2020). Por ello, como medida inicial de desempeño, a los fotoprotectores que están en etapa de descubrimiento, se les ha optado por evaluar este parámetro *in vitro*, obteniéndose valores de FPS que correlacionan de manera satisfactoria con los obtenidos *in vivo* (Mansur, et al., 1986; Buso, et al., 2017; Dutra, et al., 2004; Pelizzo, et al., 2012; Garoli, et al., 2008) pues este ensayo permite relacionar el efecto eritematogénico generado *in vivo* por la radiación UVB con la absorbancia de la sustancia de prueba a las diferentes longitudes de onda en dicha región UV (Mansur, et al., 1986).

El FPS de los extractos de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*, sus compuestos aislados y los controles bemotrizinol (**BEM** / filtro UVA-UVB), octil metoxicinamato (**OMC** / filtro UVB) y avobenzona (**AVO** / filtro UVA) se muestran en la Tabla 5-13.

**Tabla 5-13:** Actividad fotoprotectora (FPS,  $\lambda_{crit.}$  y UVA-r\*) de extractos y compuestos de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*.

Muestra	Actividad fotoprotectora					
	Factor de protección solar UVB (FPS $\pm$ sd)				Factor de protección solar UVA <sup>a</sup>	
	Concentración (ppm)					
	10	50	100	200	$\lambda_{crit.}$ (nm) $\pm$ sd	UVA-r* $\pm$ sd
<b>BEM</b>	8.48 $\pm$ 0.43	39.57 $\pm$ 0.41	> 40.00	> 40.00	364.2 $\pm$ 0.2	1.731 $\pm$ 0.031
<b>OMC</b>	8.41 $\pm$ 0.19	34.54 $\pm$ 0.82	39.95 $\pm$ 0.10	> 40.00	329.4 $\pm$ 0.9	0.370 $\pm$ 0.021
<b>AVO</b>	4.08 $\pm$ 0.12	14.12 $\pm$ 0.93	24.99 $\pm$ 0.68	38.07 $\pm$ 0.18	377.1 $\pm$ 0.6	2.915 $\pm$ 0.162
<b>ECd</b>	2.27 $\pm$ 0.07	6.36 $\pm$ 0.34	11.02 $\pm$ 0.05	19.43 $\pm$ 0.15	364.5 $\pm$ 3.5	0.583 $\pm$ 0.029
<b>ET</b>	2.41 $\pm$ 0.25	5.36 $\pm$ 0.44	11.42 $\pm$ 0.44	21.30 $\pm$ 0.41	366.9 $\pm$ 0.3	1.099 $\pm$ 0.064
<b>1</b>	3.79 $\pm$ 0.13	11.87 $\pm$ 1.75	25.56 $\pm$ 1.97	39.77 $\pm$ 0.21	358.0 $\pm$ 2.1	0.546 $\pm$ 0.051
<b>3</b>	3.19 $\pm$ 0.04	6.52 $\pm$ 0.25	10.70 $\pm$ 0.33	17.70 $\pm$ 0.57	352.5 $\pm$ 1.3	0.464 $\pm$ 0.001
<b>4</b>	4.14 $\pm$ 0.82	9.42 $\pm$ 0.76	16.06 $\pm$ 0.03	30.08 $\pm$ 0.18	328.8 $\pm$ 0.6	0.255 $\pm$ 0.007
<b>5</b>	4.14 $\pm$ 0.10	15.16 $\pm$ 0.17	24.37 $\pm$ 1.43	39.78 $\pm$ 0.20	338.8 $\pm$ 2.5	0.268 $\pm$ 0.027
<b>6</b>	4.34 $\pm$ 0.14	14.37 $\pm$ 0.64	25.44 $\pm$ 0.08	38.64 $\pm$ 0.60	340.2 $\pm$ 1.2	0.335 $\pm$ 0.006

<sup>a</sup>Determinados a 200 ppm. Resultantes del promedio de dos o tres medidas independientes  $\pm$  la desviación estándar, sd. ND: no determinado.

Como se aprecia, todas las muestras evaluadas, presentaron una dependencia del FPS con la concentración, encontrando los valores mayores a 200 ppm. Respecto a los patrones **BEM** y **OMC**, estos alcanzaron un valor de FPS mayor a 30 a partir de una concentración de 50 ppm, evidenciando su “alto” carácter protector contra la radiación UVB, que coincide con lo reportado para estas sustancias (Hojerová, et al., 2011). Por su parte, **AVO** presentó valores más bajos de FPS frente a los otros controles en todo el rango de concentración, debido primordialmente a su capacidad fotoprotectora UVA.

Los extractos **ECd** y **ET** presentaron niveles de fotoprotección UVB “bajos” a “moderados” a las concentraciones evaluadas ya que sus valores de FPS variaron de 2.0 - 19.0 y 2.0 - 21.0, respectivamente. Respecto a los compuestos aislados, el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -

peroxiesteril divaricatinato (**3**) presentó el menor desempeño como fotoprotector UVB a todas las concentraciones ensayadas ( $p < 0.05$ ), seguido del ácido barbático (**4**), que presentó “baja” a “moderada” fotoprotección UVB. Los ácidos descarboxitamnólico (**1**), condidymico (**5**) e isodidymico (**6**) mostraron “baja a alta” fotoprotección UVB en el rango de concentración evaluado. Considerando el valor de FPS a 200 ppm (concentración de referencia usualmente establecida para este ensayo) los compuestos **1**, **5** y **6** son fotoprotectores con nivel de protección “alto” frente a la radiación UVB.

Por primera vez en este estudio se reportan las propiedades fotoprotectoras frente a la radiación UVB de los compuestos **3** a **6** y se corroboran las de **1** (Rojas, et al., 2015).

#### **5.4.2.2 Actividad fotoprotectora frente a la radiación UVA mediante estimación de longitud de onda crítica ( $\lambda_{crit}$ ) y relación UVA (UVA-r\*)**

La radiación UVA (320 – 400 nm) constituye el 95 % de la radiación UV que llega a la superficie terrestre siendo la menos energética y a la cual estamos más expuestos diariamente (Kammeyer & Luiten, 2015). La exposición a dicha radiación genera gran preocupación, ya que esta penetra más profundamente la piel alcanzando a la dermis y generando EAR como el anión radical superóxido, causante de la oxidación de lípidos dérmicos, daño actínico y tisular y junto con la radiación UVB contribuyen al envejecimiento prematuro y al cáncer de piel (De Fabo, et al., 2004). La capacidad de una sustancia para proteger en el rango UVA se mide a través de la longitud de onda crítica ( $\lambda_{crit}$ ), parámetro que representa la longitud de onda por debajo de la cual un fotoprotector absorbe el 90 % de la radiación solar en el rango de 290 a 400 nm (rango UV). La FDA (U.S. Food and Drug Administration, 2020) definió una escala que clasifica la protección UVA con base en este parámetro, con puntajes del 0 al 4: 0 ( $\lambda_{crit} < 325$  nm), 1 ( $325 \leq \lambda_{crit} < 335$ ), 2 ( $335 \leq \lambda_{crit} < 350$ ), 3 ( $350 \leq \lambda_{crit} < 370$ ), y 4 ( $\lambda_{crit} \geq 370$ ), indicativos de “nula”, “baja”, “media”, “alta” y “muy alta” capacidad fotoprotectora UVA, respectivamente.

Otro parámetro que también establece la capacidad fotoprotectora de una sustancia en el rango UVA es el factor UVA-r\*, que relaciona su absorción en el rango UVA (320 - 400 nm) y su absorción en el UVB (290 - 320 nm). De acuerdo con el valor UVA-r\* se puede establecer el grado de fotoprotección de una sustancia frente a la radiación UVA clasificándose del siguiente modo:  $0.0 < 0.2$  “no protege”;  $0.2 < 0.4$  “moderada”;  $0.4 < 0.6$  “buena”;  $0.6 < 0.8$  “superior” y  $0.8 \geq$  “máxima” (Springsteen, et al., 1999).

Adicionalmente, considerando que tanto la radiación UVB como UVA son responsables de daños a la piel, incluido cáncer, es deseable que los filtros o pantallas solares por sí solos o en combinación con otros en una formulación, presenten capacidad fotoprotectora de amplio espectro, es decir que protejan tanto en el rango UVB como en el UVA. Para que una sustancia se pueda clasificar de amplio espectro, debe cumplir con el requisito de tener una  $\lambda_{\text{crit}} \geq 370$  nm y FPS  $\geq 15$  (U.S. Food and Drug Administration, 2020).

Los valores de  $\lambda_{\text{crit}}$  y UVA-r\* para los extractos de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*, sus compuestos aislados y los controles bemotrizinol (**BEM** / filtro UVA-UVB), octil metoxicinamato (**OMC** / filtro UVB) y avobenzona (**AVO** / filtro UVA) se muestran en la Tabla 5-13. Respecto a los controles, **AVO** fue el que presentó los valores de  $\lambda_{\text{crit}}$  y UVA-r\* más altos ( $377.1 \pm 0.6$  y  $2.915 \pm 0.162$ , respectivamente) corroborando su “muy alta” o “máxima” capacidad fotoprotectora UVA. A su vez, **BEM** presentó una  $\lambda_{\text{crit}}$  ( $364.2 \pm 0.2$ ) y UVA-r\* ( $1.731 \pm 0.031$ ) que permiten corroborar su “alta” o “máxima” capacidad fotoprotectora UVA, a pesar de esto y de que esta sustancia también presentó “alta” capacidad fotoprotectora UVB (FPS  $39.57 \pm 0.40$  / 50 ppm), no puede ser clasificada de amplio espectro. Por su parte, **OMC** presentó “baja” o “moderada” capacidad fotoprotectora UVA ( $\lambda_{\text{crit}}$   $329.4 \pm 0.9$  y UVA-r\*  $0.370 \pm 0.021$ ) siendo un filtro primordialmente UVB (FPS  $> 40.0$  / 200 ppm) estando de acuerdo con su naturaleza fotoprotectora reportada.

Los extractos **ECd** y **ET** según su  $\lambda_{\text{crit}}$  ( $364.5 \pm 3.5$  y  $366.9 \pm 0.3$ ) presentan “alta” capacidad fotoprotectora UVA y según su UVA-r\* ( $0.580 \pm 0.020$  y  $1.030 \pm 0.121$ ) “buena” y “máxima” capacidad fotoprotectora UVA, respectivamente. A pesar de que también poseen capacidad fotoprotectora UVB (FPS  $> 15$ ) no pueden ser clasificados de amplio espectro.

En cuanto a los compuestos aislados, los ácidos barbático (**4**), condidymico (**5**) e isodidymico (**6**) según su  $\lambda_{\text{crit}}$  ( $328.8 \pm 0.6$ ,  $338.8 \pm 2.5$  y  $340.2 \pm 1.2$ , respectivamente) presentaron “baja” capacidad fotoprotectora UVA que se confirma con los valores de UVA-r\* obtenidos, sin embargo, dichos compuestos presentaron un nivel de protección “alto” frente a la radiación UVB. Por su parte, el ácido descarboxithamnólico (**1**) y el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (**3**) son los compuestos que presentan “alta” capacidad fotoprotectora UVA dados sus valores de  $\lambda_{\text{crit}}$  ( $358.0 \pm 2.1$  y  $352.5 \pm 1.4$ , respectivamente) y de UVA-r\* ( $0.546 \pm 0.051$  y  $0.464 \pm 0.001$ , respectivamente). Adicionalmente, **1** destaca

por su "alta" fotoprotección UVB haciéndolo prometedor como un filtro solar con protección tanto en el UVA como en el UVB, aunque no pueda ser clasificado de amplio espectro ya que su  $\lambda_{crit}$  no es  $\geq 370$  nm.

Por primera vez en este estudio se reportan las propiedades fotoprotectoras frente a la radiación UVA de los compuestos **3** a **6** y se corroboran las de **1** (Rojas, et al., 2015).

#### **5.4.2.3 Efecto protector de células sometidas a estrés oxidativo por radical hidroxilo**

Considerando que el estrés oxidativo está relacionado con la radiación ultravioleta, debido a que ésta última genera la exacerbada producción de radicales libres, entre ellos los radicales hidroxilo que a su vez son causantes de daño a nivel celular y de sus biomoléculas como el ADN (Perico-Franco, et al., 2015), resultó importante evaluar la capacidad de los compuestos aislados para proteger a estos niveles actuando como agentes antioxidantes y/o fotoprotectores.

El ensayo de citoprotección midió la capacidad de los compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma* para evitar el daño oxidativo causado por el radical hidroxilo a nivel celular. Para ello, se midió el porcentaje de viabilidad celular (% VC) de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCat) después de su exposición a dicho radical producido *in situ* en presencia o ausencia de los compuestos liquénicos.

Los queratinocitos sin exposición al radical (**CSE**) se consideraron como aquellos que presentaron un 100 % VC, mientras que los expuestos al OH• (**COH**) sin ningún tipo de protección fueron considerados como los que sufrieron el mayor daño oxidativo (ca. 71 % VC). Los compuestos liquénicos fueron evaluados a 15, 30 y 50  $\mu$ M (0.28 % DMSO), concentraciones en donde previamente se garantizó que no presentaban efecto citotóxico (Tabla 5-14).

**Tabla 5-14:** Efecto citoprotector de los compuestos aislados de los líquenes *T. vermicularis* y *C. cf. didyma*, frente a daño oxidativo causado por el radical hidroxilo.

Muestra	Efecto citoprotector		
	% Viabilidad celular $\pm$ ES <sup>a</sup>		
	15 $\mu$ M	30 $\mu$ M	50 $\mu$ M
<b>CSE</b>	100		
<b>COH</b>	71.47 $\pm$ 1.79		
<b>OMC</b>	76.76 $\pm$ 2.21	76.29 $\pm$ 0.08	75.74 $\pm$ 0.63
<b>ESF</b>	79.41 $\pm$ 1.89	88.75 $\pm$ 0.28	77.35 $\pm$ 1.25
<b>1</b>	85.34 $\pm$ 2.60	75.30 $\pm$ 2.57	80.49 $\pm$ 1.24
<b>3</b>	82.17 $\pm$ 1.64	83.17 $\pm$ 2.77	79.20 $\pm$ 2.07
<b>4</b>	78.56 $\pm$ 1.74	69.63 $\pm$ 0.60	66.89 $\pm$ 2.95
<b>5</b>	76.03 $\pm$ 2.45	69.27 $\pm$ 1.31	69.44 $\pm$ 1.42
<b>6</b>	75.92 $\pm$ 0.14	65.16 $\pm$ 2.07	67.47 $\pm$ 0.22

<sup>a</sup>Cada valor representa la media  $\pm$  error estándar (ES) de cuatro experimentos realizados por sextuplicado. Células sin exposición (**CSE**), células expuestas al radical OH• (**COH**), ácido descarboxithamnólico (**1**), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (**3**), ácido barbático (**4**), ácido condidymico (**5**), ácido isodidymico (**6**), octil metoxicinamato (**OMC**), esferoforina (**ESF**).

Teniendo en cuenta los resultados de la Tabla 5-14, se observa que todos los compuestos liquénicos y el control **OMC** presentan su mayor efecto citoprotector frente a daño oxidativo por el radical hidroxilo a una concentración de 15  $\mu$ M, mientras que el control liquénico esferoforina (**ESF**) muestra su mayor efecto citoprotector a 30  $\mu$ M. Cabe mencionar que **OMC**, **ESF**, **1** y **3** a las otras concentraciones evaluadas siguen presentando efecto citoprotector mientras que **4**, **5** y **6** a concentraciones de 30 y 50  $\mu$ M ya no protegen a las células del daño oxidativo, presentando diferencias significativas ( $p < 0.5$ ) entre los grupos comparados.

#### 5.4.2.4 Efecto protector del ADN sometido a estrés oxidativo por radical hidroxilo

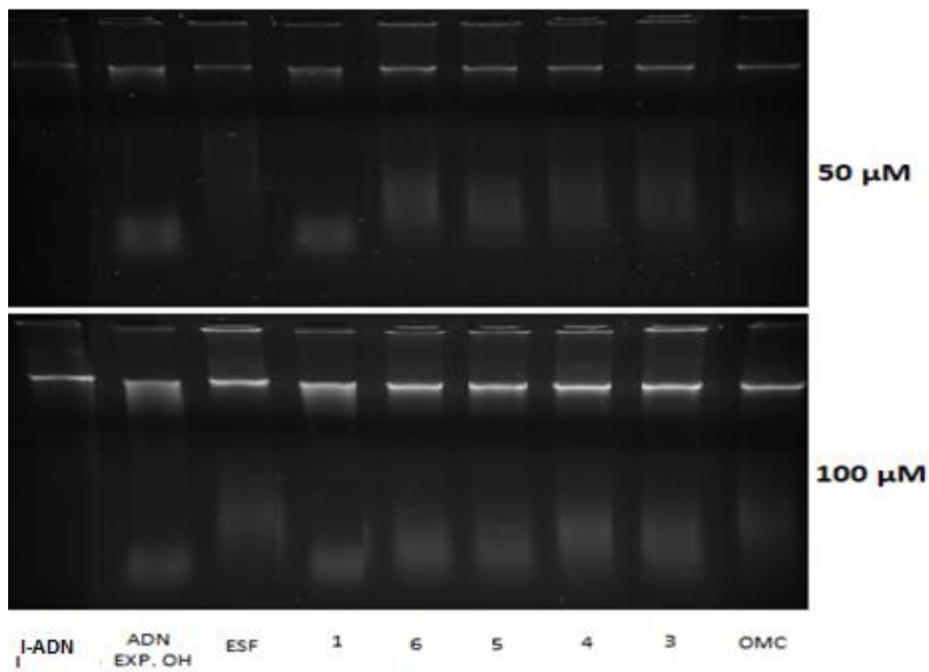
El efecto protector del ADN de los liquenoquímicos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma* en contra del daño oxidativo causado por el OH• fue evaluado midiendo el porcentaje de integridad de la cadena de ADN (% I-ADN) después de su exposición a dicho radical (producido *in situ*) en presencia o ausencia de los compuestos (Tabla 5-15).

**Tabla 5-15:** Efecto protector del ADN de los liquenoquímicos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma* contra daño oxidativo causado por el radical hidroxilo.

Muestra	Efecto protector del ADN	
	% Integridad del ADN $\pm$ ES <sup>a</sup>	
	50 $\mu$ M	100 $\mu$ M
ADN intacto	100	100
ADN expuesto a OH•	22.20 $\pm$ 0.77	22.20 $\pm$ 0.77
OMC	72.26 $\pm$ 0.19	63.25 $\pm$ 4.68
ESF	81.30 $\pm$ 1.31	84.41 $\pm$ 1.86
1	8.74 $\pm$ 0.19	30.09 $\pm$ 0.22
3	49.46 $\pm$ 0.05	73.82 $\pm$ 5.44
4	57.42 $\pm$ 2.09	60.56 $\pm$ 5.90
5	47.18 $\pm$ 2.34	56.59 $\pm$ 4.50
6	49.11 $\pm$ 2.47	57.44 $\pm$ 3.48

<sup>a</sup>Cada valor representa la media de dos o tres experimentos independientes  $\pm$  el error estándar (ES). ácido descarboxithamnólico (1), 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3), ácido barbático (4), ácido condidymico (5), ácido isodidymico (6), octil metoxicinamato (OMC), esferoforina (ESF).

El ADN intacto (100 % I-ADN) y el expuesto al OH• (ca. 22 % I-ADN) fueron los sistemas de referencia para determinar la capacidad de las muestras para evitar el daño a la integridad de la cadena de ADN. Los compuestos liquénicos fueron evaluados a 50 y 100  $\mu$ M empleando como controles el filtro solar octil metoxicinamato (OMC) y el compuesto liquénico esferoforina (ESF). Como se aprecia en la Tabla 5-15 y Figura 5-6, el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3), el ácido barbático (4), el ácido condidymico (5) y el ácido isodidymico (6) protegieron la integridad del ADN a ambas concentraciones ya que mostraron un porcentaje de integridad mayor al presentado por ADN expuesto a OH• (22.20  $\pm$  0.77 % I-ADN) ( $p < 0.5$ ), mientras que el ácido descarboxithamnólico (1) solo lo protegió a la concentración más alta. Adicionalmente, los compuestos liquénicos, incluyendo al control ESF, presentaron valores de porcentaje de integridad más altos, a la mayor concentración evaluada mientras que el filtro solar OMC presentó su mayor efecto protector a la menor concentración (72.26  $\pm$  0.19 % I-ADN / 50  $\mu$ M y 63.25  $\pm$  4.68 % I-ADN / 100  $\mu$ M) ( $p < 0.5$ ).



**Figura 5-6:** Efecto protector del ADN de los compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma* frente a daño oxidativo causado por el radical  $\text{OH}\cdot$ . Gel de agarosa obtenido de la electroforesis del ADN sometido a diferentes tratamientos: ADN no expuesto al radical (**I-ADN**), ADN expuesto al radical (**ADN EXP.OH**), ácido descarboxithamnólico (**1**), ácido barbático (**4**), ácido condidymico (**5**), ácido isodidymico (**6**), octil metoxicinamato (**OMC**) y esferoforina (**ESF**).

De todas las muestras evaluadas, los controles **OMC** y **ESF** presentaron la mayor capacidad protectora del ADN frente a daño oxidativo ( $72.26 \pm 0.19$  y  $81.30 \pm 1.31$  % I-ADN a  $50 \mu\text{M}$ , respectivamente), lo que se puede explicar considerando los mecanismos de acción que presentan dichas moléculas. Por un lado, **OMC**, es un filtro solar de naturaleza aromática capaz de absorber la radiación UVB y disiparla a través de la conjugación de sus dobles enlaces. Por otro lado, la **ESF**, es una molécula de origen líquénico con actividades antioxidante y fotoprotectora sobresalientes que posee capacidad para captar radicales libres, y para absorber a la radiación UVB (Russo, et al., 2008; Valencia-Islas, et al., 2020).

En cuanto a los compuestos líquénicos obtenidos en este estudio, **3** ( $5\alpha,8\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato), a pesar de no haber sido un antioxidante sobresaliente, fue el que presentó el porcentaje de protección del ADN más alto ( $73.82 \pm 5.44$  % I-ADN) a la concentración de  $100 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ). Esto puede deberse la presencia de diferentes tipos de cromóforos (grupo divaricatinato en C-3, dobles enlaces entre C-6 y C-7 y entre

C-21 y C-22) en la estructura del terpenoide que le permiten absorber radiación UV, tal y como lo corroboran sus propiedades UVA determinadas en este estudio, y así evitar la formación de radicales libres (Mansuri, et al., 2021).

Los compuestos **5** y **6** presentaron una actividad protectora del ADN intermedia a las concentraciones evaluadas, con porcentajes de integridad del ADN entre el 47 y el 57 % lo cual se puede asociar con las propiedades antioxidantes (capacidad captadora de radicales libres y reducción de iones férricos) y fotoprotectoras (“alta” fotoprotección UVB) que presentan. Por su parte, la sustancia liquénica con menor porcentaje de protección fue **1**, a pesar de haber sido quien presentó el mejor desempeño como agente captador de radicales libres y reductor férrico, mostrando también capacidad fotoprotectora sobresaliente frente a la radiación UVA y UVB. Esto podría interpretarse como un posible efecto prooxidante de **1** en este ensayo, pues, aunque a la mayor concentración evaluada, la protección del ADN se incrementó, esta protección siguió siendo baja en comparación a la causada por las demás sustancias ensayadas. Cabe mencionar que algunos antioxidantes de naturaleza fenólica de origen vegetal como el ácido gálico (Strlic, et al., 2002) o de origen liquénico como el ácido úsnico (Kohlhardt-Floehr, et al., 2010) han mostrado efecto prooxidante en ciertos modelos experimentales, sin embargo no se puede asumir que todas las sustancias fenólicas de origen liquénico presenten este efecto, ya que en el presente estudio la esferoforina (dépsido liquénico) no presentó propiedades prooxidantes, siendo incluso más activa para proteger al ADN frente al daño oxidativo que el filtro solar **OMC**.

Cabe mencionar que por primera vez en este estudio se reportan las propiedades protectoras del ADN frente al daño oxidativo de los compuestos aislados y controles empleados en este estudio.

#### **5.4.2.5 Estimación de la posible penetración cutánea de los liquenoquímicos aislados**

La penetración cutánea entendida como la capacidad que pueden presentar los potenciales agentes fotoprotectores y/o antioxidantes para difundirse en la barrera epidérmica externa y capas más profundas de la piel, sin alcanzar la circulación sistémica, constituye un factor importante para su desempeño como protectores de la piel contra la radiación UV, siendo deseable que estos agentes puedan permanecer en el estrato córneo

(capa más externa de la epidermis) ejerciendo su acción fotoprotectora y/o antioxidante. En este sentido, Santos, et al., 2021 han propuesto una serie de parámetros fisicoquímicos para establecer si los futuros agentes dermatológicos cumplen con dicha condición, entre estos: peso molecular (PM) del compuesto  $\leq 500$  Da, coeficiente de partición (cLogP) de 1 a 4, área de superficie polar topológica (TPSA)  $\leq 100 \text{ \AA}^2$ , y número de anillos aromáticos (Ar#) en la estructura  $\leq 2$ , siendo ideal que las moléculas cumplan estos cuatro parámetros, sin embargo cuando se presentan dos o más desviaciones a los valores propuestos, se debe hacer una evaluación más detallada a fin de no descartar agentes dermatológicos potenciales (Santos, et al., 2021).

Con la finalidad de establecer si los compuestos aislados de *T. vermicularis* y *C. cf. didyma* y fotoprotectores control cumplían con estos parámetros, se llevó a cabo su determinación *in silico* (Tabla 5-16). Considerando que el estrato córneo de la piel es de naturaleza lipofílica, las sustancias liposolubles poseen más facilidad para ser entregadas a este nivel. En este estudio, la lipofilia se determinó mediante el cálculo de cLog P. Un valor de cLogP entre 1 y 4 es indicativo de que el compuesto posee una lipofilia adecuada para ejercer su acción tópica a nivel cutáneo (Santos, et al., 2021). Asimismo, P en conjunto con  $\Delta G^{0 \rightarrow W}$  permitieron establecer la viabilidad termodinámica para que la sustancia pueda penetrar en el estrato córneo por un mecanismo de difusión pasiva. Por su parte, la TPSA permitió predecir las propiedades de transporte pasivo a través de las membranas siendo deseable que se presente un valor  $\leq 100 \text{ \AA}^2$  (Santos, et al., 2021).

**Tabla 5-16:** Parámetros fisicoquímicos para estimación de posible penetración cutánea de los liquenoquímicos aislados.

Muestra	Penetración dérmica				
	Coeficiente de partición (P)	Energía libre de Gibbs de transferencia	Área superficial Polar	Peso molecular	No anillos aromáticos
	Log P $\pm$ sd	$\Delta_r G$ (kJ / mol) $\pm$ sd	TPSA $\text{\AA}^2$	PM (g mol <sup>-1</sup> )	Ar#
<b>BEM</b>	9.98 $\pm$ 0.63	- 56.93 $\pm$ 3.59	106.82	627.81	4
<b>OMC</b>	5.54 $\pm$ 0.34	- 31.62 $\pm$ 1.94	35.53	290.40	1
<b>AVO</b>	4.70 $\pm$ 0.08	- 26.83 $\pm$ 0.48	43.37	310.39	2

**Tabla 5-16 (cont.):** Parámetros fisicoquímicos para estimación de posible penetración cutánea de los liquenoquímicos aislados.

Muestra	Penetración dérmica				
	Coeficiente de partición (P)	Energía libre de Gibbs de transferencia	Área superficial Polar	Peso molecular	No anillos aromáticos
	Log P $\pm$ sd	$\Delta_r G$ (kJ / mol) $\pm$ sd	TPSA $\text{\AA}^2$	PM (g mol <sup>-1</sup> )	Ar#
1	2.98 $\pm$ 0.11	- 17.01 $\pm$ 0.65	150.59	376.31	2
3	9.78 $\pm$ 0.95	- 55.79 $\pm$ 5.45	74.22	620.84	1
4	4.35 $\pm$ 0.47	- 24.83 $\pm$ 2.66	113.29	360.36	2
5	7.93 $\pm$ 0.38	- 45.26 $\pm$ 2.18	79.90	398.48	3
6	6.86 $\pm$ 0.37	- 39.15 $\pm$ 2.10	79.90	370.43	3

Como se aprecia en la

Tabla 5-16, tanto los compuestos aislados como los filtros solares control poseen carácter lipofílico al presentar un cLogP mayor a 1, que aunado a su valor negativo de  $\Delta G^{\theta}_{0 \rightarrow w}$  permiten establecer que su penetración hacia el estrato córneo ocurre de manera espontánea. Sin embargo, sus valores de cLogP no caen en el rango óptimo establecido a excepción del ácido descarboxithamnólico (**1**).

Considerando en conjunto todos los parámetros fisicoquímicos calculados (cLogP, TPSA, PM y Ar#), los filtros solares octil metoxicinamato (**OMC**) y avobenzona (**AVO**), cumplen con tres de éstos (TPSA, PM y Ar#), mientras que bemotrizinol (**BEM**) no cumple con ninguno. Respecto a los compuestos aislados, los ácidos condidymico (**5**) e isodidymico (**6**) cumplen con dos de los parámetros (TPSA y PM) al igual que el ácido barbático (**4**) (PM y Ar#) y el 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (**3**) (TPSA y Ar#). Finalmente, **1** cumple con tres (cLogP, PM y Ar#) de los cuatro parámetros, lo cual sería indicativo de que posee propiedades adecuadas para ejercer su efecto en el estrato córneo, colocándolo en ventaja respecto a los demás compuestos.

#### 5.4.2.6 Correlación entre la estructura química de los liquenoquímicos aislados con su actividad antioxidante y fotoprotectora

Tomando como base los resultados de la actividad antioxidante (poder captador de radicales libres DPPH•, poder reductor férrico, poder inhibidor de la peroxidación lipídica, efecto citoprotector y protector del ADN frente a daño oxidativo por el radical OH•) y actividad fotoprotectora (FPS,  $\lambda_{crit}$ , UVA-r\*) de los liquenoquímicos aislados, se aprecia que el ácido descarboxithamnólico (**1**) es el agente que presentó la mayor actividad antioxidante siendo capaz de captar radicales libres, reducir iones férricos, de proteger a las células y al ADN de daño oxidativo por el radical OH• y a su vez tiene la mayor (“alta”) capacidad fotoprotectora UVB y UVA, así como también tiene propiedades fisicoquímicas favorables para ser entregado al estrato córneo de la piel para ejercer su efecto tópico convirtiéndolo en un agente dual. Los resultados obtenidos para el compuesto **1** coinciden con los reportados con anterioridad para este compuesto, respecto a la actividad fotoprotectora y antioxidante (Rojas, et al., 2015). Además, otro estudio reportó la actividad protectora de células de fibroblasto del compuesto **1** frente al daño oxidativo producido por especies reactivas de oxígeno derivadas del peróxido de hidrógeno, siendo equiparable a los resultados obtenidos para este compuesto en el presente trabajo con los queratinocitos sometidos a las mismas condiciones de estrés oxidativo (Haiyuan, Y., et al. 2019).

Por su parte, los ácidos condidymico (**5**) e isodidymico (**6**) también presentan actividad antioxidante captando radicales libres y reduciendo iones férricos, protegen a las células y al ADN de daño oxidativo por el radical OH• y presentan solo propiedades fotoprotectoras UVB altas. A diferencia de **1**, estos compuestos solo cumplen con tres de los parámetros fisicoquímicos para su óptima entrega al estrato córneo de la piel. Respecto al 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (**3**), este es un compuesto que a pesar de ser un antioxidante débil como agente captador de radicales libres, posee poder reductor férrico, protege a las células y al ADN de daño oxidativo por el radical OH• y tiene propiedades fotoprotectoras UVA altas; al igual que **5** y **6**, solo cumple con tres de los parámetros fisicoquímicos deseados. Finalmente, el ácido barbático (**4**) resultó ser un compuesto que posee propiedad antioxidante muy baja en comparación con los patrones y que presenta “baja a moderada” fotoprotección UVB y solo cumple con tres de los parámetros fisicoquímicos deseados, siendo considerado como el compuesto menos prometedor en este estudio.

Para los compuestos **3**, **5** y **6** no se encontraron reportes de su actividad antioxidante ni fotoprotectora. Con respecto al compuesto **4**, solo se encontraron reportes de la actividad antioxidante como captador de radicales libres DPPH (Tang, Y., et al. 2015). Aunque en un estudio más reciente se mostró que carecía de capacidad antioxidante como captador de radicales libres ABTS, ensayo equiparable al poder captador de radicales libres DPPH (Santiago, R., et al. 2020).

Comparando la estructura química de los dépsidos **1** y **4** (Figura 5-7) con su actividad antioxidante y fotoprotectora, a pesar de que ambos poseen un patrón estructural de  $\beta$ -orcinol, por el hecho de que **1** presente un grupo hidroxilo adicional en el anillo B y que los metilos en C-3 del anillo A y C-3' del anillo B se encuentren en forma oxidada como ácido carboxílico y aldehído, respectivamente, le brinda mejores propiedades antioxidantes. Al comparar el anillo A de los dos compuestos se observa que el grupo hidroxilo en el compuesto **1** se encuentra cercano a un grupo ácido carboxílico en la posición 3, mientras que en el compuesto **4** en esa misma posición se encuentra un metilo, el cual tiene un efecto inductivo que permite la estabilización del radical fenoxilo, pero al parecer y como se evidencia en esta molécula la estabilización de este radical es preferentemente por el mecanismo de puentes de hidrogeno intramoleculares con grupos como ácido carboxílico o aldehídos (Yañez, O., et al. 2023). Respecto a sus propiedades fotoprotectoras también estas se ven incrementadas (mejora su absorción UVB y UVA) respecto a **4**, corroborando que el farmacóforo en **1** está en el anillo aromático B, tal y como estudios previos lo han establecido (Rojas, et al., 2015).

Respecto a los compuestos **5** y **6**, dos dibenzofuranos, estos presentaron actividad antioxidante moderada a alta con respecto a los patrones empleados de BHT y ácido gálico, la actividad en estas dos moléculas está dada principalmente por la presencia del grupo hidroxilo en el anillo B, el cual puede ser un electrodonador estabilizado por su cercanía con el grupo del ácido carboxílico, de la misma manera que se explicó anteriormente. Por otro lado, la extensión de las cadenas alifáticas en cada una de las moléculas generó cambios significativos en la actividad antioxidante, una posible explicación que ha sido reportada para este tipo de moléculas, en las cuales el fenol esta sustituido por grupos alquilo, es que las cadenas alifáticas pueden estabilizar el radical fenoxilo a través de un efecto inductivo aumentando así la capacidad antioxidante. Por otro lado, si el sustituyente alquilo es muy voluminoso puede generar un efecto estérico



estabilización de su forma radicalaria por conjugación con el anillo. Los resultados de los ensayos de citoprotección y protección del ADN para este compuesto fueron comparables con los patrones, a pesar de no ser tan activa en los otros ensayos de actividad antioxidante *in vitro*, posiblemente su desempeño en estos dos ensayos se deba a que esta molécula cumplió con algunas características fisicoquímicas que le permitían interactuar como antioxidante a nivel celular e incluso con el ADN directamente, entre ellas la lipofilicidad de la molécula ( $\text{Log P } 9.78 \pm 0.95$ ), característica que le permite ubicarse a nivel de membrana celular en la bicapa lipídica, y desde allí protege las células del daño oxidativo por peroxidación lipídica. Lo anterior es acorde también con otros parámetros fisicoquímicos de permeación evaluados para esta molécula, como la energía libre de Gibbs, el área superficial polar, y el número de anillos aromáticos, cuyos valores obtenidos permiten inferir que su paso a través de la membrana por transporte pasivo es factible, y desde allí ejercer su efecto citoprotector.

Con respecto a la actividad fotoprotectora, se ha descrito que entre mayor sea el número de sustituyentes en una molécula así mismo se hará mayor su absorción al UV, además que, según lo reportado para filtros solares, esta absorción se ve altamente favorecida en sistemas aromáticos conjugados con varios grupos electronegativos, generalmente grupos oxigenados o nitrogenados (Nguyen, et al. 2013). Así mismo, como se mencionó en las características moleculares de los compuestos aromáticos en la actividad antioxidante, la posición y la naturaleza de los sustituyentes tienen efecto en la actividad, en este caso en el patrón de absorción al UV, es así como un patrón de sustitución en donde se presente tautomerización ceto-enol y se favorezca la forma enólica hace que la absorción se amplíe a la región del UVA (Nguyen, et al. 2013).

De acuerdo con las estructuras de los compuestos aislados, se encontró que todos están poli-sustituídos, y que además presentaron grupos donantes de electrones como los grupos hidroxilo que se encuentran conjugados con los anillos aromáticos y otros sustituyentes electronegativos como grupos de ácido carboxílico o aldehído. Analizando las características particulares de los compuestos, se observó que el compuesto **1**, el cual presentó absorción ante la radiación UVA y al UVB, tuvo el mayor número de sustituyentes electrodonadores, además que, específicamente en el anillo B y de acuerdo con la posición de los dos grupos hidroxilo y el aldehído presentan la posibilidad de tautomerización ceto-enol, haciendo que esta molécula presente absorción en las dos regiones del UV. Con

respecto a las moléculas **4**, **5** y **6**, resultaron ser fotoprotectores de tipo UVB principalmente, lo cual coincide con lo reportado para este tipo de moléculas, los dépsidos y los dibenzofuranos cuyos patrones característicos de absorción se dan mayoritariamente en la región del UVB. Por último el compuesto **3**, un terpenoide fenólico presentó baja protección en la región del UVB, pero actividad fotoprotectora en el UVA, posiblemente y a pesar de la presencia del grupo aromático con un grupo hidroxilo las absorción cambia drásticamente por la presencia del terpenoide, haciendo que absorba principalmente en el UVA, posiblemente por la presencia del grupo peroxi y el doble enlace del anillo B del terpeno, pero se requeriría de más ensayos con un derivado que no contenga el anillo aromático para poder concluir esto.

## **5.5 Bioproducción de compuestos liquénicos por inmovilización celular**

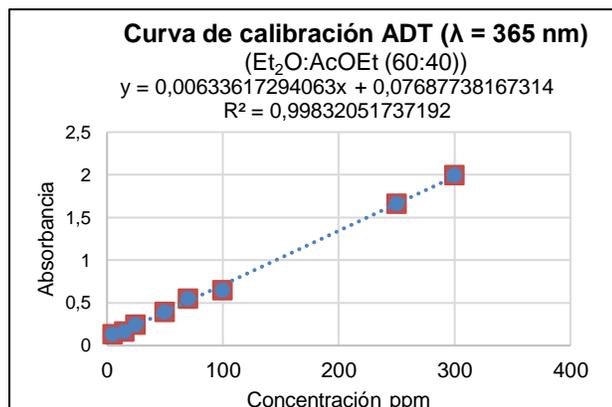
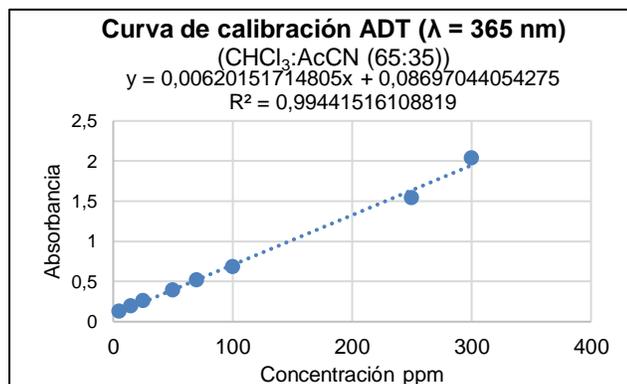
La extracción y purificación de compuestos liquénicos bioactivos a gran escala tiene el inconveniente de que requiere de la recolección de grandes cantidades de material biológico o biomasa. Este problema adquiere importancia dada la baja tasa de crecimiento de estos organismos y el poco conocimiento que se tiene para su cultivo a fin de explotarlos de manera sostenible. Con la finalidad de minimizar el problema de suministro de metabolitos liquénicos, se están desarrollando métodos biotecnológicos, que involucran principalmente el cultivo de tejidos (en donde el micobionte se aísla para que biosintetice a los metabolitos) y la inmovilización celular de talos liquénicos (en donde ambos organismos se encuentran en simbiosis). Considerando que gran parte de las sustancias liquénicas son metabolitos exclusivos de la unión simbiótica entre el micobionte y el organismo fotosintético (fotobionte), siendo biosintetizados por el hongo a partir de la fuente de carbono que el brinda el fotobionte, la técnica de inmovilización celular del talo liquénico tiene la ventaja de que al emplear al talo íntegro, ambos organismos se encuentran en simbiosis, además de que emplea una cantidad de biomasa pequeña, su mantenimiento resulta relativamente económico, las células liquénicas presentan elevada longevidad y la tasa de bioproducción de metabolitos secundarios es rápida (Pereira, et al., 2017), razón por la cual esta técnica fue la que se trabajó en este estudio.

---

Dentro de las sustancias liquénicas destacan las moléculas de naturaleza fenólica que son producidas en su gran mayoría por la ruta del acetato polimalonato (también denominada ruta de los policétidos). Esta ruta es activada enzimáticamente cuando el talo es expuesto a la luz haciendo que los fotobiontes mantengan reservas de acetil CoA que a su vez es el precursor de esta ruta biosintética (Martins, et al., 2017). Por ello, emplear acetato de sodio (NaOAc) como precursor, es recomendable, pues estimula al líquen para que produzca metabolitos.

Considerando que el ácido descarboxithamnólico (1 o ADT) fue el compuesto que presentó la mayor actividad antioxidante, fotoprotectora y propiedades fisicoquímicas adecuadas para un desempeño óptimo como agente dermatológico además de ser un compuesto fenólico mayoritario en el líquen *T. vermicularis*, este metabolito se escogió para llevar a cabo su bioproducción mediante la técnica de inmovilización celular del talo de dicho líquen.

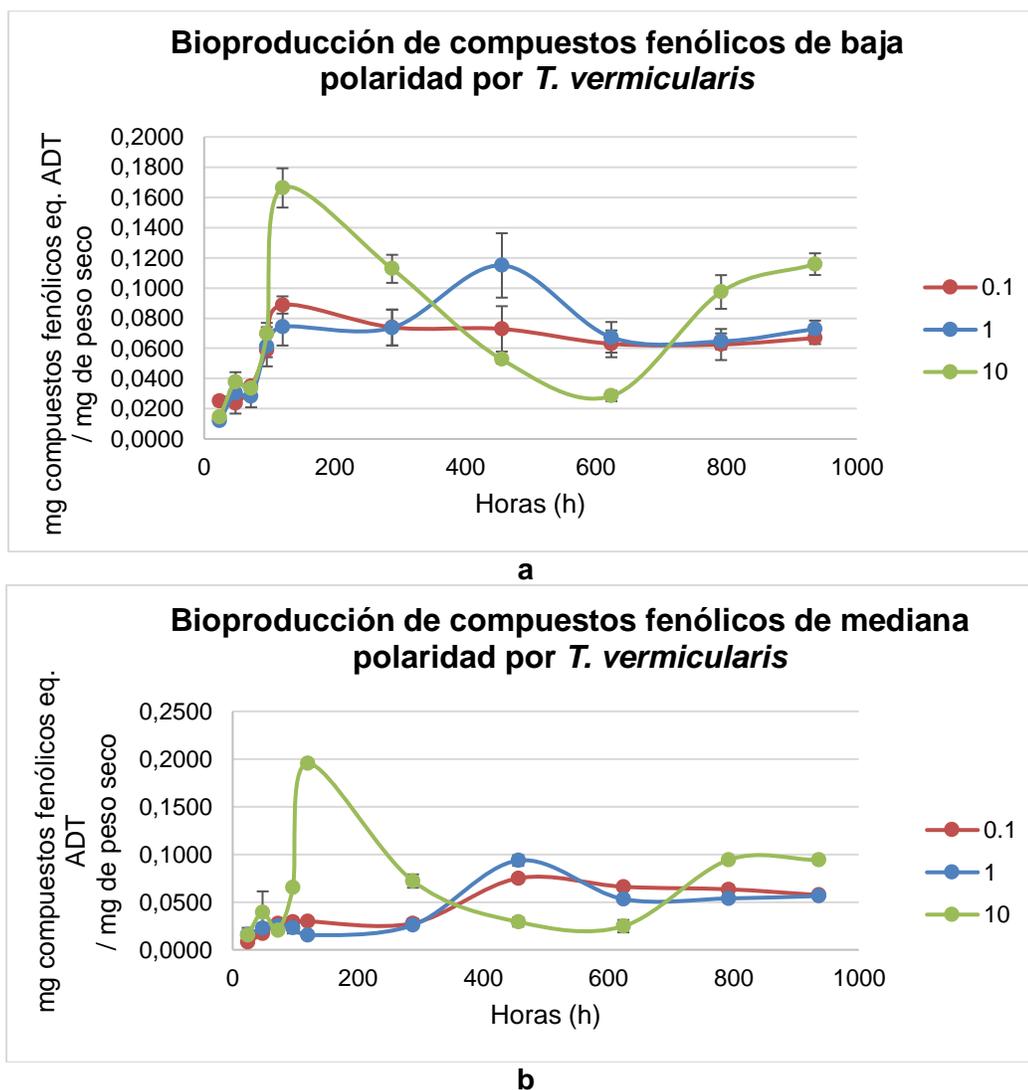
Teniendo en cuenta que la concentración del precursor biosintético es un factor importante durante el proceso de bioproducción, se ensayaron tres concentraciones de NaOAc (0.10, 1.0 y 10.0 mM) con el propósito de encontrar la concentración óptima para la bioproducción de los metabolitos secundarios. Para llevar a cabo el seguimiento de la bioproducción y cuantificación de compuestos fenólicos (incluido el ADT), se construyeron dos curvas de calibración empleando como patrón de cuantificación ADT en los sistemas de disolventes de extracción (Figura 5-8). Los sistemas de disolventes para la extracción y cuantificación de los compuestos fenólicos a partir de las alícuotas obtenidas durante la inmovilización del talo fueron Et<sub>2</sub>O:AcOEt (60:40) para compuestos fenólicos de baja polaridad y CHCl<sub>3</sub>:AcCN (65:35) para los de mediana polaridad.

**a****b**

**Figura 5-8.** Curvas de calibración de ácido descarboxithamnólico (1 o ADT; 5 a 300 ppm). **a:** extracción de compuestos de baja polaridad (Et<sub>2</sub>O:AcOEt (60:40)); **b:** extracción de compuestos de mediana polaridad (CHCl<sub>3</sub>:AcCN (65:35)).

El seguimiento del proceso de bioproducción se llevó a cabo durante 5 semanas (936 h) tiempo en el cual se cuantificó espectrofotométricamente la bioproducción de compuestos fenólicos de baja y mediana polaridad (Figura 5-9) y adicionalmente se corrieron perfiles cromatográficos por CCD de los compuestos bioproducidos (Figura 5-10). Al final del proceso, se cuantificó el ADT total bioproducido por cada tratamiento mediante HPLC (Figura 5-11).

Con la finalidad de evaluar la viabilidad de los talos liquénicos al inicio y final del proceso de bioproducción, se retiró una pequeña porción de talo de cada uno de los reactores en ambos momentos, el cual fue cortado y sometido a tinción con rojo neutro, colorante vital que solo es incorporado en las células liquénicas cuya función de regulación de la membrana está intacta. También se comparó la morfología del talo liquénico al inicio y final del proceso de bioproducción en búsqueda de cambios evidentes (Figura 5-12).



**Figura 5-9:** Bioproducción de compuestos fenólicos (equivalentes a ADT por mg de residuo seco obtenido de la alícuota de inmovilización) por *T. vermicularis* empleando NaOAc (0.10, 1.0 y 10.0 mM) como precursor biosintético y caolinita como matriz de inmovilización.

Como se observa en la Figura 5-9, a, para todos los tratamientos se presenta un aumento en la bioproducción de compuestos fenólicos de baja polaridad entre 0 y 120 h. En el caso del líquen inmovilizado suministrado con los tratamientos de NaOAc 0.10 y 10.0 mM justo a este periodo de tiempo, alcanzaron el mayor pico de bioproducción (0.0887 y 0.1663 mg compuestos fenólicos eq. ADT/ mg de residuo, respectivamente). Para el tratamiento suministrado con 0.10 mM a partir de 120 h la bioproducción decae (ca. 0.07 mg compuestos fenólicos eq. ADT/ mg de residuo) manteniéndose constante hasta el final del ensayo. En el caso del tratamiento suministrado con 10.0 mM, después de las 120 h se aprecia una reducción en la bioproducción de compuestos alcanzando un mínimo a las

624 h (0.0284 mg compuestos fenólicos eq. ADT/ mg de residuo) y a partir de ese tiempo se vuelve a incrementar la bioproducción paulatinamente hasta el final del ensayo (0.1158 mg compuestos fenólicos eq. ADT/ mg de residuo). El cambio en la tendencia en la bioproducción de compuestos para los montajes de 10.0 mM de acetato de sodio, puede deberse a que al principio de la inmovilización y con una concentración alta del precursor, se estimula las enzimas policétido sintetasas (PKSs) para la producción de compuestos fenólicos, pero una vez la se han producido de manera suficiente, se inactiva la enzima bajando su pico de producción, y con el pasar del tiempo el líquen aún viable activa de nuevo su metabolismo secundario, especialmente las enzimas PKSs, generando una nueva elevación de la producción.

Respecto al tratamiento suministrado con NaOAc 1.0 mM, después de 120 h se observa un aumento en la bioproducción de compuestos fenólicos de baja polaridad alcanzando su mayor pico de bioproducción a las 456 h a partir de las cuales empieza a disminuir hasta un valor ca. 0.07 mg compuestos fenólicos eq. ADT/ mg de residuo, el cual no presenta diferencias significativas ( $p > 0.5$ ) con el tratamiento suministrado con 0.10 mM, manteniéndose constante hasta el final del ensayo.

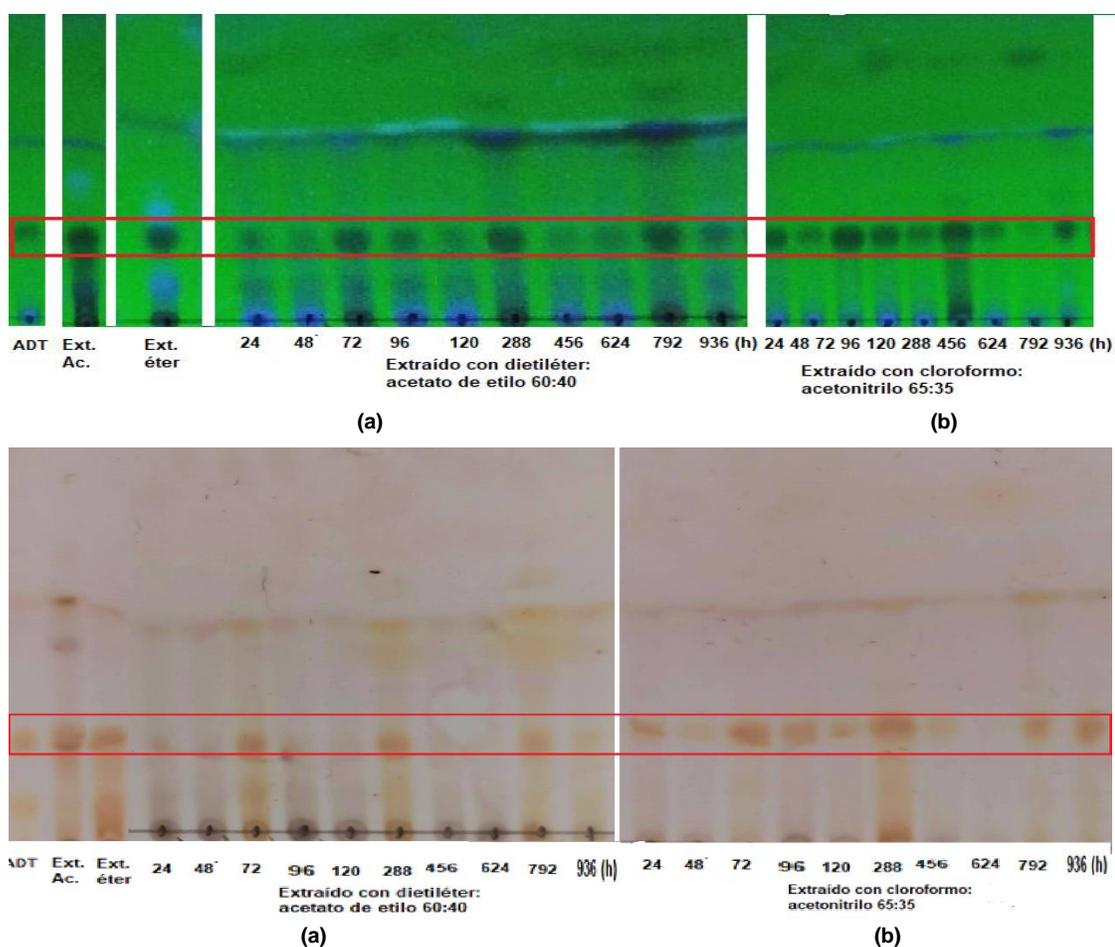
Comparando la cantidad de compuestos fenólicos de baja polaridad bioproducidos con los tres tratamientos, el suministrado con NaOAc 10.0 mM permitió la mayor bioproducción de estos compuestos, seguido del tratamiento con 1.0 mM. Adicionalmente el tratamiento suministrado con NaOAc 10.0 mM permitió una mayor bioproducción en un tiempo más corto.

Respecto a la bioproducción de compuestos fenólicos de mediana polaridad (Figura 5-9, b), se aprecia un comportamiento parecido, en donde las tres concentraciones del precursor suministrado causan un incremento en la bioproducción hasta las 120 h. Al igual que en caso anterior, el tratamiento suministrado con NaOAc 10.0 mM permitió la mayor bioproducción de estos compuestos en un tiempo más corto, seguido del tratamiento con 1.0 y 0.10 mM.

Algo que se puede evidenciar durante el proceso de bioproducción, por ejemplo, con el tratamiento suministrado con NaAcO 10.0 mM a las 120 h (en donde se presentó el máximo pico de bioproducción), es que se está favoreciendo la bioproducción de compuestos

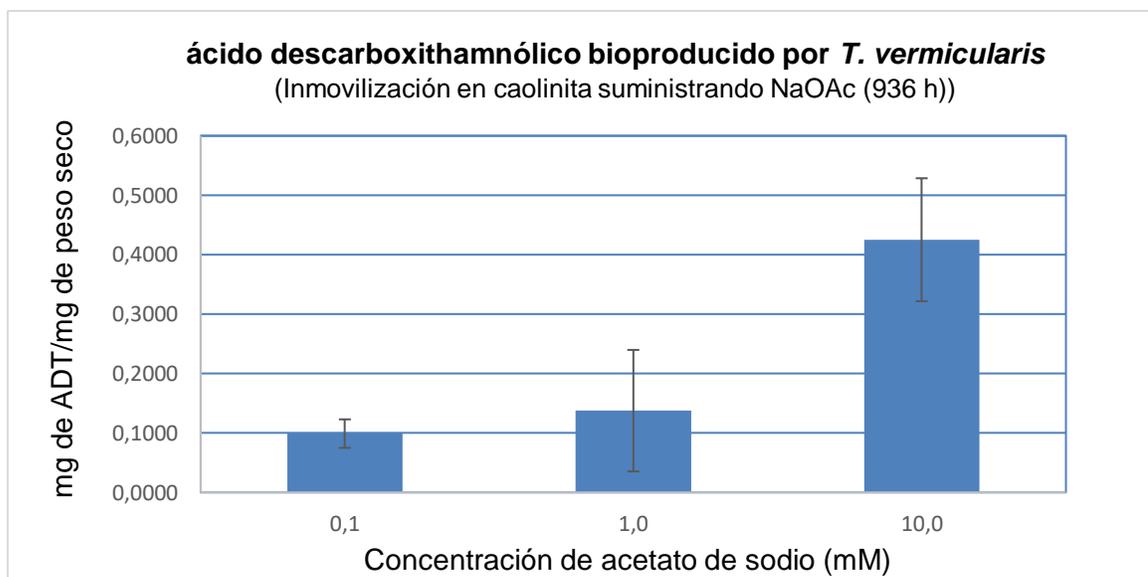
fenólicos de mediana polaridad (0.1954 mg compuestos fenólicos eq. ADT/ mg de residuo vs los de baja polaridad (0.1663 mg compuestos fenólicos eq. ADT/ mg de residuo).

Analizando los perfiles cromatográficos para este mismo tratamiento (Figura 5-10), se aprecia que las fracciones representativas de los compuestos fenólicos de baja polaridad presentan una mayor diversidad de constituyentes vs a los de mediana polaridad estando presente en ambos sistemas el ADT. Se puede sugerir que el ADT está en mayor concentración en la fracción de compuestos de mediana polaridad dada su mayor solubilidad en disolventes más polares.



**Figura 5-10:** Perfiles cromatográficos de la bioproducción de compuestos fenólicos de baja (a) y mediana (b) polaridad por *T. vermicularis* mediante inmovilización celular en caolinita suministrada con NaOAc (10 mM). Ácido descarboxithamnólico (ADT), extracto en acetona del líquen (Ext. Ac.), extracto en éter del líquen (Ext. Éter) reveladas con UV (arriba) y ácido sulfúrico (abajo).

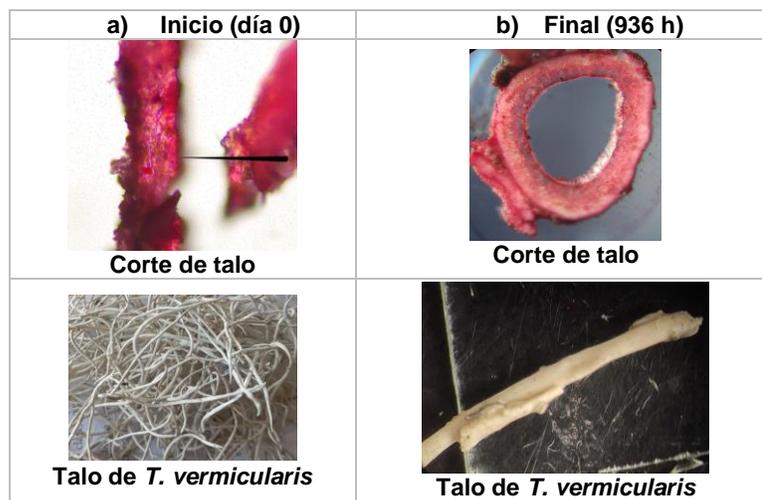
Al cuantificar el ADT bioproducido durante todo el proceso de inmovilización (Figura 5-11), se encontró que el tratamiento suministrado con NaOAc 10.0 mM condujo a la mayor bioproducción de este compuesto por el talo de *T. vermicularis* (0.425 mg ADT/ mg de residuo) respecto a las otras concentraciones del precursor estudiadas (0.138 y 0.099 mg ADT/ mg de residuo para 0.10 y 1.0 mM, respectivamente). Por lo cual, esta concentración de precursor biosintético resulta la más favorable para ser considerada en estudios posteriores. Adicionalmente, cabe destacar que bajo esta concentración, se alcanzó el pico de máxima bioproducción a un periodo de tiempo más corto que el presentado por los otros tratamientos y tomando como base la cantidad obtenida con este tratamiento, nos indicaría que la sustancia que se está bioproduciendo preferiblemente es el ADT con un porcentaje de rendimiento del 42.5 %. Si se comparan los tratamientos donde se suministró NaOAc 0.10 y 1.0 mM como precursor biosintético, no se aprecian diferencias significativas en las cantidades de ADT bioproducidas ( $p > 0.5$ ), lo que indicaría que el incremento de la concentración de 0.10 a 1.0 mM no tiene repercusión en el proceso de bioproducción de ADT.



**Figura 5-11:** Ácido descarboxithanólico (1 o ADT) bioproducido por inmovilización celular del talo líquénico de *T. vermicularis* en caolinita suministrando acetato de sodio (NaAcO, 0.1, 1.0 y 10.0 mM) como precursor biosintético.

Respecto a la viabilidad del talo líquénico durante el proceso de bioproducción (Figura 5-12a), se puede apreciar que tanto las células del talo al inicio como al final del experimento

incorporaron el colorante vital, dando indicios de su viabilidad. Asimismo, no se aprecian cambios evidentes en cuanto a la forma del talo, salvo un ligero cambio de coloración de blanco a ligeramente amarillo (Figura 5-12b), lo cual daría indicios de que este talo se encuentra viable para seguir bioproduciendo compuestos por un periodo más largo.



**Figura 5-12:** Corte del talo de *T. vermicularis* (40X) antes (a) y después (b) del ensayo teñido con rojo neutro (arriba). Apariencia del talo antes y después del ensayo (abajo). Corte trasversal.

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

- A partir del estudio químico de la especie líquénica *Thamnolia vermicularis* se aisló y caracterizó al ácido descarboxythamnólico (1) y al arabitol (2), mientras que de *Cladonia* cf. *didyma* se aisló y caracterizó al 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxiergosteril divaricatinato (3), al ácido barbático (4), al ácido condidymico (5) y al ácido isodidymico (6). El compuesto 3 es por primera vez reportado para *C.* cf. *didyma* en este estudio, siendo una contribución al conocimiento de sus constituyentes químicos.
- El ácido descarboxythamnólico (1) fue el agente que presentó la mayor actividad antioxidante siendo capaz de captar radicales libres, reducir iones férricos, de proteger a los queratinocitos y al ADN de daño oxidativo por el radical OH• y a su vez presentó la mayor capacidad fotoprotectora UVB y UVA sin llegar a ser de amplio espectro, así como también tiene propiedades fisicoquímicas favorables para ser entregado al estrato córneo de la piel para ejercer su efecto tópico, convirtiéndose en un agente dual prometedor para su posible desarrollo como protector solar.
- El 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxiergosteril divaricatinato (3), a pesar de no haber sido un agente antioxidante sobresaliente en los modelos empleados, presentó “alta” capacidad fotoprotectora UVA y propiedades citoprotectoras de queratinocitos y protectoras del ADN frente a daño oxidativo, además de cumplir algunas propiedades fisicoquímicas para ejercer su efecto tópico, convirtiéndose en un agente de interés para combinarlo con otros agentes en el desarrollo de protectores solares de amplio espectro.
- Los ácidos condidymico (5) e isodidymico (6) resultaron ser antioxidantes que captan radicales libres, reducen iones férricos, protegen a las células y al ADN de daño oxidativo por el radical OH• y presentan solo propiedades fotoprotectoras UVB altas además de que cumplen algunas propiedades fisicoquímicas para ejercer su efecto tópico, convirtiéndose en agentes de posible interés para combinarlos con otros agentes en desarrollo de protectores solares.

- 
- El ácido barbático (4) resultó ser un compuesto que carece de propiedades antioxidantes y fotoprotectoras sobresalientes.
  - La inmovilización celular del líquen *Thamnolia vermicularis* empleando caolín como matriz de inmovilización y flujo continuo de acetato de sodio 10 mM como precursor biosintético permitió la bioproducción de ácido descarboxythamnólico (metabolito secundario mayoritario en la especie) con el mayor rendimiento (ca. 42%) frente a las otras concentraciones evaluadas del precursor.
  - Se establecieron posibles correlaciones entre la estructura y la actividad antioxidante y fotoprotectora, encontrando que las siguientes características son importantes para su actividad, de acuerdo a lo reportado con la literatura: patrón de sustitución de B-orcinol, número de hidroxilos y la cercanía entre ellos, sustituciones con grupos ácido carboxílico o aldehídos vecinos a los grupos hidroxilo para formar puentes de hidrógeno, sustitución alifática que ejerzan efectos inductivos que estabilicen la formación de radicales fenoxilo en la estructura, que el patrón de B-orcinol de los compuestos aislados de los dos líquenes estudiados.
  - La presente investigación representa un aporte al conocimiento químico y de actividad biológica de los líquenes incluyendo a los del páramo de Sumapaz, además de que contribuye a la explotación sostenible de este recurso natural a través de la implementación de una técnica biotecnológica para el suministro de liquenoquímicos de interés.

## 6.2 Recomendaciones

Se recomienda profundizar en los estudios químicos de compuestos minoritarios de las dos especies líquénicas a fin de obtener compuestos que en este estudio no pudieron obtenerse en cantidad suficiente para ser estudiados.

Se recomienda llevar a cabo estudios de formulación para poder ensayar la actividad fotoprotectora de los compuestos **1**, **5** y **6** a nivel *in vivo* con el fin de confirmar su actividad como protectores solares. Asimismo, se recomienda llevar a cabo estudios de toxicidad dérmica y posible absorción sistémica de estos compuestos.

Se recomienda llevar a cabo la técnica biotecnológica de inmovilización celular con la otra especie *Cladonia* cf. *didyma*, con el fin de evaluar la producción de compuestos de este líquen bajo las condiciones establecidas en el presente trabajo a fin de evaluar su actividad biológica en otros modelos.

---

## Bibliografía

- Addor, F. (2017). Antioxidants in dermatology. *Anais brasileiros de dermatologia*, 92, 356-362.
- Afonso, S., Horita, K., Silva, J., Almeida, I., Amaral, M., Lobão, P., & Lobo, J. (2014). Photodegradation of avobenzene: Stabilization effect of antioxidants. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 140, 36-40.
- Aguirre, J. (2006). Diversidad de los musgos (Briophyta) y líquenes de Colombia-Una evaluación con propósitos de conservación (Doctoral dissertation, Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá).
- Aguirre, J. (2008). Diversidad y riqueza de musgos y líquenes en Colombia-Generalidades y metodología. *Colombia diversidad biótica VI: Riqueza y diversidad de los musgos y líquenes en Colombia*, 1-17.
- Allegra, A., Pioggia, G., Tonacci, A., Musolino, C., & Gangemi, S. (2020). Oxidative stress and photodynamic therapy of skin cancers: Mechanisms, challenges, and promising developments. *Antioxidants*, 9(5), 448.
- Araújo, R., Silva, F., Melo-Junior, M., & Porto, A. (2011). Metaloproteinasas: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização.
- Asturnatura, líquenes y micorrizas. (2021). Líquenes y micorrizas. <https://www.asturnatura.com/articulos/hongos/liquenes-micorrizas.php>.
- Baek, J., & Lee, M. (2016). Oxidative stress and antioxidant strategies in dermatology. *Redox Report*.
- Benzie, I., & Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bernal, R., Gradstein, S., & Celis, M. (2015). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Bernat, R., (2021). «Recomendaciones Sobre Fotoprotección En Una Oficina De Farmacia». Begoña.

- 
- Bharate, S., Kumar, V., & A Vishwakarma, R. (2016). Determining partition coefficient (Log P), distribution coefficient (Log D) and ionization constant (pKa) in early drug discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 19(6), 461-469.
- Bhattacharyya, S., Deep, P., Singh, S., & Nayak, B. (2016). Lichen secondary metabolites and its biological activity. *Am. J. PharmTech Res*, 6(6), 1-7.
- Bei, J., Qin-Shi, Z., Li-Yan, P., Zhong-Wen, L., & Han-Dong, S. (2002). Constituents from *Thamnolia vermicularis*. *Plant Diversity*, 24(04), 1.
- Bi, W., He, C., Ma, Y., Shen, J., Zhang, L. H., Peng, Y., & Xiao, P. (2016). Investigation of free amino acid, total phenolics, antioxidant activity and purine alkaloids to assess the health properties of non-Camellia tea. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(2), 170-181.
- Birben, E., Sahiner, U., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization* 5: 9-19.
- Blanch, M., Blanco, Y., Fontaniella, B., Legaz, M., & Vicente, C. (2001). Production of phenolics by immobilized cells of the lichen *Pseudevernia furfuracea*: the role of epiphytic bacteria. *International Microbiology*, 4, 89-92.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bucke, C. (1983). Immobilized cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 300(1100), 369-389.
- Buso, P., Radice, M., Baldisserotto, A., Manfredini, S., & Vertuani, S. (2017). Guidelines for the development of herbal-based sunscreen. In *Herbal medicine*. IntechOpen.
- Calcott, M., Ackerley, D., Knight, A., Keyzers, R., & Owen, J. (2018). Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chemical Society Reviews*, 47(5), 1730-1760.
- Carmichael, J., DeGraff, W., Gazdar, A., Minna, J., & Mitchell, J. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer research*, 47(4), 936-942.
- Castro Mandujano, O. (2010). Contribución al estudio fitoquímico del líquen *Thamnolia vermicularis* subsp. *Vermicularis* S. STR. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(4), 322-329.
- Chester, D., Elix, J., & Kennedy, J. (1986). Isodidymic Acid, a new dibenzofuran from the lichen. *Cladonia didyma*. *Australian journal of chemistry*, 39(11), 1759-1764.
- Chibata, I., & Wingard, L. (Eds.). (2014). *Immobilized Microbial Cells: Applied Biochemistry and Bioengineering*, Vol. 4. Elsevier.
- Choi, R., Ham, J., Yeo, J., Hur, J., Park, S., Kim, M., & Lee, M. (2017). Anti-obesity property of lichen *Thamnolia vermicularis* extract in 3T3-L1 cells and diet-induced obese mice. *Preventive Nutrition and Food Science*, 22(4), 285.

- 
- Consortium of North American Lichen Herbaria – CNALH. (2023). *Thamnolia vermicularis*. <https://lichenportal.org/portal/taxa/index.php?taxon=Thamnolia+vermicularis&formsubmit=Search+Terms>.
- Consortium of North American Lichen Herbaria – CNALH. (2023). *Cladonia didyma*. <https://lichenportal.org/portal/taxa/index.php?taxon=Cladonia+didyma&formsubmit=Search+Terms>.
- Coskun, Z., Ersoz, M., Acikgoz, B., Karalti, I., Cobanoglu, G., & Sesal, C. (2015). Anti-proliferative and apoptotic effects of methanolic extracts from different *Cladonia* species on human breast cancer cells. *Folia biologica*, 61(3), 97.
- Cuenta de alto costo. (2019). Situación del Cáncer en la población adultos atendida en el SGSSS de Colombia - 2019. <https://cuentadealtocosto.org/site/publicaciones/situacion-del-cancer-en-la-poblacion-adultos-atendida-en-el-sgsss-de-colombia-2019/>.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific reports*, 7(1), 42717.
- De Fabo, E., Noonan, F., Fears, T., & Merlino, G. (2004). Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer research*, 64(18), 6372-6376.
- De Valencia, M. (2002). Hongos liquenizados (Vol. 8). Univ. Nacional de Colombia.
- Devkota, S., Chaudhary, R., Werth, S., & Scheidegger, C. (2017). Indigenous knowledge and use of lichens by the lichenophilic communities of the Nepal Himalaya. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13(1), 1-10.
- Díaz, M. Estudio del Potencial Antioxidante de una especie selecta de Liquen Colombiano del género *Usnea*. Bogotá, Colombia. 2008 (Tesis Maestría. Universidad Nacional de Colombia).
- Diffey, B. (1984). Whatever happened to the erythematous unit. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 1, 103-105.
- Domiczak, M. (2007). Lípidios e lipoproteínas. *Bioquímica médica*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 233-252
- Donglikar, M., & Deore, S. (2016). Sunscreens: A review. *Pharmacognosy Journals*, 8(3).
- Dutra, E., Oliveira, D., Kedor-Hackmann, E., & Santoro, M. (2004). Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40, 381-385.
- 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), 3714-3717.
- Espín de Gea, J., Soler-Rivas, C., Wichers, H., & García-Viguera, C. (2000). Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff.

- 
- Fernández-Moriano, C., Gómez-Serranillos, M., & Crespo, A. (2016). Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharmaceutical Biology*, 54(1), 1-17.
- Finter, N. (1969). Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays. *Journal of General Virology*, 5(3), 419-427.
- Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo. (2018). «23 de Mayo: Día Mundial de la Lucha Contra el Melanoma». *Cuenta de Alto Costo* (blog). <https://cuentadealtocosto.org/site/investigaciones/dia-mundial-de-la-lucha-contra-el-melanoma-2/>.
- Fraga Junior, C., Gumboski, E., & Eliasaro, S. (2020). The genus *Cladonia* (Lichenized Ascomycota) from Restinga Vegetation of Espírito Santo state, Brazil: Supergroups *Crustaceae* and *Perviae*. *Rodriguésia*, 71.
- Garoli, D., Pelizzo, M., Bernardini, B., Nicolosi, P., & Alaibac, M. (2008). Sunscreen tests: Correspondence between in vitro data and values reported by the manufacturers. *Journal of Dermatological Science*, 52(3), 193-204.
- GBIF. 2021a. «Distribución Mundial de *Thamnolia Vermicularis*». 2021. <https://www.gbif.org/occurrence/map?q=thamnolia%20vermicularis>.
- GBIF. 2021b. «Distribución Mundial de *Cladonia didyma*». 2021. <https://www.gbif.org/occurrence/map?q=cladonia%20didyma>.
- Ghose, A., & Crippen, G. (1987). Atomic physicochemical parameters for three-dimensional-structure-directed quantitative structure-activity relationships. 2. Modeling dispersive and hydrophobic interactions. *Journal of chemical information and computer sciences*, 27(1), 21-35.
- Goga, M., Elečko, J., Marcinčinová, M., Ručová, D., Bačkorová, M., & Bačkor, M. (2020). Lichen metabolites: an overview of some secondary metabolites and their biological potential. *Co-evolution of secondary metabolites*, 175-209.
- Grimm, M., Grube, M., Schiefelbein, U., Zühlke, D., Bernhardt, J., & Riedel, K. (2021). The lichens' microbiota, still a mystery?. *Frontiers in Microbiology*, 714.
- Guo, J., Li, Z., Wang, A., Liu, X., Wang, J., Guo, X., ... & Hua, H. M. (2011). Three new phenolic compounds from the lichen *Thamnolia vermicularis* and their antiproliferative effects in prostate cancer cells. *Planta medica*, 77(18), 2042-2046.
- Haiyuan, Y., Shen, X., Liu, D., Hong, M., & Lu, Y. (2019). The protective effects of  $\beta$ -sitosterol and vermicularin from *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. against skin aging in vitro. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition reviews*, 70(5), 257-265.

- 
- Halliwell, B. (2000). Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?. *Cardiovascular research*, 47(3), 410-418.
- Hojerová, J., Medovčíková, A., & Mikula, M. (2011). Photoprotective efficacy and photostability of fifteen sunscreen products having the same label SPF subjected to natural sunlight. *International journal of pharmaceutics*, 408(1-2), 27-38.
- Huneck, S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. *Die Naturwissenschaften*, 86(12), 559-570.
- Huneck, S., Yoshimura, I., Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996). Identification of lichen substances (pp. 11-123). Springer Berlin Heidelberg.
- International Agency for Research on Cancer (1992) - National Cancer Control Policy. s. f. Accedido 28 de septiembre de 2022. [https://wiki.cancer.org.au/policy/Citation:International\\_Agency\\_for\\_Research\\_on\\_Cancer\\_1992](https://wiki.cancer.org.au/policy/Citation:International_Agency_for_Research_on_Cancer_1992).
- Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia (2004). Colecciones en Línea. Publicado en Internet <http://www.biovirtual.unal.edu.co> [accesado el 28 09 2022].
- Khare, R., Upmanyu, N., & Jha, M. (2021). Exploring the potential effect of methanolic extract of *Salvia officinalis* against UV exposed skin aging: in vivo and in vitro model. *Current Aging Science*, 14(1), 46-55.
- Kohlhardt-Floehr, C., Boehm, F., Troppens, S., Lademann, J., & Truscott, T. (2010). Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation—Studies on human cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101(1), 97-102.
- Kono, M., Kon, Y., Ohmura, Y., Satta, Y., & Terai, Y. (2020). In vitro resynthesis of lichenization reveals the genetic background of symbiosis-specific fungal-algal interaction in *Usnea hakonensis*. *BMC genomics*, 21(1), 1-16.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25, 726-732.
- Leal, A., Rojas, J., Valencia-Islas, N., & 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.
- Legaz, M., de Armas, R., & Vicente, C. (2011). Bioproduction of depsidones for pharmaceutical purposes. In *Drug development-A case study based insight into modern strategies*. IntechOpen.
- Li, C., Guo, X., Lei, M., Wu, J., Jin, J., Shi, X., ... & Shen, X. (2017). *Thamnotia vermicularis* extract improves learning ability in APP/PS1 transgenic mice by ameliorating both A $\beta$  and Tau pathologies. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(1), 9-28.

- 
- Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2015). Oxidative stress, the term and the concept. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(3), 441-444.
- Liga Colombiana contra el Cáncer. (2020). Cancer de piel. <https://www.ligacancercolombia.org/cancer-de-piel/>.
- López Ladino, J. A. (2021). Determinación de la actividad in vivo sobre la biosíntesis y acción de andrógenos endógenos de sustancias líquénicas seleccionadas. Tesis Maestría Universidad Nacional de Colombia.
- Lopez D., Cadena I., & Victoria, C (2019). Anatomía y Fisiología del Melanocito: revisión de tema.
- Lorencini, M., Brohem, C., Dieamant, G., Zanchin, N., & Maibach, H. (2014). Active ingredients against human epidermal aging. *Ageing Research Reviews*, 15, 100-115.
- Luo, H., Ren, M., Lim, K., Jin Koh, Y., Wang, L., & Hur, J. (2006). Antioxidative Activity of Lichen *Thamnolia vermicularis* in vitro. *Mycobiology*, 34(3), 124-127.
- Luze, H., Nischwitz, S., Zalaudek, I., Müllegger, R., & Kamolz, L. (2020). DNA repair enzymes in sunscreens and their impact on photoageing—A systematic review. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*, 36(6), 424-432.
- Lücking, R., de Torres, L., Plaza, C., Medina, G., & Vizcaya, M. (2014). Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan Andes. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2(5), 138-147.
- MacFaul, P., Ingold, K., & Luszyk, J. (1996). Kinetic solvent effects on hydrogen atom abstraction from phenol, aniline, and diphenylamine. the importance of hydrogen bonding on their radical-trapping (antioxidant) activities<sup>1</sup>. *The Journal of Organic Chemistry*, 61(4), 1316-1321.
- Manojlović, N., Vasiljević, P., Nikolić, D., Bogdanović-Dušanović, G., Marković, Z., & Najman, S. (2011). The isolation, analytical characterization by HPLC-UV and NMR spectroscopy, cytotoxic and antioxidant activities of baeomycesic acid from *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. *Hemijska industrija*, 65(5), 591-598.
- Mansur, J., Breder, M., Mansur, M., & Azulay, R. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An. Bras. Dermatol*, 121-4.
- Mansuri, R., Diwan, A., Kumar, H., Dangwal, K., & Yadav, D. (2021). Potential of natural compounds as sunscreen agents. *Pharmacognosy Reviews*, 15(29), 47-56.
- Martins, M., Lima, M., Santiago, R., Buriel, M., Pereira, E., Legaz, M., ... & Silva, N. (2017). New biotechnological methods for producing therapeutic compounds (usnic, stictic and norstictic acids) by cell immobilization of the lichen *Cladonia substellata* Vainio. *Biotechnol. Ind. J*, 13, 1-13.

- 
- Mesa-Arango, A., Flórez-Muñoz, S., & Sanclemente, G. (2017). Mechanisms of skin aging. *Iatreia*, 30(2), 160-170.
- Michalak, M., Pierzak, M., Kręcis, B., & Suliga, E. (2021). Bioactive compounds for skin health: A review. *Nutrients*, 13(1), 203.
- 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, 17-26.
- Ministerio de Salud de Colombia. (2020). «Vicesalud destacó acciones de Colombia frente al cáncer de piel». <https://www.minsalud.gov.co/Paginas/Vicesalud-destaco-acciones-de-Colombia-frente-al-cancer-de-piel.aspx>.
- Mitsuda, H. (1966). Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Syokuryo*, 19, 210-214.
- Moncada, B., Plata, E., & Fazio, A. (2012). GLALIA Revista Electrónica del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos.
- Mosbach, K. (1964). On the biosynthesis of lichen substances. *Acta Chemica Scandinavica*, 18, 329-334.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Nash III, T. (2008). Nitrogen, its metabolism and potential contribution to ecosystems. *Lichen biology*, 216-233.
- National Cancer Institute. (2021). Skin Cancer (Including Melanoma). *CgvCancerTypeHome*. [Nciglobal,ncienterprise. https://www.cancer.gov/types/skin](https://www.cancer.gov/types/skin).
- Nguyen, K., Chollet-Krugler, M., Gouault, N., & Tomasi, S. (2013). UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Natural product reports*, 30(12), 1490-1508.
- Nowak, R., Drozd, M., Mendyk, E., Lemieszek, M., Krakowiak, O., Kisiel, W., ... & Szewczyk, K. (2016). A new method for the isolation of ergosterol and peroxyergosterol as active compounds of *Hygrophoropsis aurantiaca* and in vitro antiproliferative activity of isolated ergosterol peroxide. *Molecules*, 21(7), 946.
- Ohio Moss and Lichen Association. (2021). «lichen-*Cladonia didyma*». <http://ohiomosslichen.org/lichen-cladonia-didyma/>.
- Olafsdottir, E., Omarsdottir, S., Paulsen, B., & Wagner, H. (2003). Immunologically active O6-branched (1» 3)- $\beta$ -glucan from the lichen *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. *Phytomedicine*, 10(4), 318-324.
- Onuț-Brännström, I., Tibell, L., & Johannesson, H. (2017). A worldwide phylogeography of the whiteworm lichens *Thamnolia* reveals three lineages with distinct habitats and evolutionary histories. *Ecology and Evolution*, 7(10), 3602-3615.

- Orange, A., James, P., & White, F. (2001). Microchemical methods for the identification of lichens. British Lichen Society.
- Organización Mundial de la Salud - OMS. (2017). Radiation: Ultraviolet (UV) Radiation and Skin Cancer. [https://www.who.int/news-room/q-a-detail/radiation-ultraviolet-\(uv\)-radiation-and-skin-cancer](https://www.who.int/news-room/q-a-detail/radiation-ultraviolet-(uv)-radiation-and-skin-cancer).
- Organización Mundial de la Salud - OMS. (2021). Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. The Japanese journal of nutrition and dietetics, 44(6), 307-315.
- Pankratov, T., Aleksey K., Evgeny K., y Dobrovol G. (2017). Pankratov T. A., Kachalkin A. V., Korchikov E. S., Dobrovol'skaya T. G. Microbial Communities of Lichens (review) // Microbiology (transl. from Mikrobiologiya). Vol. 86, No. 3, pp. 265–283. *Microbiology* 86 (junio): 265-83. <https://doi.org/10.1134/S0026261717030134>.
- Pelizzo, M., Zattra, E., Nicolosi, P., Peserico, A., Garoli, D., & Alaibac, M. (2012). In vitro evaluation of sunscreens: an update for the clinicians. International Scholarly Research Notices, 2012.
- Pereira, E., da Silva, N., Buriel, M., Martins, M., Silva, H., Falcão, E., ... & Vicente, C. (2020). Bioactive compounds from Brazilian lichens and their biotechnological applications. Plant-derived Bioactives: Production, Properties and Therapeutic Applications, 209-238.
- Pereira, E., Pereyra, T., Matos, S., Da Silva, N., Andrade, L., & Vicente, C. (1995). Bioproduction of usnic acid from acetate by kaolinite immobilized cells of *Cladonia substellata* Vain. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 64(2), 171-174.
- Pereira, I., Pereira, E., y Gutiérrez M. (2017). Production of Secondary Metabolites by Immobilized Cells of *Stereocaulon ramulosum* (Sw) Rausch (Lichen) in Different Design of Bioreactors. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 9(5):104-109
- Perico-Franco, L., Rojas, J., Cerbón, M., González-Sánchez, I., & Valencia-Islas, N. (2015). Antioxidant activity and protective effect on cell and DNA oxidative damage of substances isolated from lichens of Colombian Páramo. Pharmaceutical and Biosciences Journal, 09-17.
- Pisoschi, A., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European journal of medicinal chemistry, 97, 55-74.
- Pouillot, A., Polla, L., Tacchini, P., Neequaye, A., Polla, A., & Polla, B. (2011). Natural antioxidants and their effects on the skin. Formulating, packaging, and marketing of natural cosmetic products, 239-257.

- 
- Pozzobon, F., Acosta, Á., & Castillo, J. (2018). Cáncer de piel en Colombia: cifras del Instituto Nacional de Cancerología. *Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica*, 26(1), 12-17.
- Radice, M., Manfredini, S., Ziosi, P., Dissette, V., Buso, P., Fallacara, A., & Vertuani, S. (2016). Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. *Fitoterapia*, 114, 144-162.
- Rähse, W. (2020). *Cosmetic Creams: Development, Manufacture and Marketing of Effective Skin Care Products*. John Wiley & Sons.
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E., Lakshminarasaiah, U., ... & Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica chimica acta*, 436, 332-347.
- Ranković, B. (Ed.). (2019). *Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential*. Springer.
- Rao, S., & Ravishankar, G. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
- Real Statistics Resource Pack. (2021). <https://www.real-statistics.com/appendix/citation-real-statistics-software-website/>.
- Rojas, J., Díaz-Santos, M., & Valencia-Islas, N. (2015). Metabolites with antioxidant and photo-protective properties from *Usnea roccellina* Motyka, a lichen from Colombian Andes. *Pharmaceutical and Biosciences Journal*, 18-26.
- Russo, A., Piovano, M., Lombardo, L., Garbarino, J., & Cardile, V. (2008). Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life sciences*, 83(13-14), 468-474.
- Sadowsky, A., & Meeßen, J. (2017). The Resistance of Lichen Photobionts to Extreme Abiotic Stressors on Earth, in Space and in Simulations. In *Algal and cyanobacteria symbioses* (pp. 575-609).
- Saewan, N., & Jimtaisong, A. (2015). Natural products as photoprotection. *Journal of cosmetic dermatology*, 14(1), 47-63.
- Santiago, R., Martins, M., de Barros, L., Vilaça, M., Legaz, E., & Vicente, C. (2020). Lichen metabolites from the immobilized bionts isolated from *Cladonia salzmannii*. A study of their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Medicinal Plants*, 8(4), 43-55.
- Santos, L., Wu, E., Grinias, K., Koetting, M., & Jain, P. (2021). Developability profile framework for lead candidate selection in topical dermatology. *International Journal of Pharmaceutics*, 604, 120750.
- Sayre, R., Agin, P., LeVee, G., & Marlowe, E. (1979). A comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens. *Photochemistry and Photobiology*, 29(3), 559-566.

- 
- Shukla, V., Kumar, S., & Kumar, N. (Eds.). (2017). Plant adaptation strategies in changing environment. Springer Singapore.
- Sierra, M., Danko, D., Sandoval, T., Pishchany, G., Moncada, B., Kolter, R., ... & Zambrano, M. (2020). The microbiomes of seven lichen genera reveal host specificity, a reduced core community and potential as source of antimicrobials. *Frontiers in microbiology*, 398.
- Silverman, R., & Holladay, M. (2014). The organic chemistry of drug design and drug action. Academic press.
- Sipman, H., & Aguirre J. (1982). Contribución al conocimiento de los líquenes de Colombia—i. clave genérica para los líquenes foliosos y fruticosos de los páramos colombianos. *Caldasia*, 603-34.
- Soto Medina, E., Diaz, D., & Montaña, J. (2021). Biogeography and richness of lichens in Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 45(174), 122-135.
- Spribile, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M., ... & McCutcheon, J. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 353(6298), 488-492.
- Springsteen, A., Yurek, R., Frazier, M., & Carr, K. (1999). In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Analytica Chimica Acta*, 380(2-3), 155-164.
- Stocker-Wörgötter, E. (2008). Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural product reports*, 25(1), 188-200.
- Strlic, M., Radovič, T., Kolar, J., & Pihlar, B. (2002). Anti-and prooxidative properties of gallic acid in fenton-type systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6313-6317.
- Suja, K., 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), 912-915.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Tang, Y., Laxi, N., & Bao, H. (2015). Chemical constituents and their antioxidant activities from thallus of *Ramalina conduplicans*. *Mycosystema*, 34(1), 169-176.
- Tatipamula, V., & Vedula, G. (2019). Antimicrobial and anti-tubercular activities of isolates and semi synthetic derivatives of lichen *Ramalina leiodea* (Nyl.) Nyl. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 84(6), 555-562.

- 
- Teuvo, A., Raquel, P., Flakus, A., & Stenroos, S. (2016). Additions to the global diversity of *Cladonia*. *The Lichenologist*, 48(5), 517-526.
- Thadani, V., Khan, S., Choudhary, M., & Karunaratne, V. (2009). Novel  $\alpha$ - Glucosidase Inhibitors from Lichen *Cladonia* sp.
- Touitou, E., & Godin, B. (2008). Skin nonpenetrating sunscreens for cosmetic and pharmaceutical formulations. *Clinics in dermatology*, 26(4), 375-379.
- U.S. Food and Drug Administration. (2020). Part 352—Sunscreen Drug Products for over-the-Counter Human Use. In CFR-Code of Federal Regulations Title 21. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=352>.
- Valencia-Islas, N., Arguello, J., & Rojas, J. (2020). Antioxidant and photoprotective metabolites of *Bunodophoron melanocarpum*, a lichen from the Andean páramo. *Pharmaceutical Sciences*, 27(2), 281-290.
- Verma, N., & Behera, B. (2015). In vitro culture of lichen partners: need and implications. *Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques*, Volume 2, 147-159.
- Vicente, C., Fontaniella, B., Millanes, A., Sebastián, B., & Legaz, M. (2003). Enzymatic production of atranorin: a component of the oak moss absolute by immobilized lichen cells. *International journal of cosmetic science*, 25(1-2), 25-29.
- Wang, H., Liu, J., Pang, D., Li, T., & Liu, R. (2019). Mechanisms underlying the protective effects of blueberry extract against ultraviolet radiation in a skin cell co-culture system. *Journal of Functional Foods*, 52, 603-610.
- White, P., Oliveira, R., Oliveira, A., Serafini, M. R., Araújo, A., Gelain, D., ... & Santos, M. (2014). Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from lichens: a systematic review. *Molecules*, 19(9), 14496-14527.
- Wirth, V. (2004). *Guía de campo de los líquenes, musgos y hepáticas: con 288 especies de líquenes y 226 de briófitos (musgos y hepáticas)*. Omega.
- Wondrak, G., & Wondrak. (2016). *Skin Stress Response Pathways*. Switzerland: Springer.
- Wong, B., Leeson, S., Grindle, S., Magee, B., Brooks, E., & Magee, P. (1995). D-arabitol metabolism in *Candida albicans*: construction and analysis of mutants lacking D-arabitol dehydrogenase. *Journal of bacteriology*, 177(11), 2971-2976.
- Xiang, W., Wang, Q., Ma, L., & Hu, L. (2013).  $\beta$ -Orcinol-type depsides from the lichen *Thamnolia vermicularis*. *Natural Product Research*, 27(9), 804-808.
- Yañez, O., Osorio, M., Osorio, E., Tiznado, W., Ruíz, L., García, C., ... & García-Beltrán, O. (2023). Antioxidant activity and enzymatic of lichen substances: A study based on cyclic voltammetry and theoretical. *Chemico-Biological Interactions*, 110357
- Yen, G., Duh, P., & Tsai, H. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food chemistry*, 79(3), 307-313.

Yoshimura, I., Yamamoto, Y., Nakano, T., & Finnie, J. (2002). Isolation and culture of lichen photobionts and mycobionts. *Protocols in Lichenology: culturing, biochemistry, ecophysiology and use in biomonitoring*, 3-33.

**A. Anexo: Espectros de los  
compuestos aislados de *Thamnolia  
vermicularis* y *Cladonia* cf. *didyma***

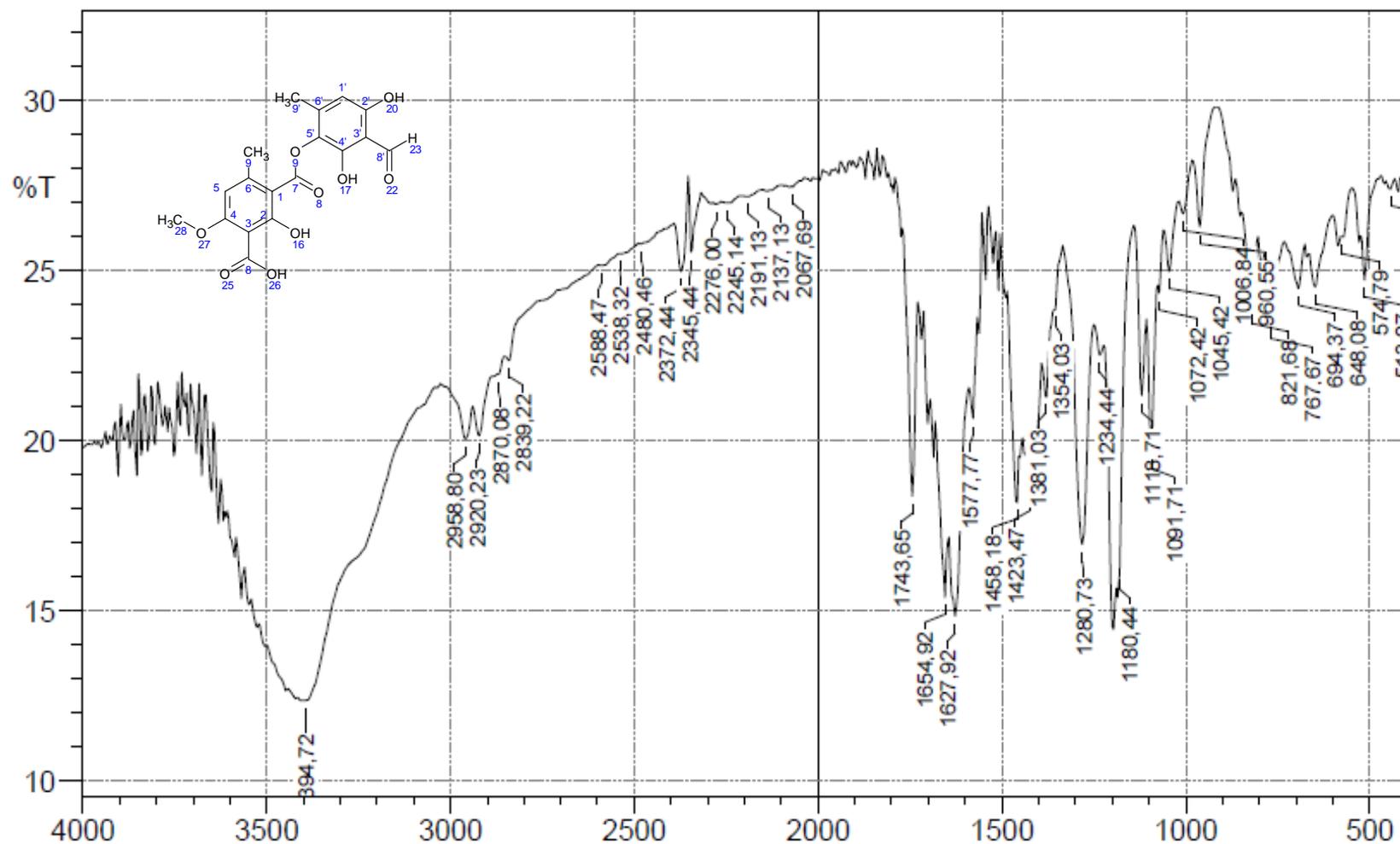


Figura 6-1. Espectro de IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) del ácido descarboxythamnónico (1)

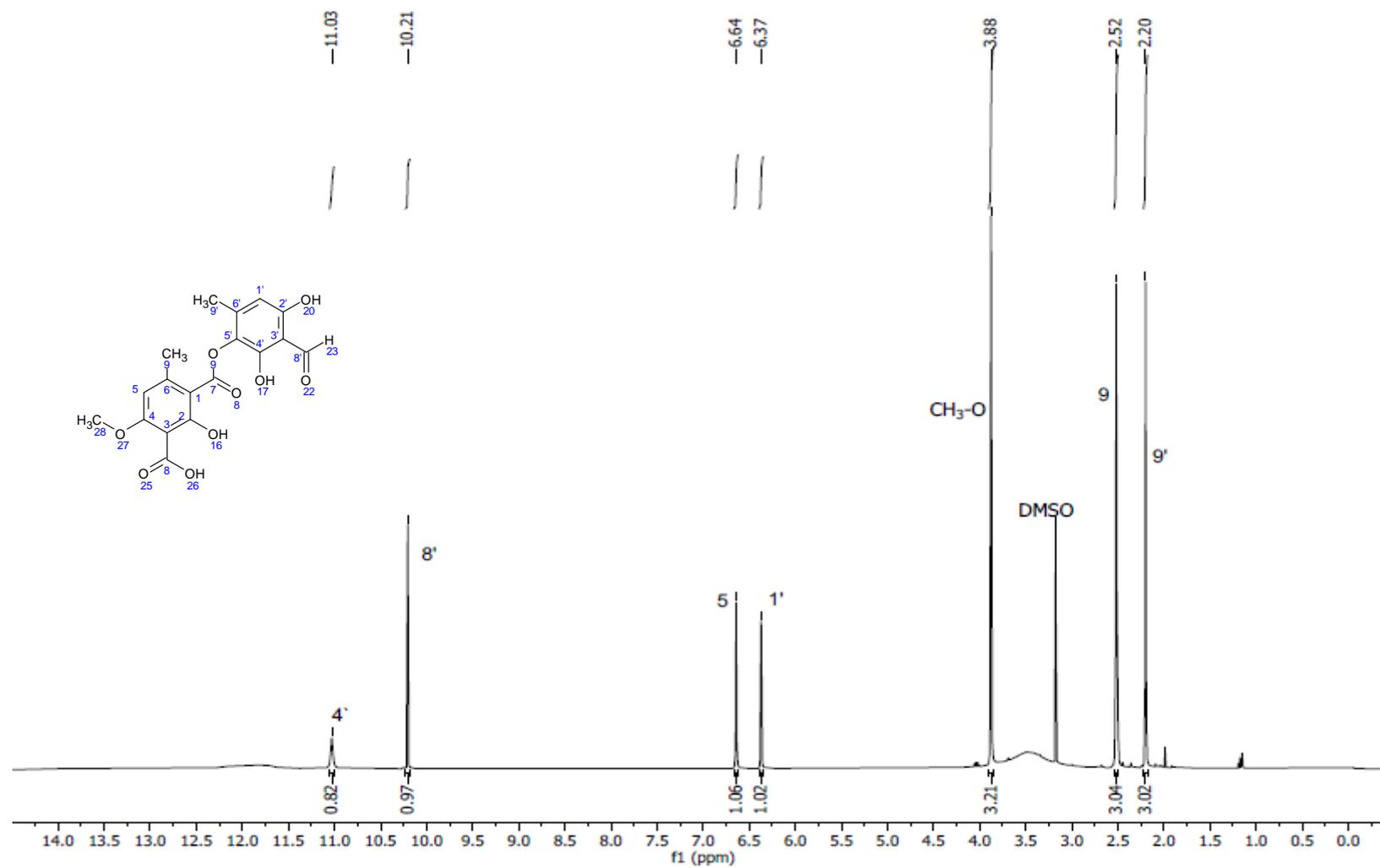


Figura 6-2. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del ácido descarboxythyamínico (1) ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz).

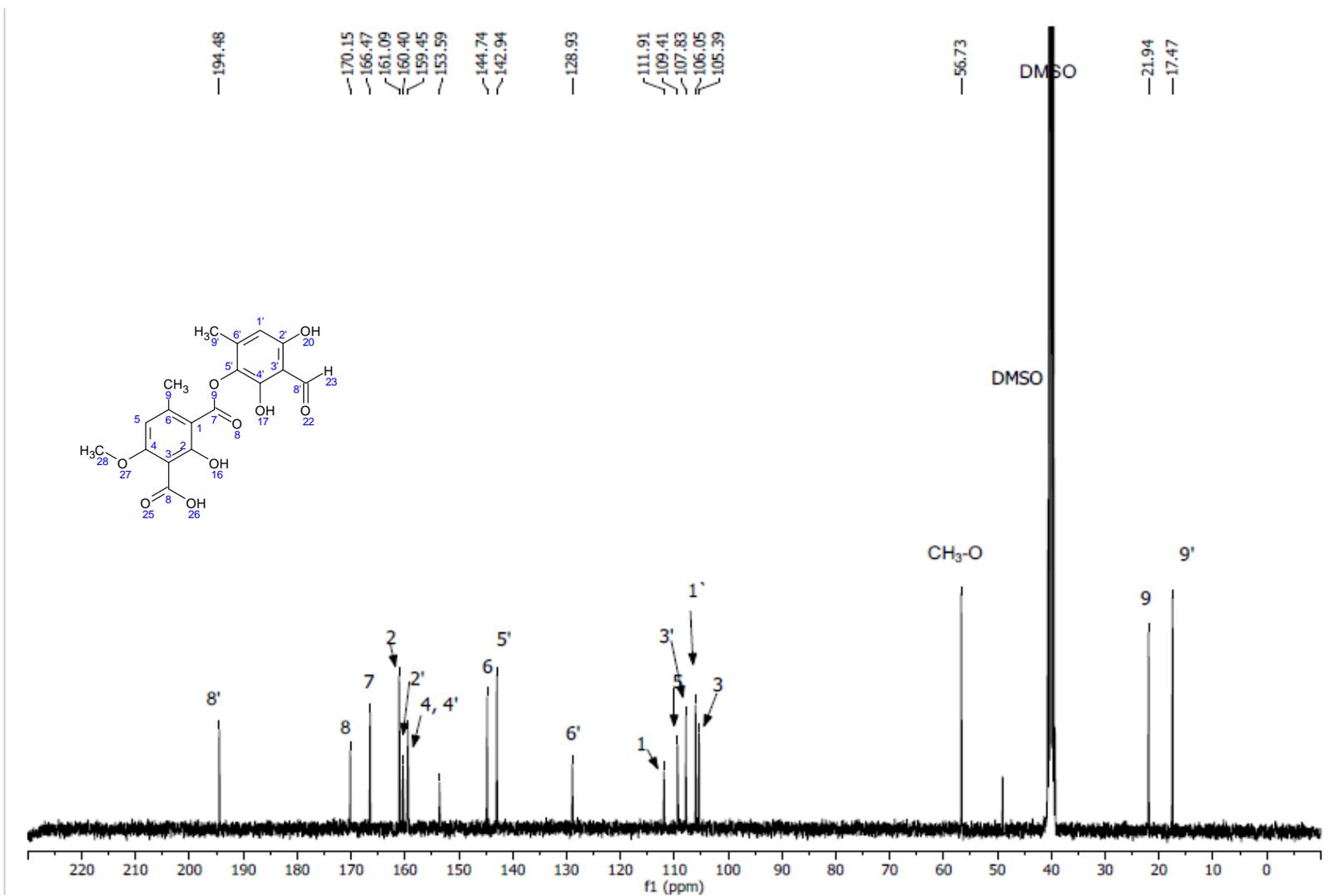


Figura 6-3. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del ácido descarboxythamnólico (1) ( $\text{DMSO } d_6$ , 101 MHz).

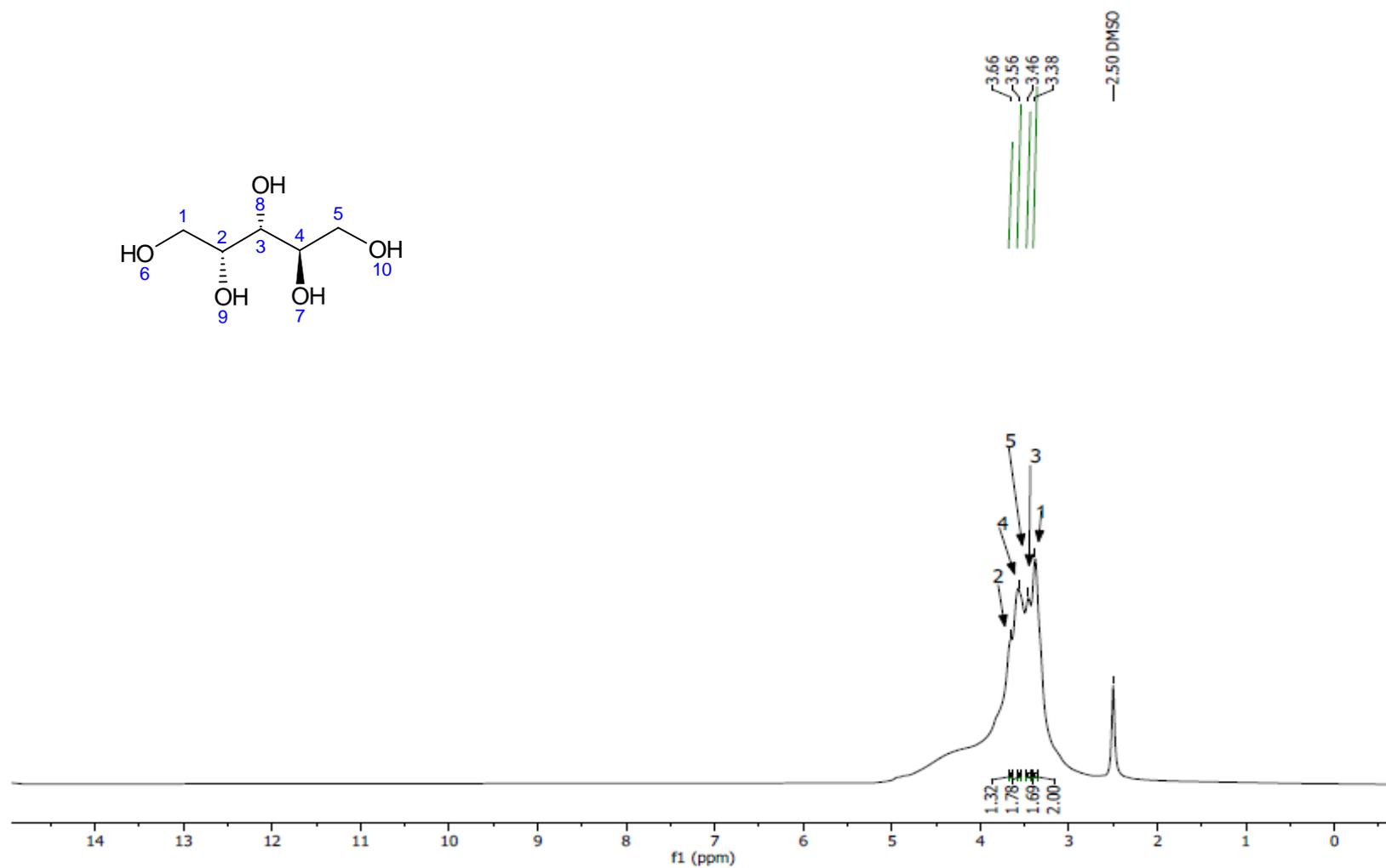


Figura 6-4. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del arabinol (2) ( $\text{DMSO-d}_6$ , 400 MHz).

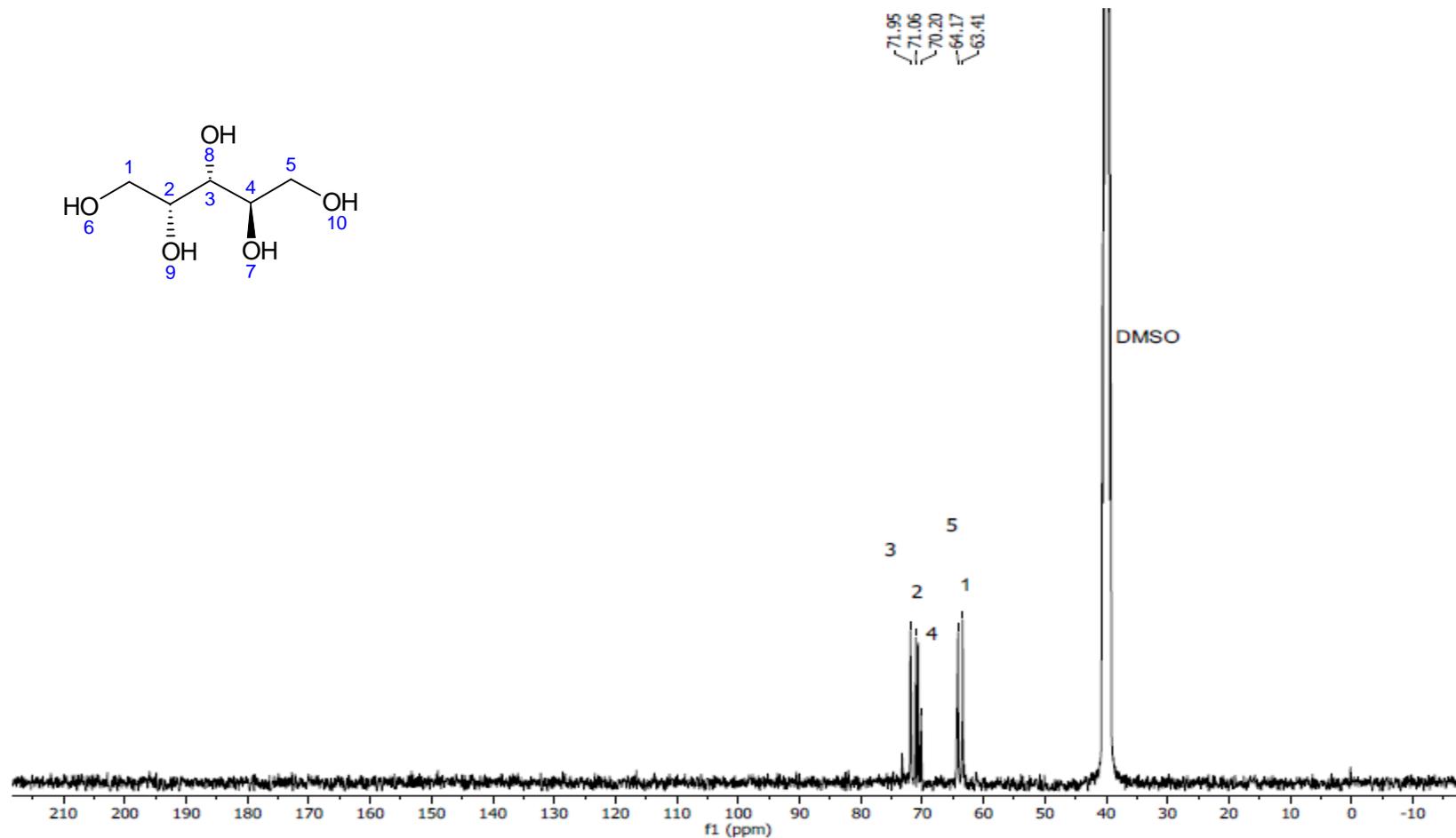


Figura 6-5. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del arabitol (2) (DMSO  $d_6$ , 101 MHz).

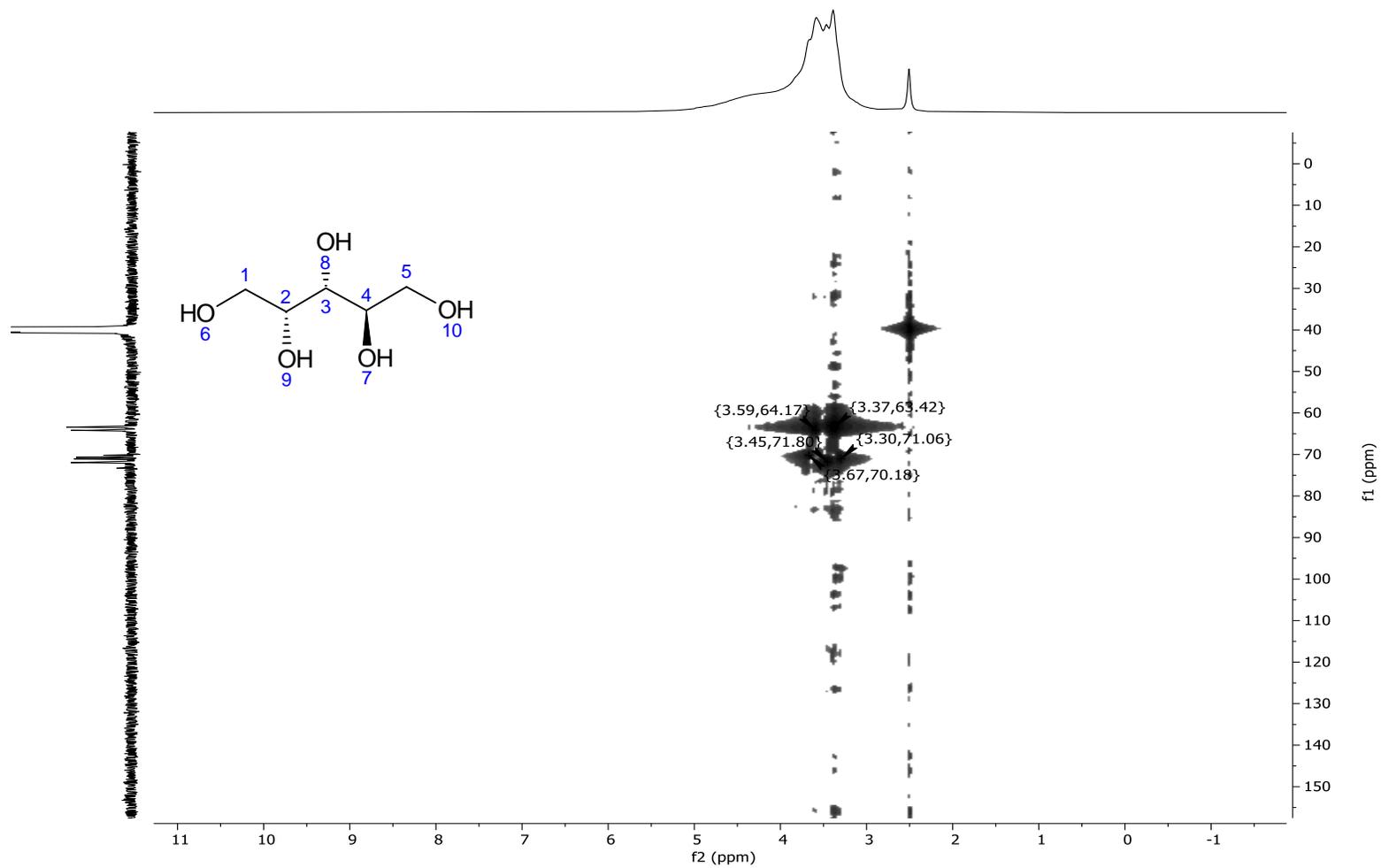


Figura 6-6. Espectro HMBC del arabitol (2) (DMSO-d<sub>6</sub>).

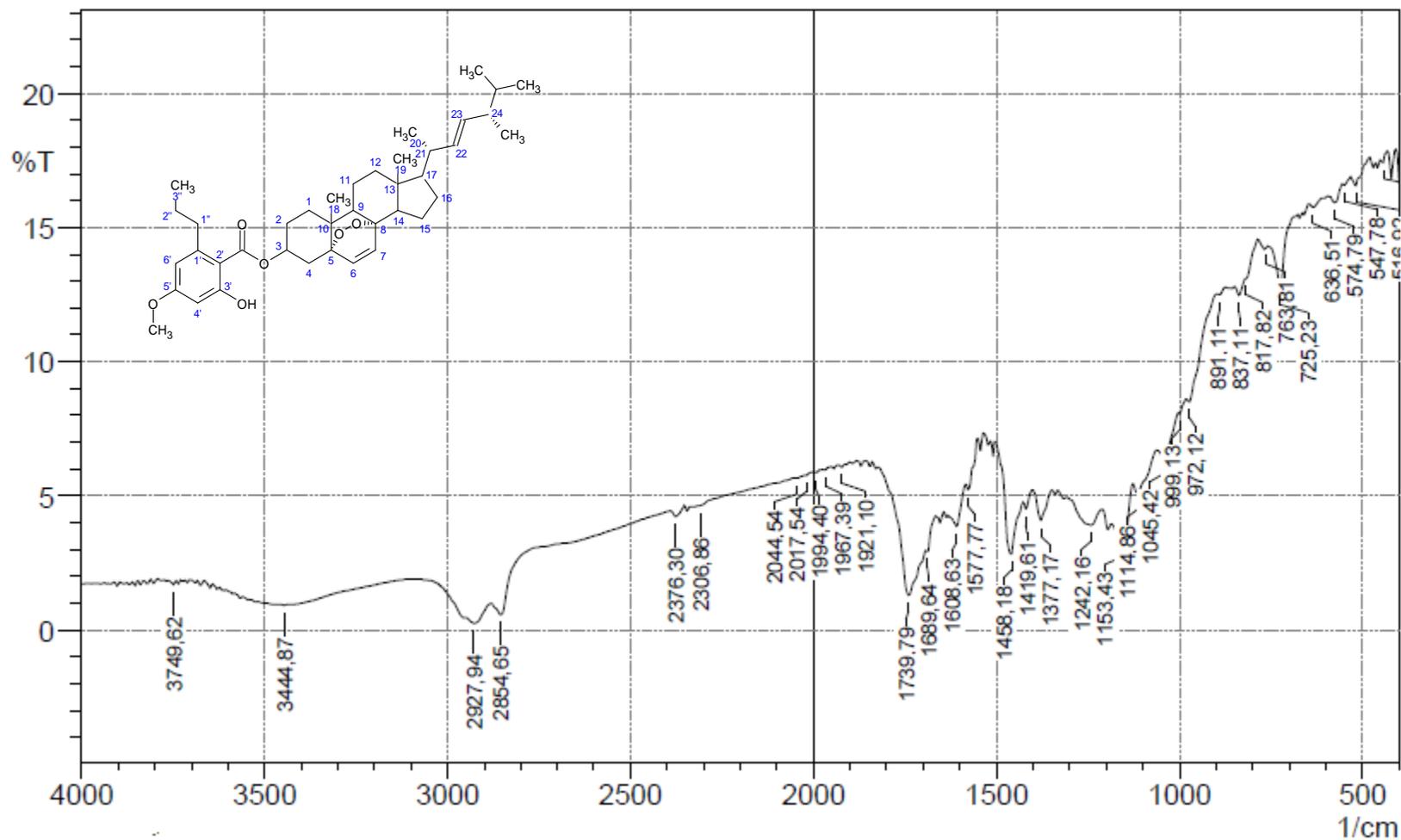


Figura 6-7. Espectro de IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) de 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3).

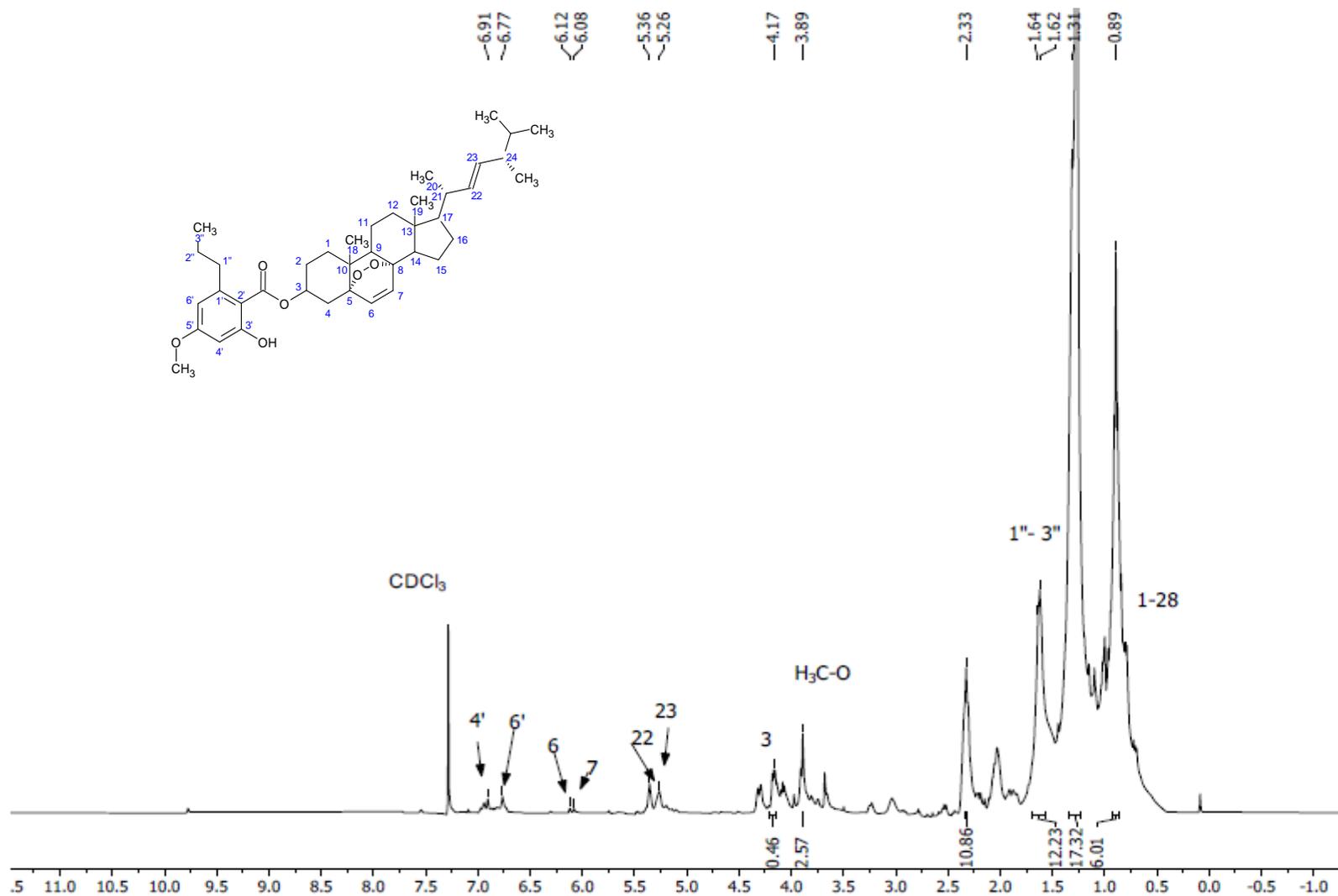


Figura 6-8. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxiergosteril divaricatinato (3) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

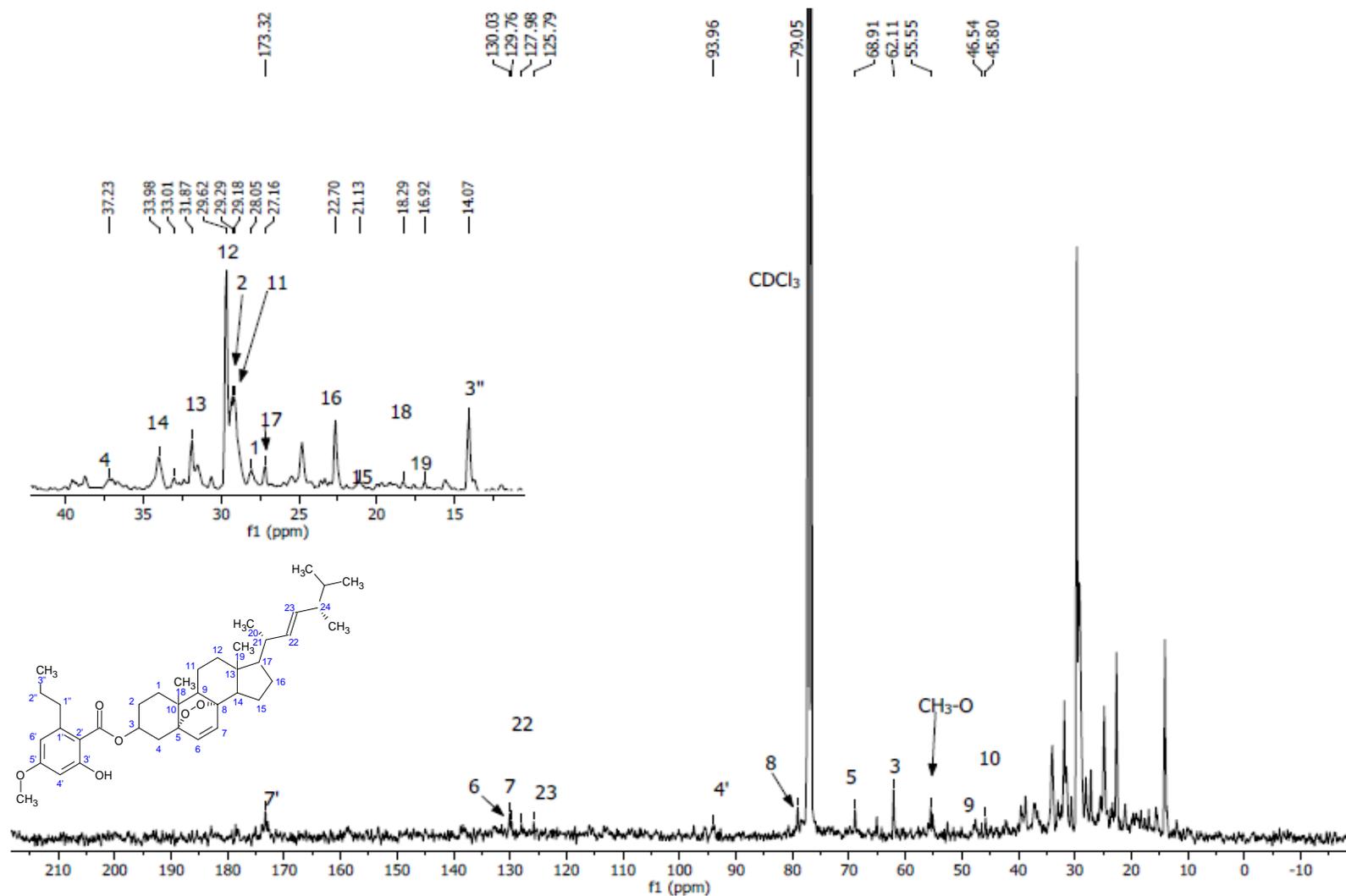


Figura 6-9. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3) ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz).

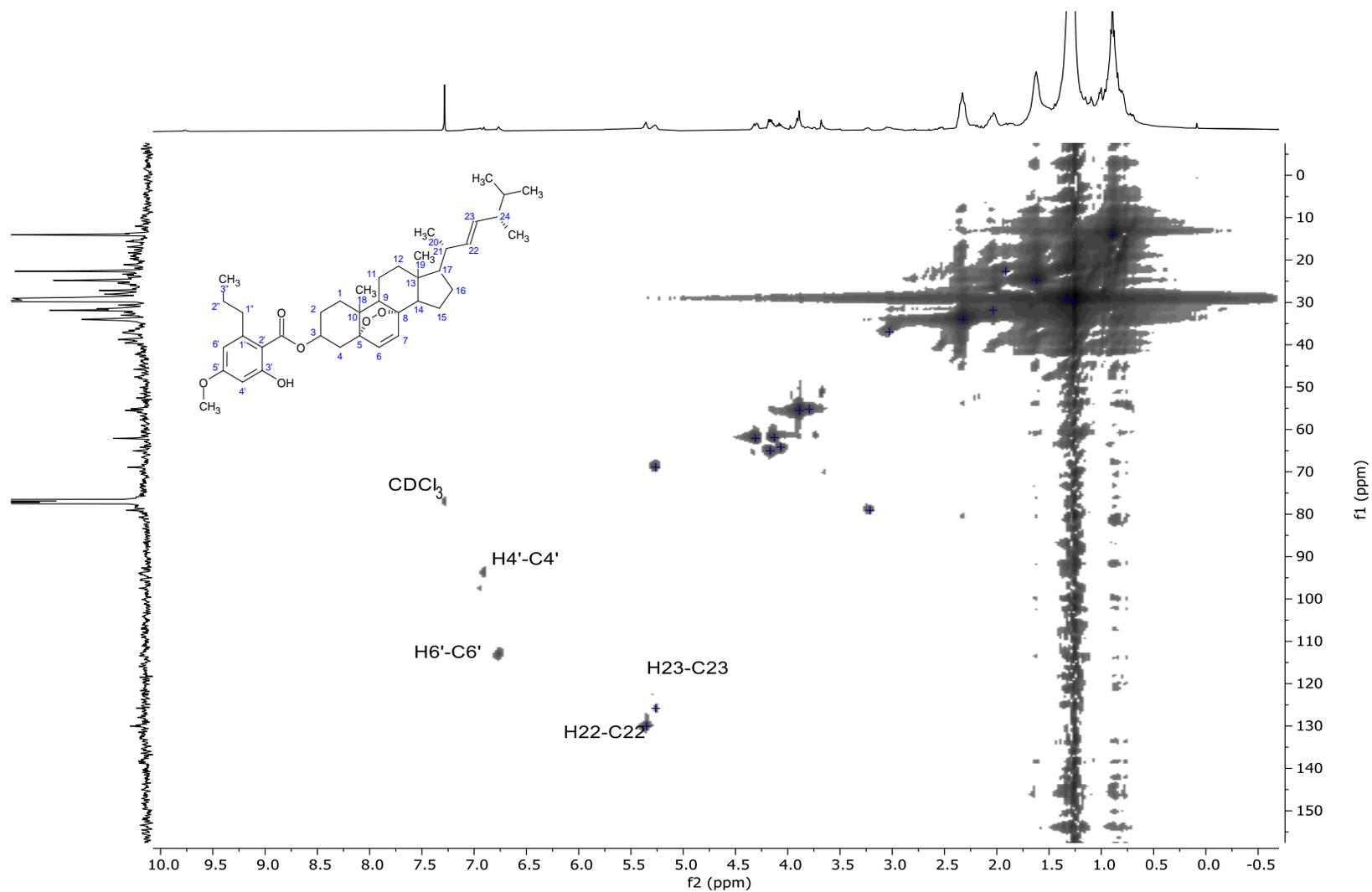


Figura 6-10. Espectro HMBC de 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (**3**) (CDCl<sub>3</sub>).

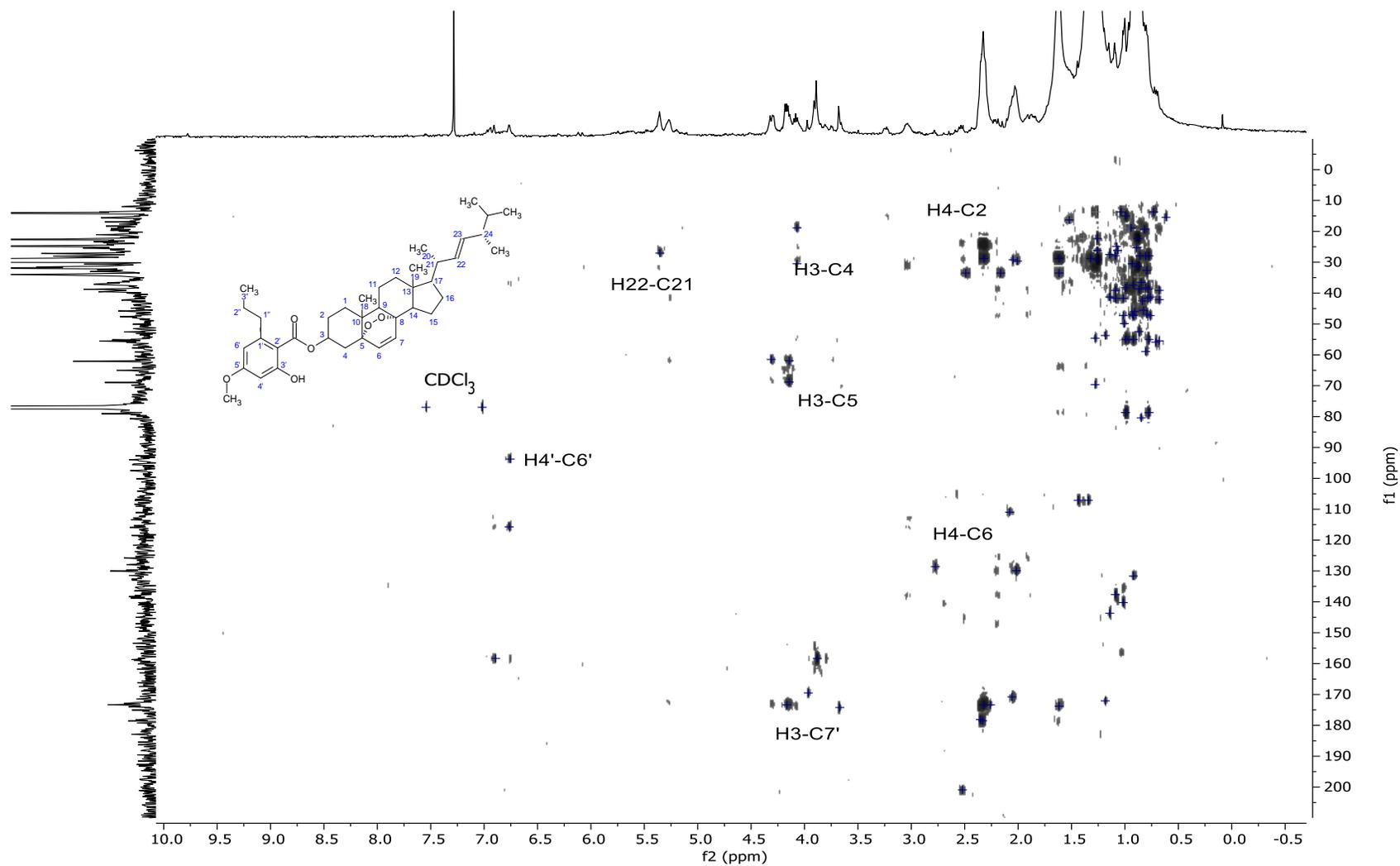


Figura 6-11. Espectro HMBC del 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -peroxi ergosteril divaricatinato (3) (CDCl<sub>3</sub>).

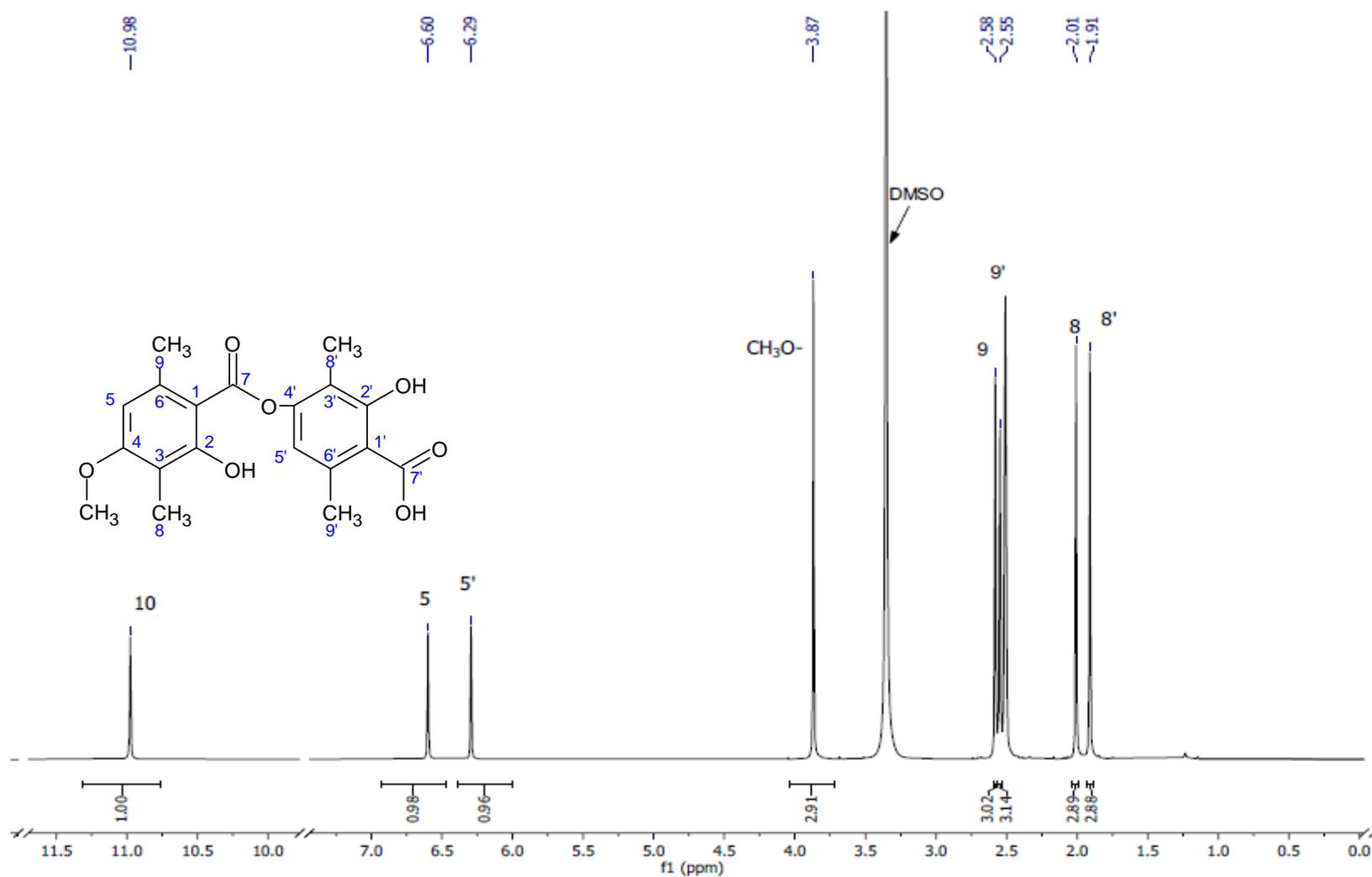


Figura 6-12. Espectro RMN <sup>1</sup>H del ácido barbático (4) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

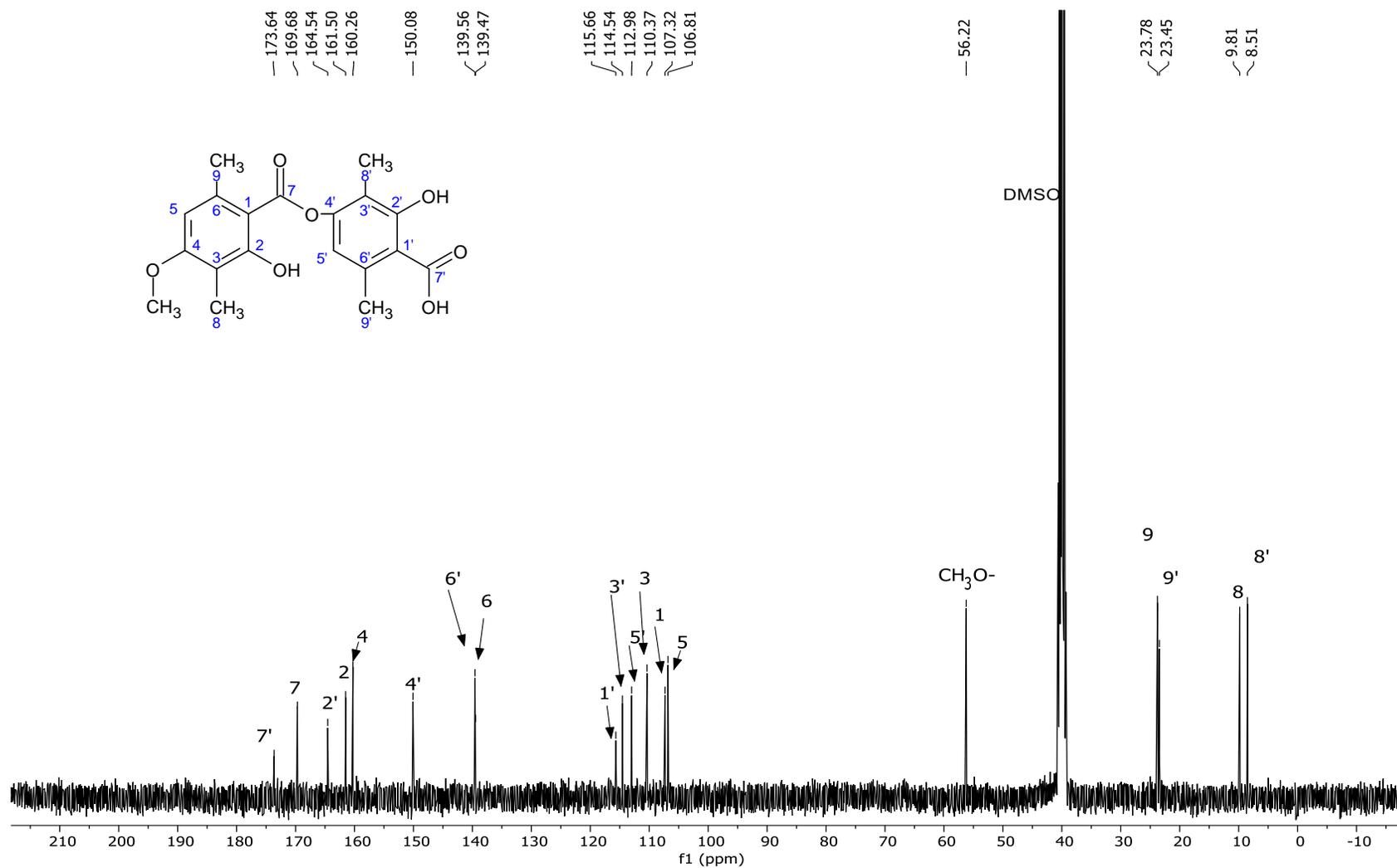


Figura 6-13. Espectro de RMN <sup>13</sup>C del ácido barbático (4) (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz)

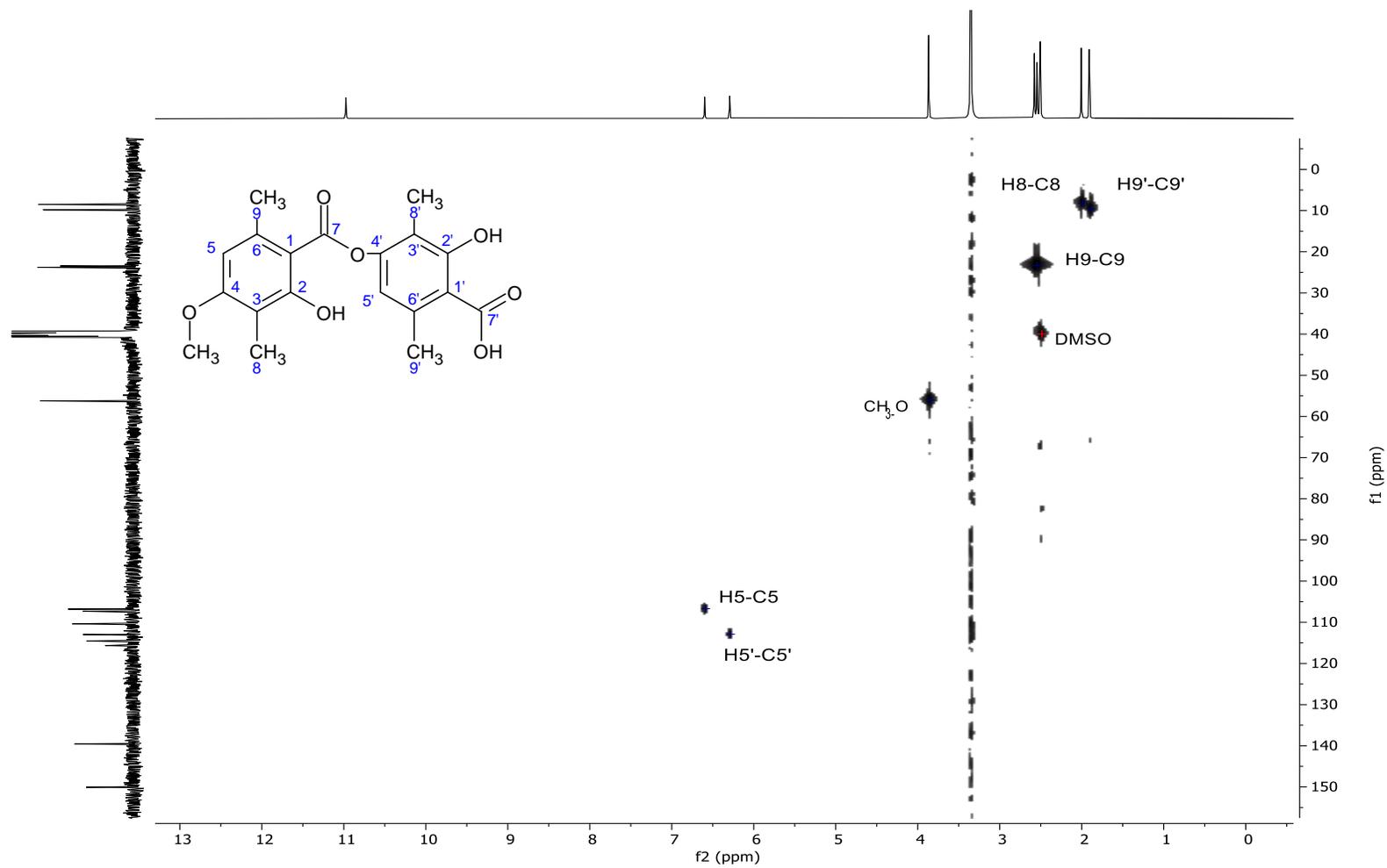


Figura 6-14. Espectro HMQC del ácido barbático (4) (CDCl<sub>3</sub>).

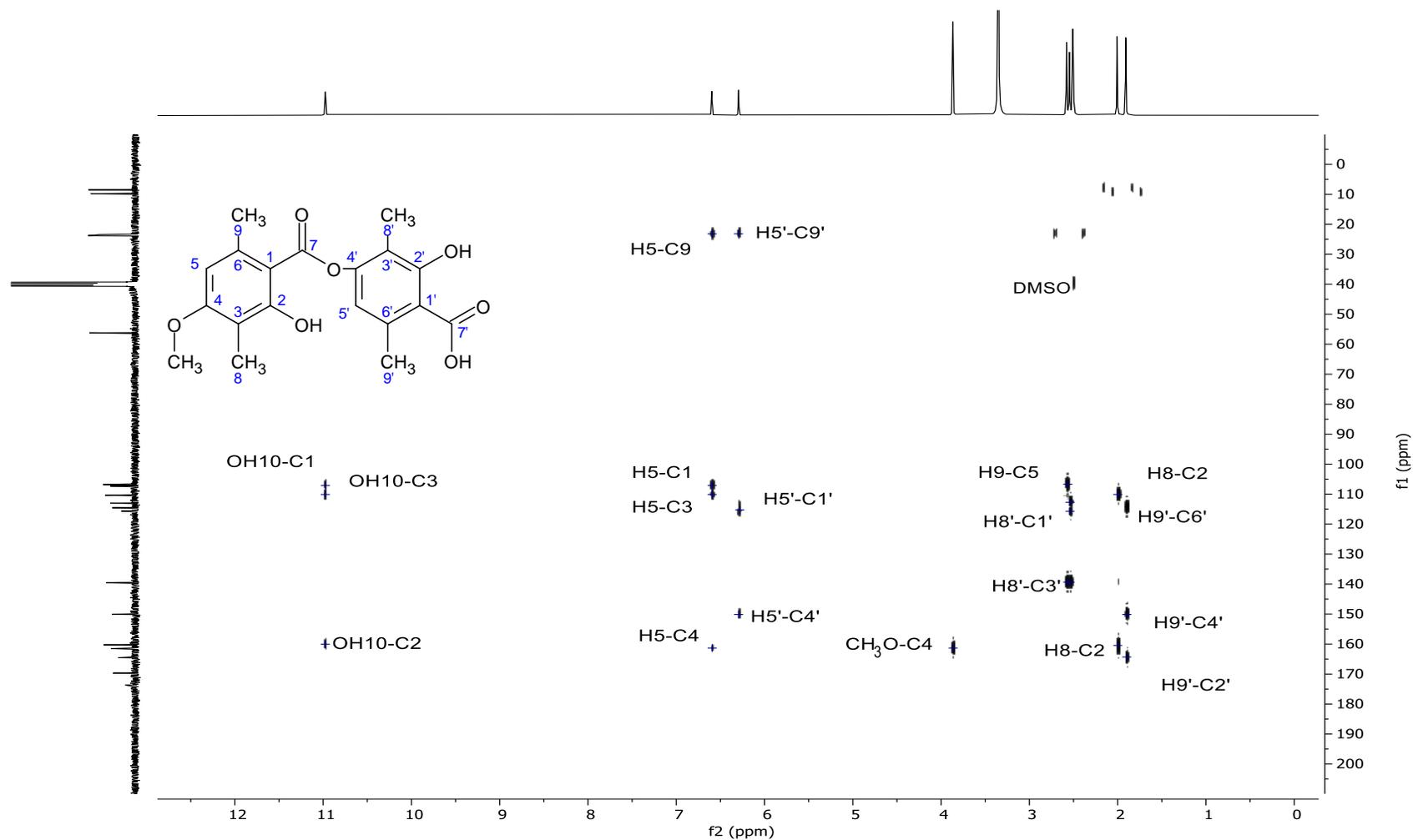


Figura 6-15. Espectro HMBC del ácido barbático (4) (CDCl<sub>3</sub>).

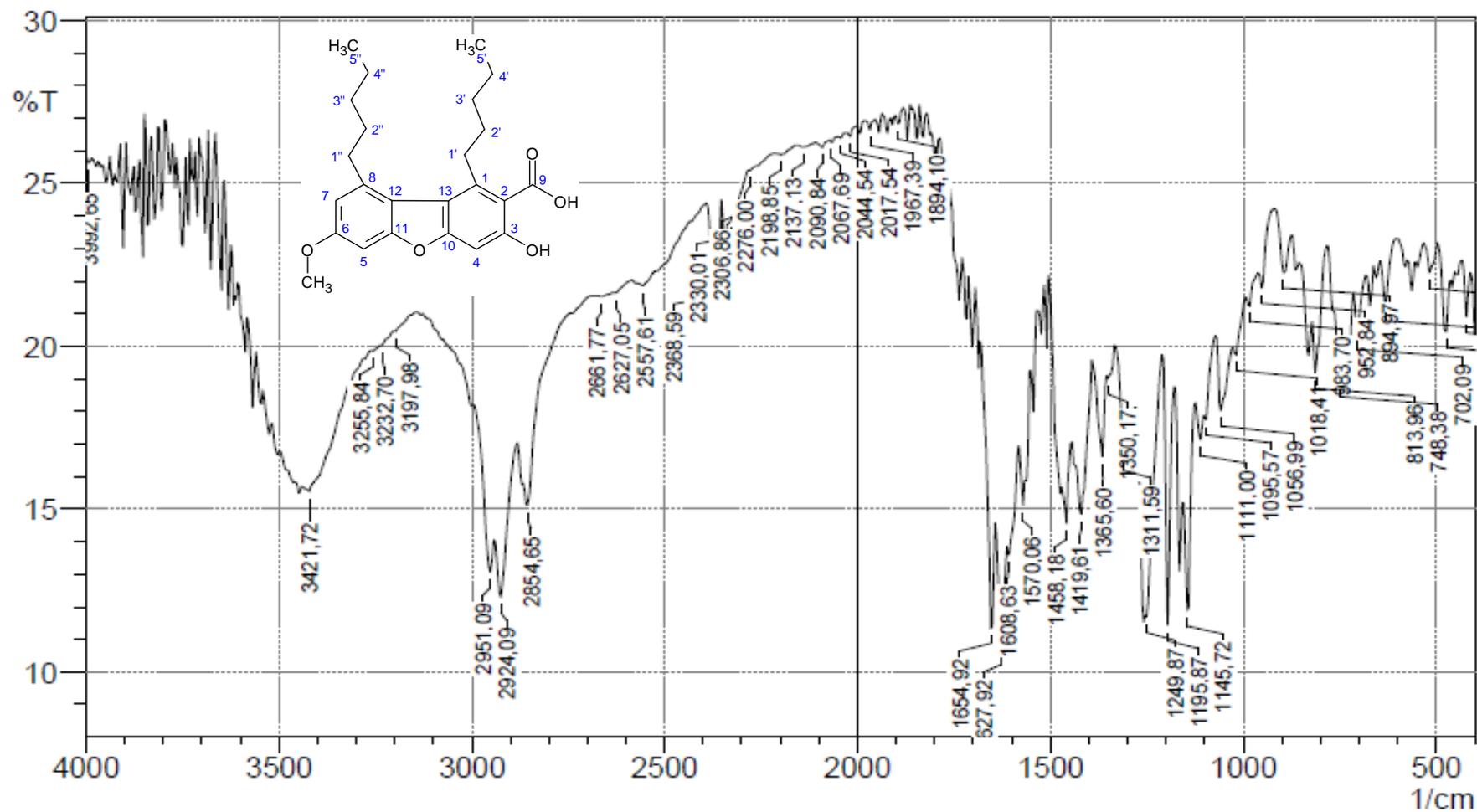


Figura 6-16. Espectro IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) del ácido condidimico (5).

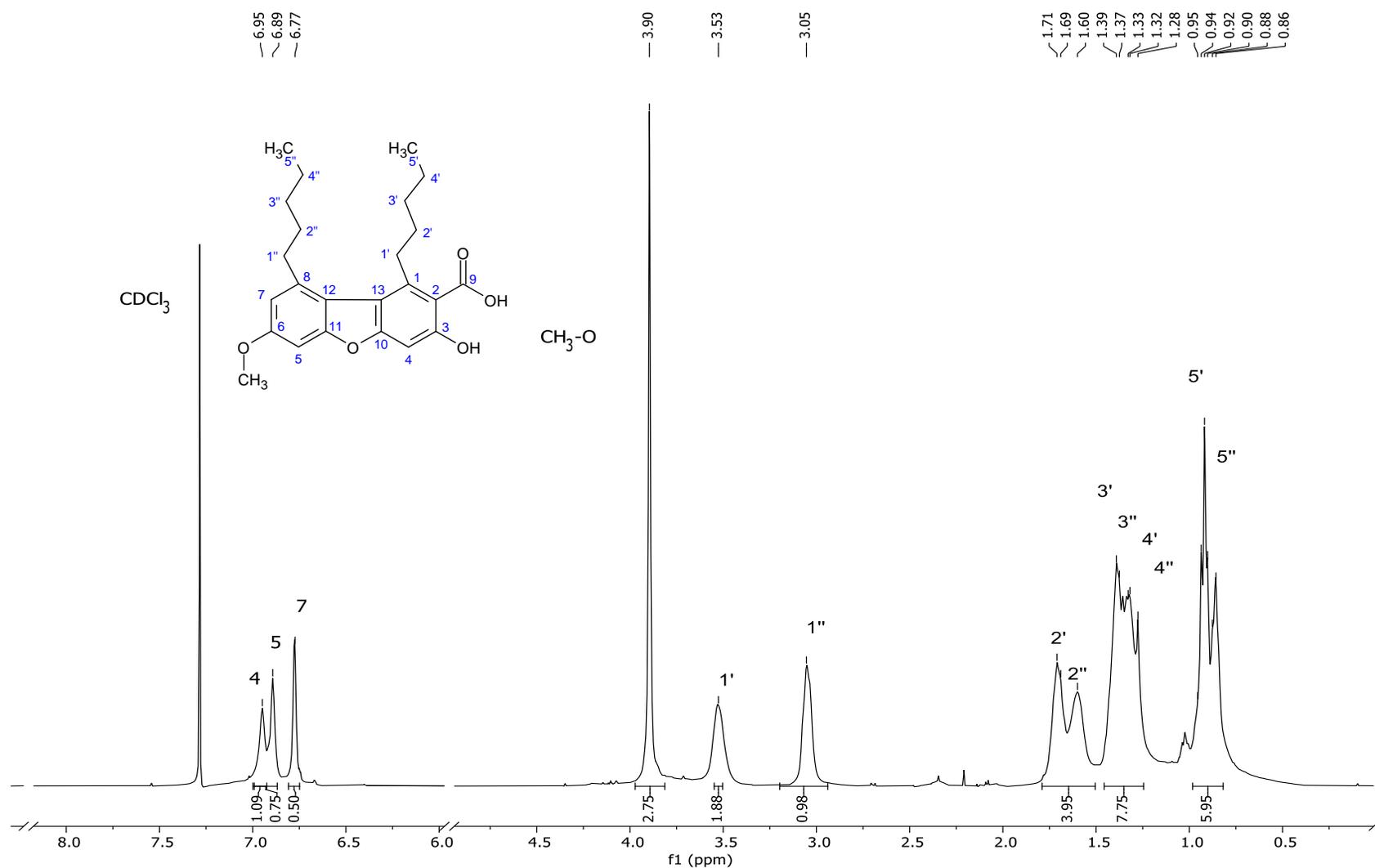


Figura 6-17. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del ácido condidymico (5) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).

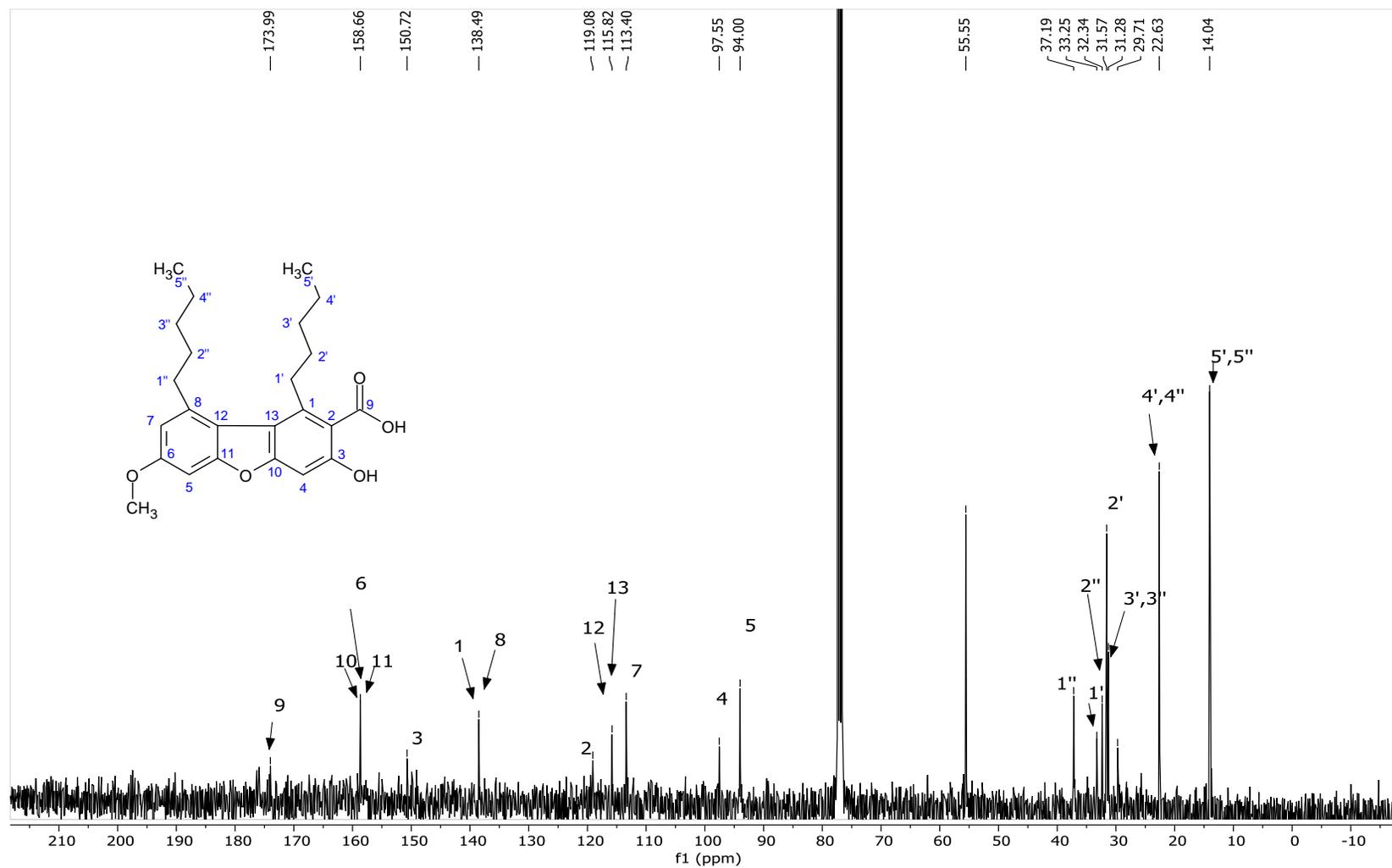


Figura 6-18.. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del ácido condidimico (5) ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz).

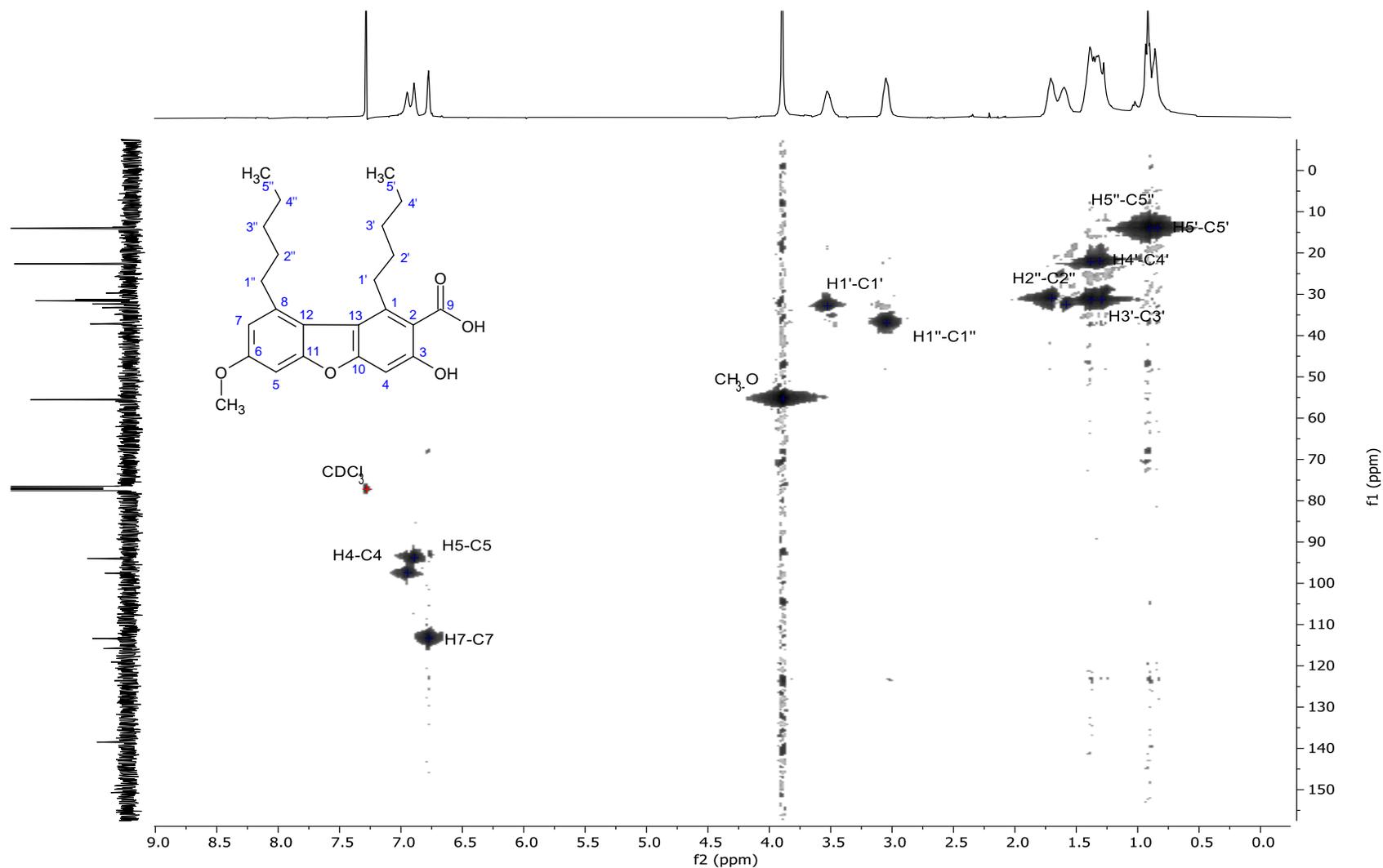


Figura 6-19. Espectro HMBC del ácido condidimico (5) (CDCl<sub>3</sub>).

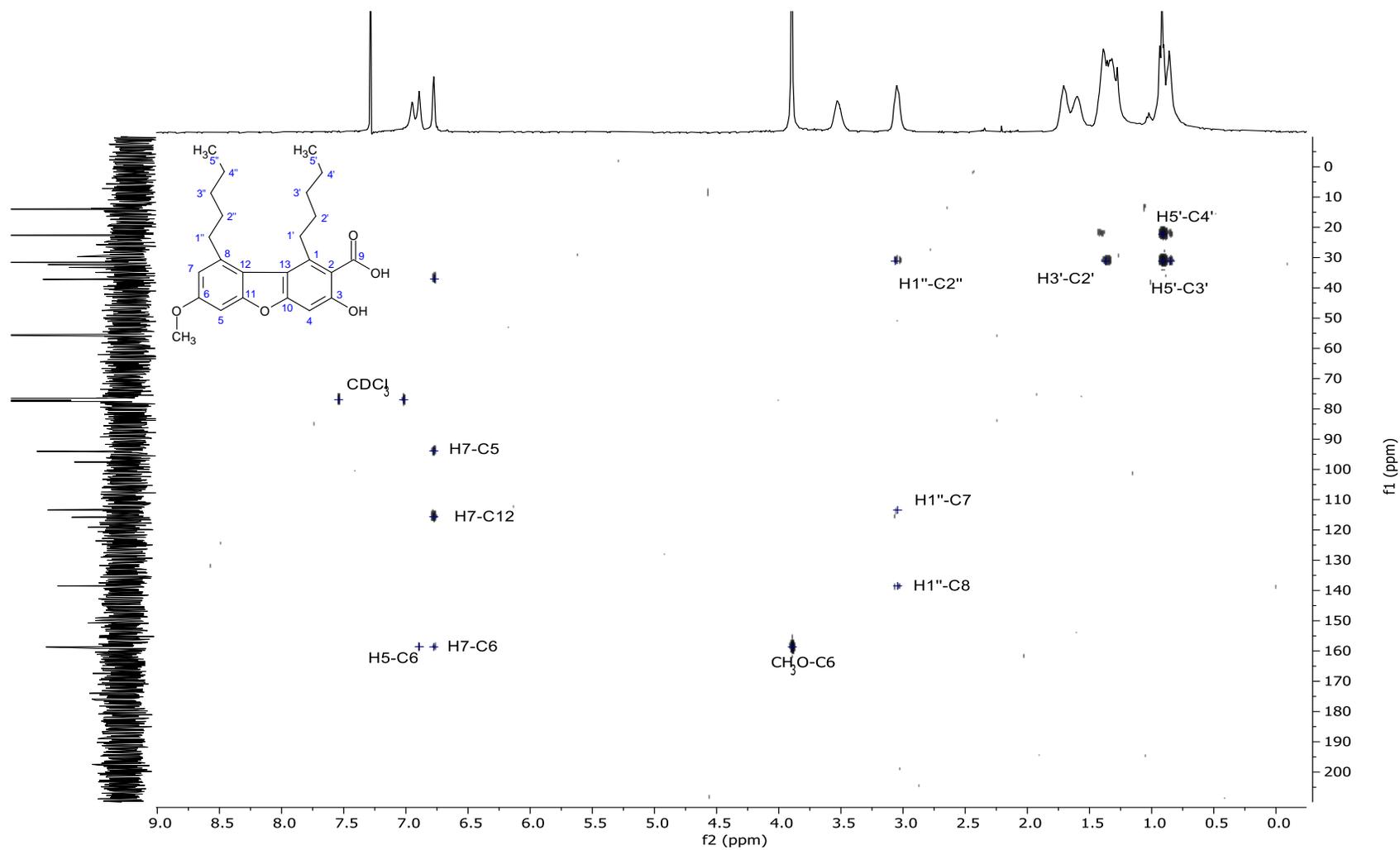
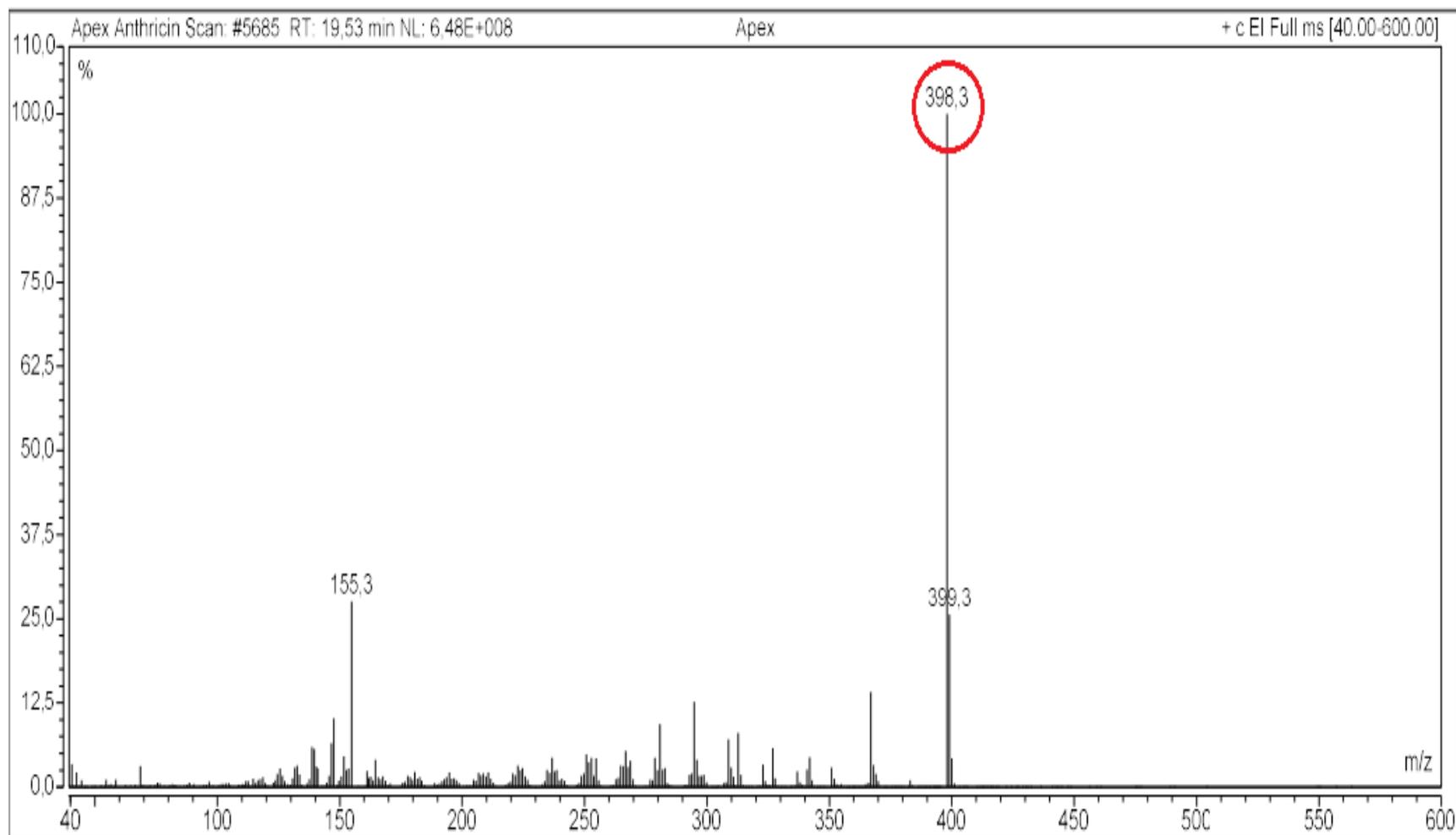


Figura 6-20. Espectro HMBC del ácido condidimico (5) ( $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 6-21.** Espectro de masas (EMIE) del ácido condidymico (5)

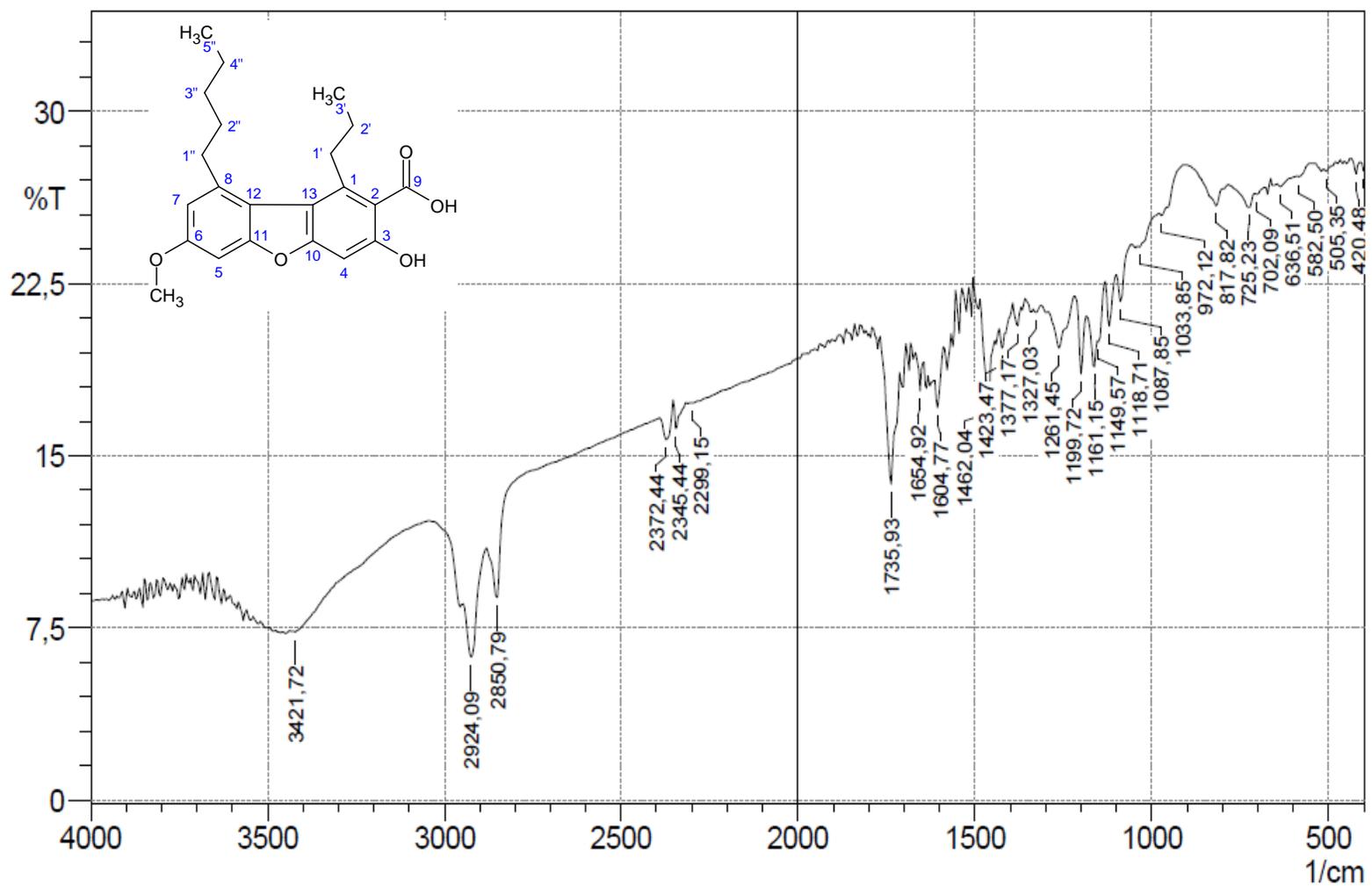
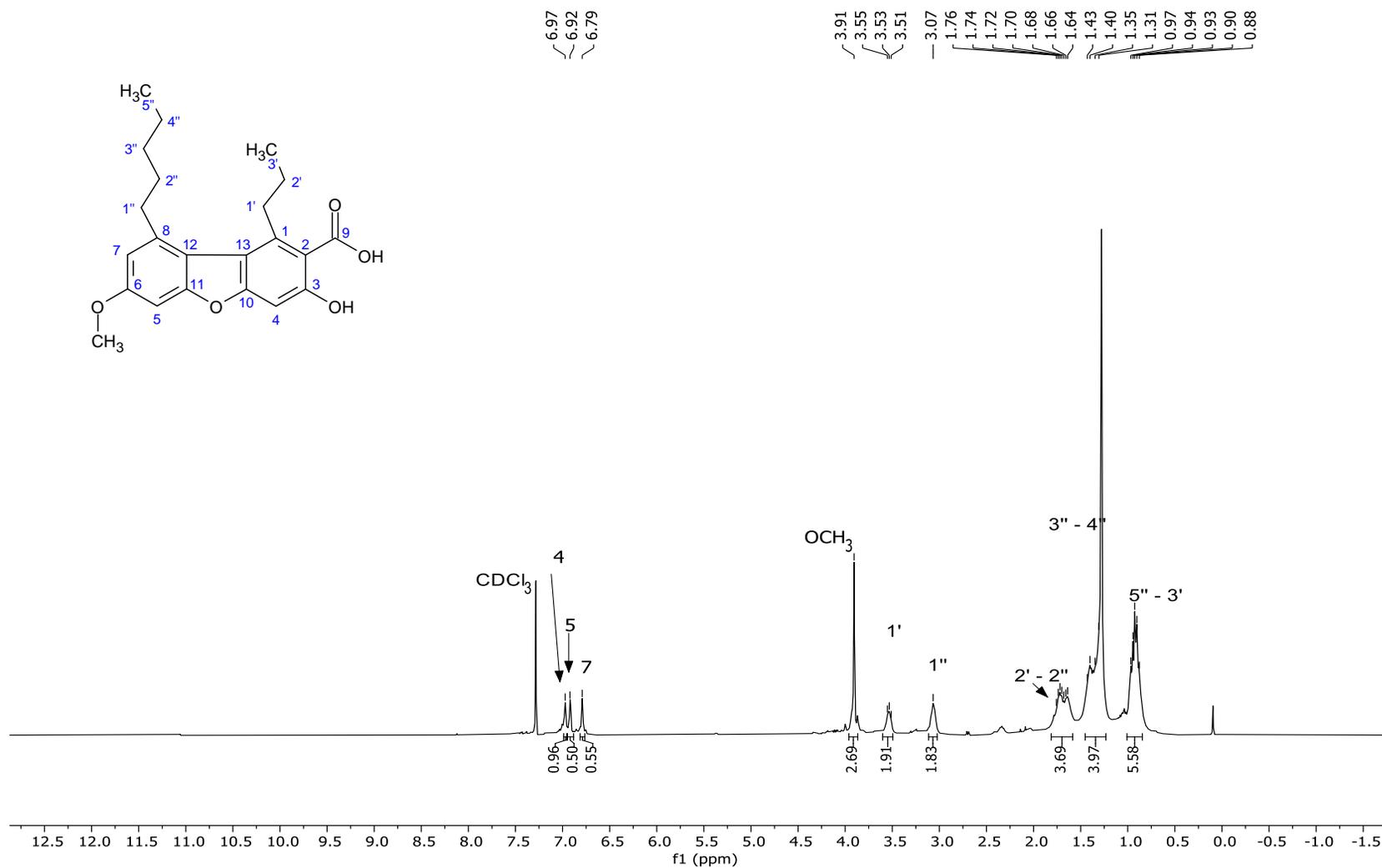
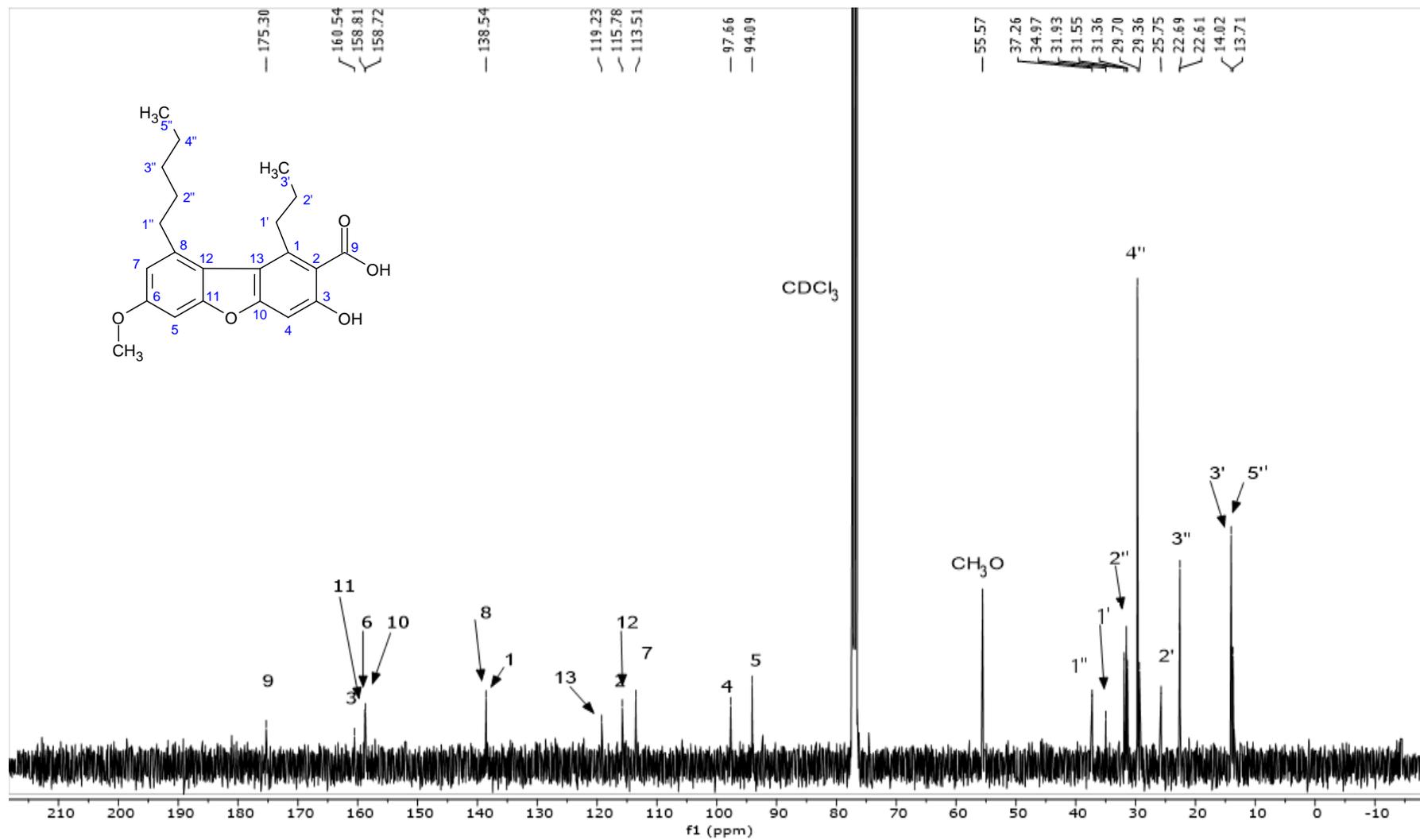
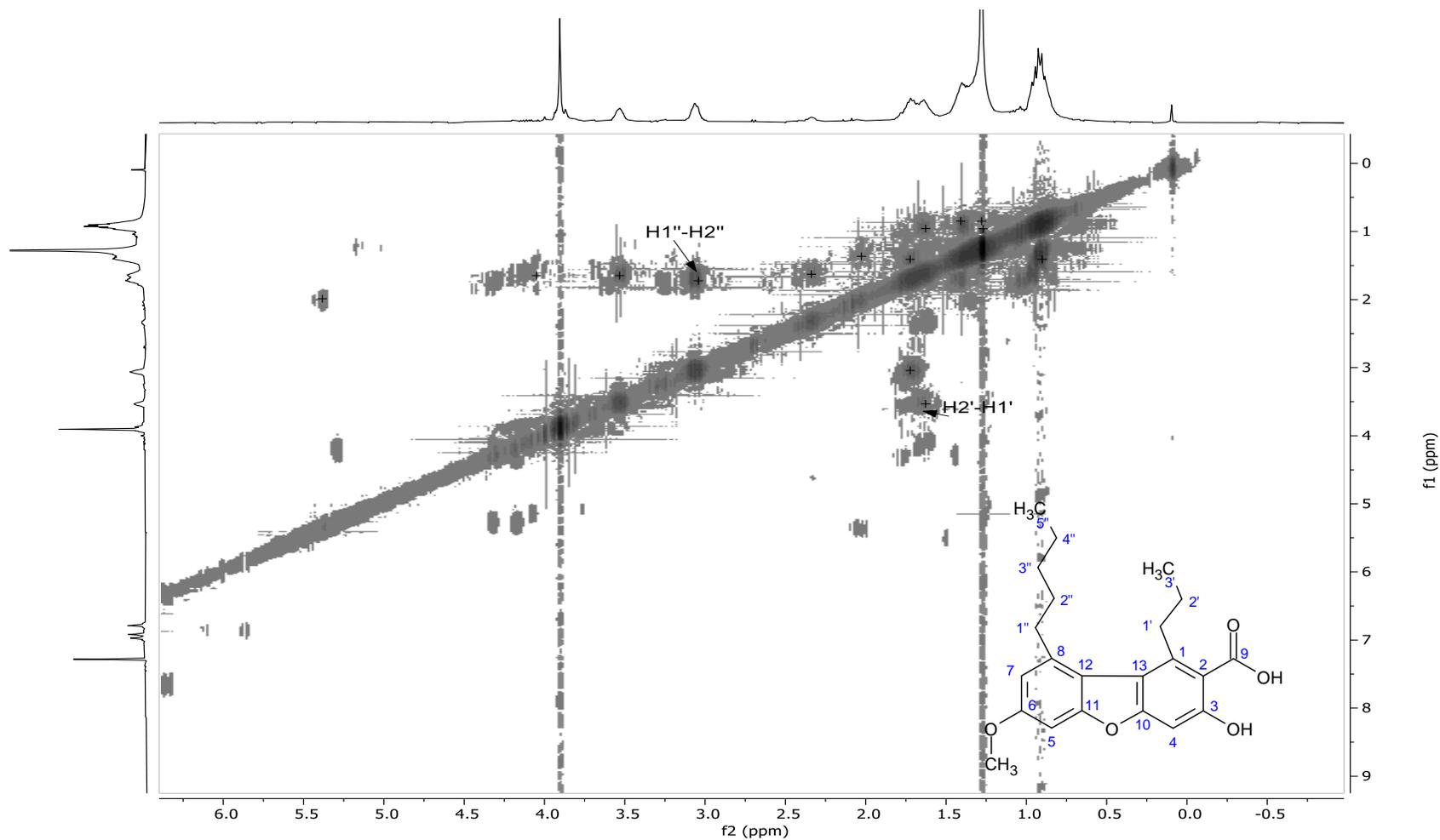


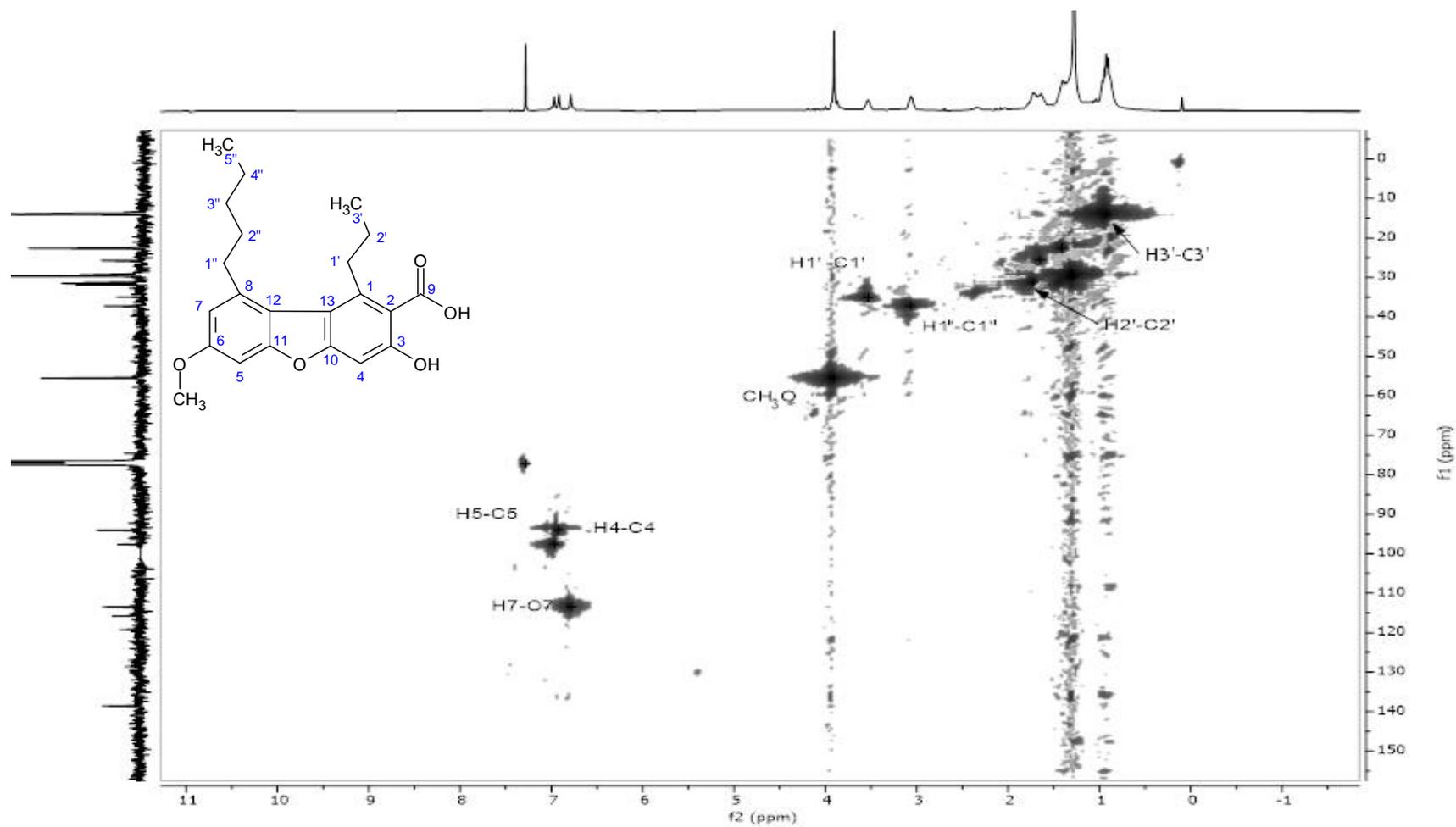
Figura 6-22. Espectro IR (KBr, cm<sup>-1</sup>) del ácido isididimico (6).



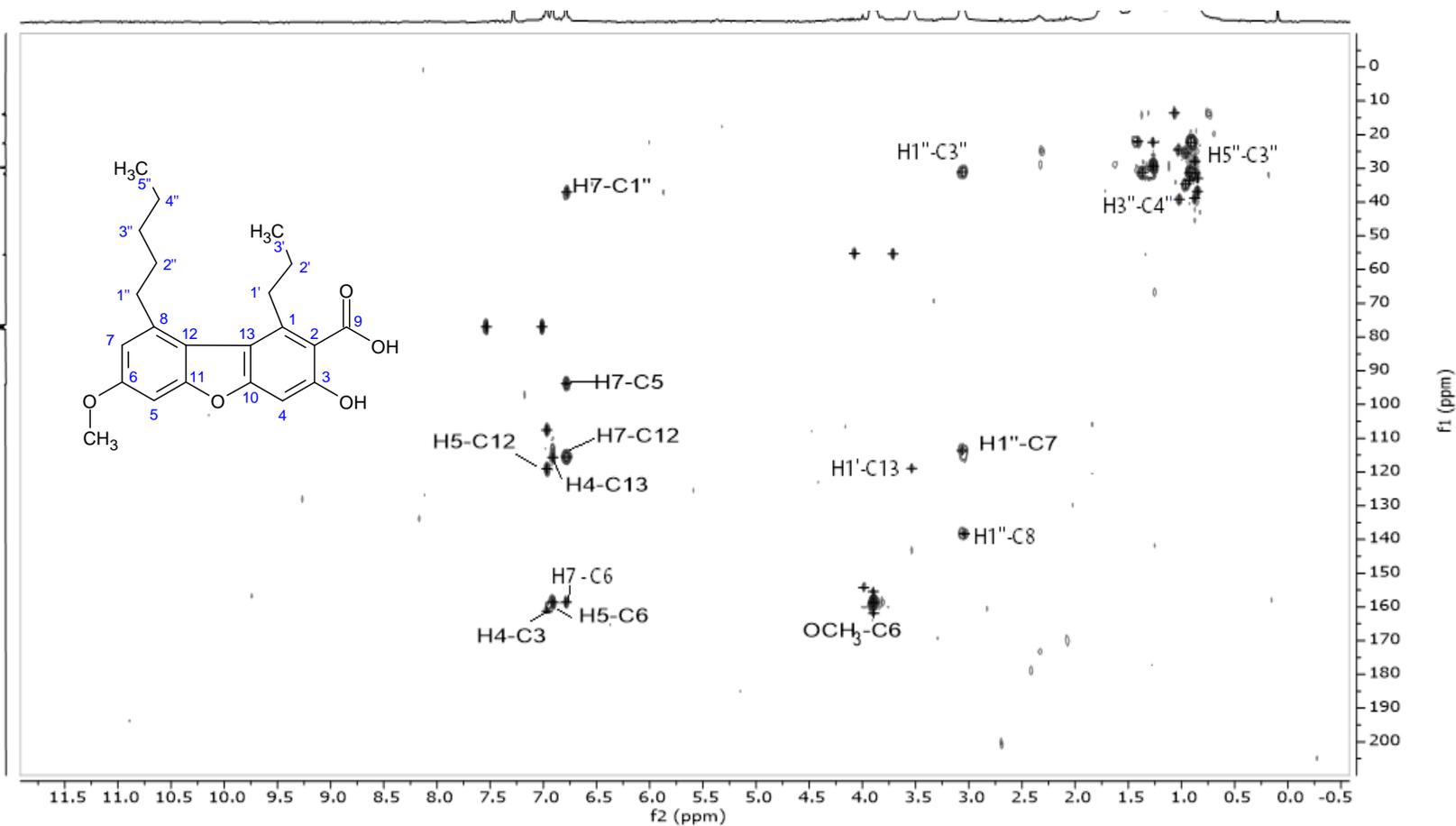
**Figura 6-23.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del ácido isodidymico (6) (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz).



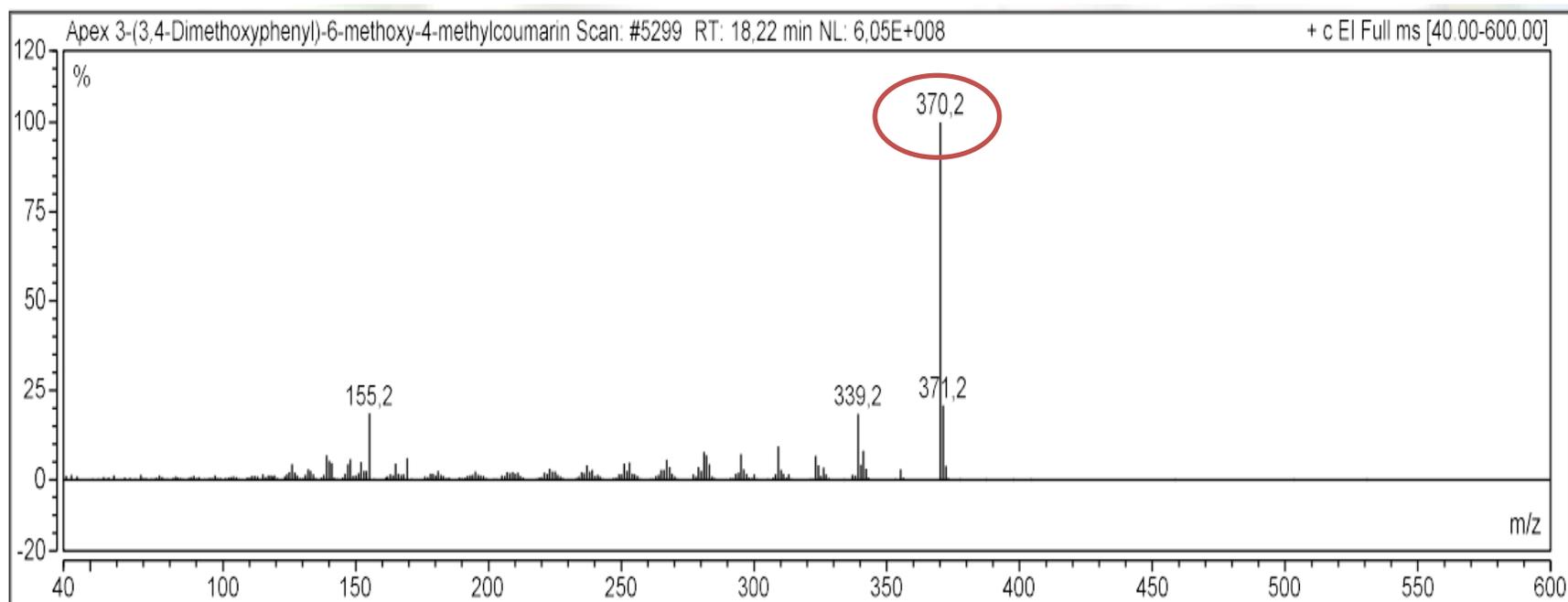
**Figura 6-24.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del ácido isodidymico (**6**) ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz).**Figura 6-25.** Espectro COSY del ácido isodidymico (**6**) ( $\text{CDCl}_3$ ).



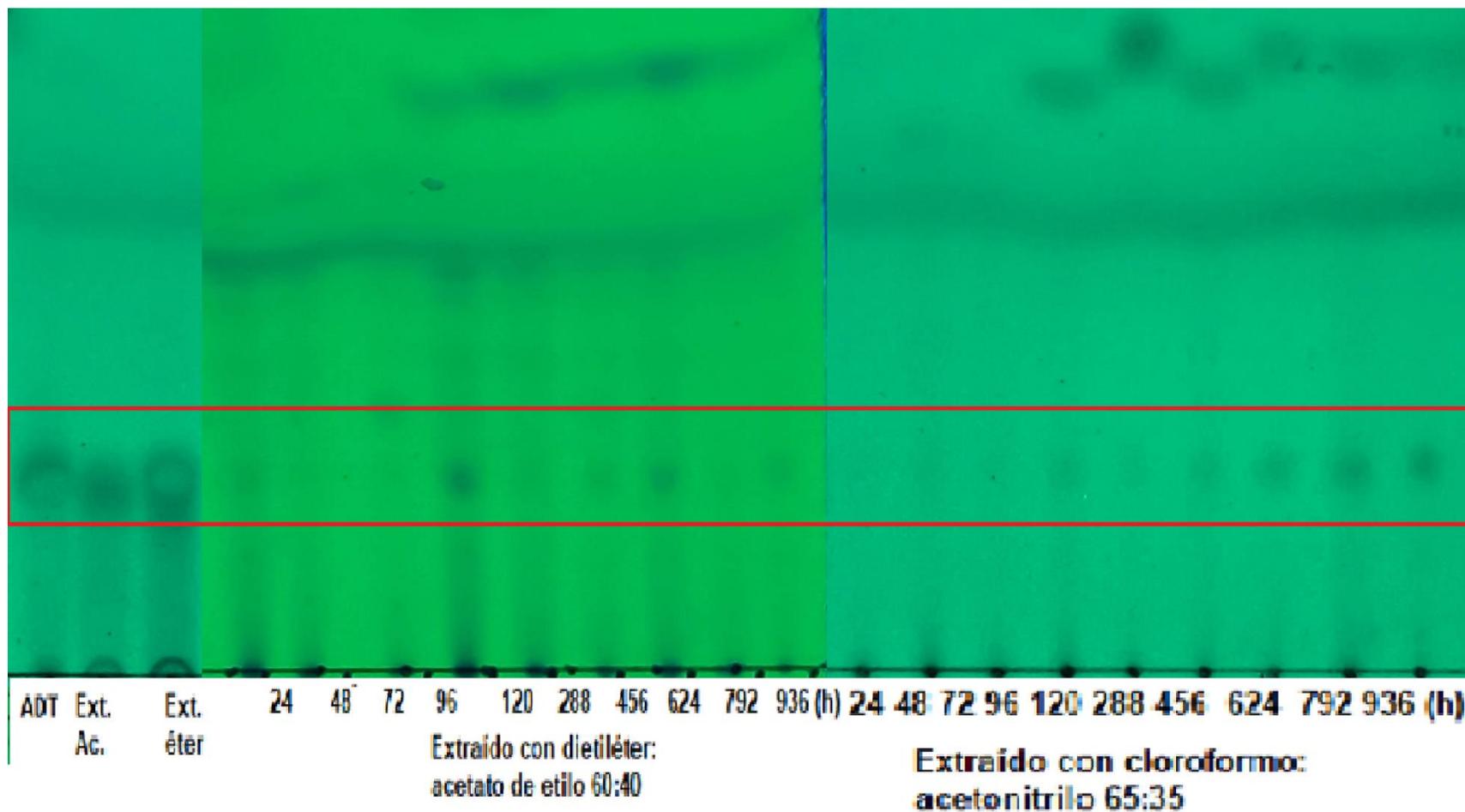
**Figura 6-26.** Espectro HMQC del ácido isididmico (6) (CDCl<sub>3</sub>).



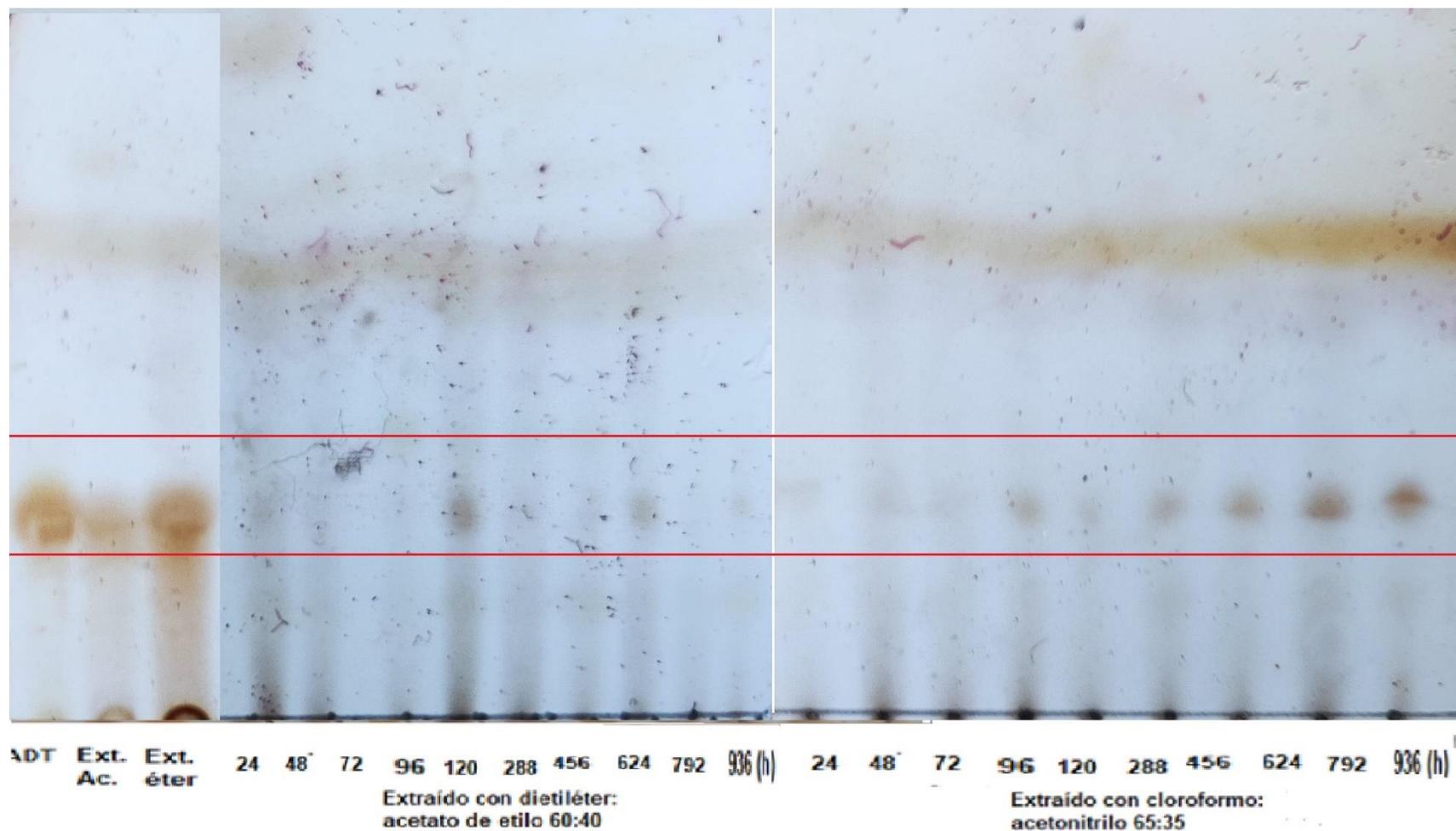
**Figura 6-27.** Espectro HMBC del ácido isodidymico (6) (CDCl<sub>3</sub>).



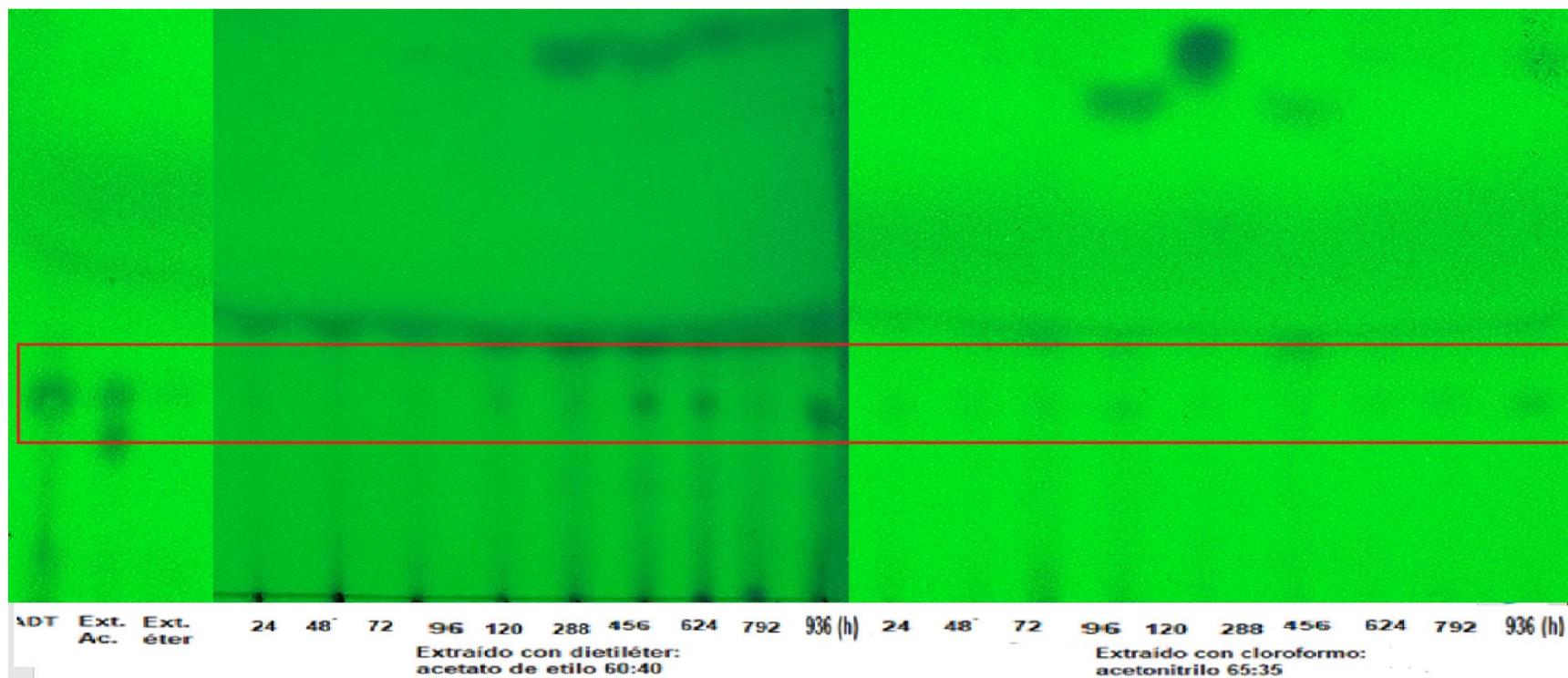
**Figura 6-28.** Espectro de masas (EMIE) de masas ácido isodidymico



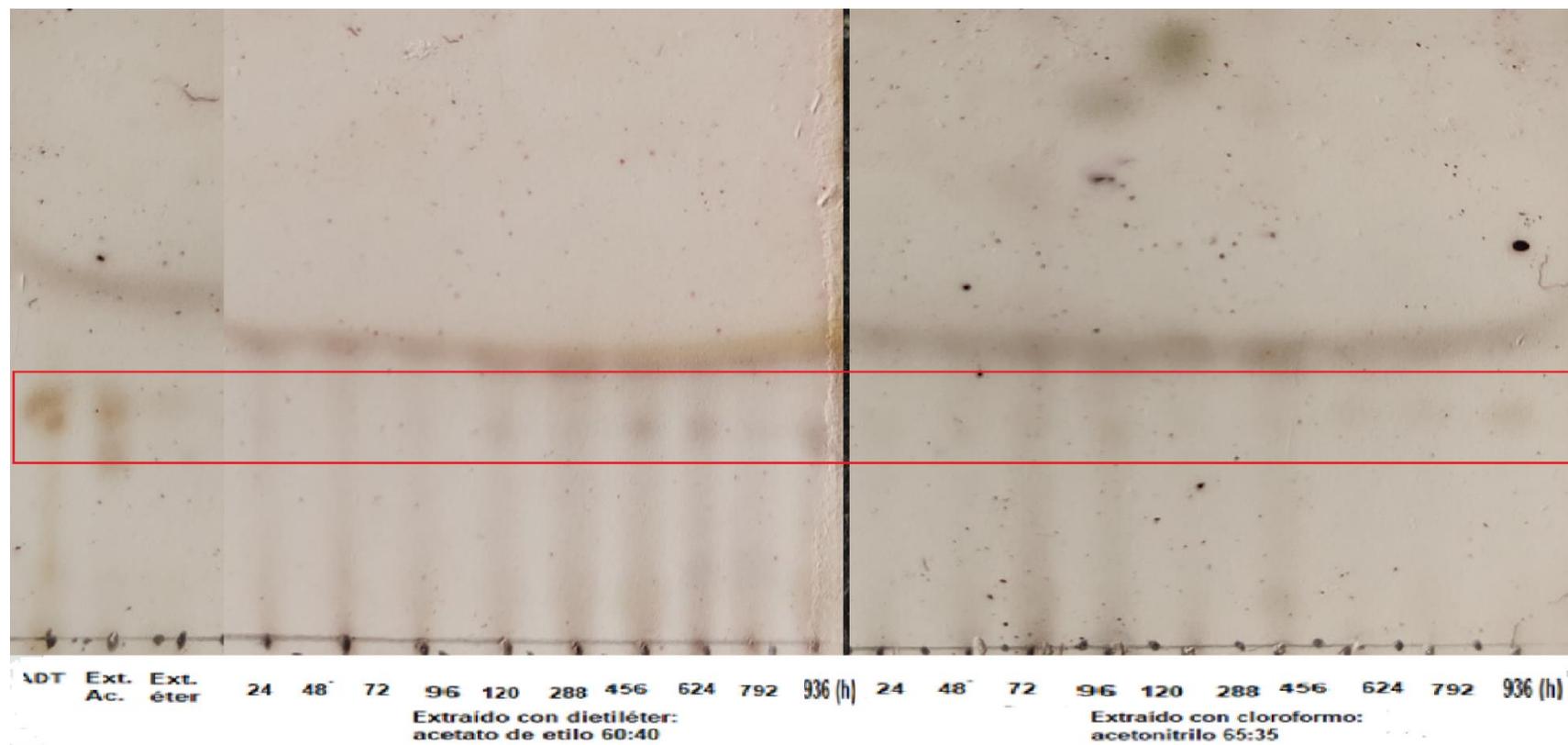
**Figura 6-29:** Perfiles cromatográficos de la bioproducción de compuestos fenólicos de baja (a) y mediana (b) polaridad por *T. vermicularis* mediante inmovilización celular en caolinita suministrada con NaOAc (1 mM). Ácido descarboxithamnólico (ADT), extracto en acetona del líquen (Ext. Ac.), extracto en éter del líquen (Ext. Éter).



**Figura 6-30:** Perfiles cromatográficos de la bioproducción de compuestos fenólicos de baja (a) y mediana (b) polaridad por *T. vermicularis* mediante inmovilización celular en caolinita suministrada con NaOAc (1 mM). Ácido descarboxithamnólico (ADT), extracto en acetona del líquen (Ext. Ac.), extracto en éter del líquen (Ext. Éter). Placa revelada con solución de ácido sulfúrico en etanol al 10%.



**Figura 6-31:** Perfiles cromatográficos de la bioproducción de compuestos fenólicos de baja (a) y mediana (b) polaridad por *T. vermicularis* mediante inmovilización celular en caolinita suministrada con NaOAc (0.1 mM). Ácido descarboxithamnólico (ADT), extracto en acetona del líquen (Ext. Ac.), extracto en éter del líquen (Ext. Éter).



**Figura 6-32:** Perfiles cromatográficos de la bioproducción de compuestos fenólicos de baja (a) y mediana (b) polaridad por *T. vermicularis* mediante inmovilización celular en caolinita suministrada con NaOAc (0.1 mM). Ácido descarboxithamnólico (ADT), extracto en acetona del líquen (Ext. Ac.), extracto en éter del líquen (Ext. Éter). Placa revelada con solución de ácido sulfúrico en etanol al 10%.