



Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

David Gilberto Torres Vargas

Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Bogotá DC, Colombia
2023

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

David Gilberto Torres Vargas

Tesis presentada como requisito parcial para optar por el título de:
Magíster en Ciencias (MSc) Química - Modalidad Investigación

Director:

Prof. Jaime Aguirre Ceballos
Profesor Titular - Emérito - Instituto de Ciencias Naturales
Facultad de Ciencias
Universidad Nacional de Colombia

Línea de investigación:

Sustancias bioactivas de líquenes colombianos

Grupo de investigación:

Grupo de Investigación en Estudios Biológicos y Físicoquímicos de Líquenes Colombianos (GRIEB)
Grupo de Investigación en Química Medicinal (GRIQUIMED)

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
2023

Los hombres nunca tienen, sea en lo que sea, experiencias idénticas, pero suponen que lo son, hacen como si lo fueran a todos los efectos prácticos. La experiencia subjetiva de un individuo es inaccesible para otro.

Alain Coulon
Etnometodología

Wenn du es nicht einfach erklären kannst, hast du es nicht genug verstanden - Si no eres capaz de explicar algo claramente, es que aún no lo has entendido lo suficiente.

Albert Einstein

Declaración

Me permito afirmar que he realizado ésta tesis de manera autónoma y con la única ayuda de los medios permitidos y no diferentes a los mencionados el presente texto. Todos los pasajes que se han tomado de manera textual o figurativa de textos publicados y no publicados, los he reconocido en el presente trabajo. Ninguna parte del presente trabajo se ha empleado en ningún otro tipo de tesis.

Bogotá, D.C., 29.11.2023

David Gilberto Torres Vargas

Listado de símbolos y abreviaturas

Nota: Los símbolos, magnitudes y unidades de medida se presentan en el texto siguiendo los lineamientos de la norma NTC-ISO 80000-1 en su versión 2012.

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Definición	Unidad SI	Aparece en:
k_{obs}	Constante de velocidad aparente	s^{-1}	Sección 6.3.2
K_2	Constante de velocidad	$M^{-1} s^{-1}$	Sección 6.3.2

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Definición	Unidad SI	Unidad	Aparece en:
λ_{crit}	Longitud de onda crítica	nm	-	Ecuación 6-12
ν_{max}	Longitud de onda de absorción IR medio	-	cm^{-1}	Sección 6.2.5
δ	Desplazamiento químico	-	ppm	Sección 6.2.5

Abreviaturas

- **A:** Atranorina.
- **AcOEt:** Acetato de Etilo.
- **AG:** Ácido gálico.
- **ANOVA:** Análisis de varianza
- **AVO:** Avobenzona o 3-(4-tert-Butilfenil)-1-(4-metoxifenil)propano-1,3-diona.
- **BCF:** Sigla en inglés de factor de bioconcentración/bioacumulación
- **BMT:** Bemotrizinol o 2,4-bis[4-(2-etilhexiloxi)-2-hidroxifenil]-6-(4-metoxifenil)-1,3,5-triazina.
- **BHA:** Butilhidroxianisol.

- **BHT**: Butilhidroxitolueno.
- **BP3**: Benzofenona 3.
- **CC**: Cromatografía en columna.
- **CC-A**: Cromatografía en columna abierta.
- **CCD**: Cromatografía de capa delgada.
- **CCD-A**: Cromatografía de capa delgada analítica.
- **CCD-P**: Cromatografía de capa delgada preparativa.
- **c-hex**: Ciclohexano.
- **CP**: Cáncer de piel.
- **CPTNM**: Cáncer de piel no melanoma.
- **CPTM**: Cáncer de piel de tipo melanoma.
- **DCM**: Diclorometano.
- **DPPH**: Radical 1,1-difenilpicrilhidrazilo.
- **EHMC**: Acrónimo del nombre INCI del Etilhexilmetoxicinamato.
- **EROs**: Especies reactivas de oxígeno.
- **ERNs**: Especies reactivas de nitrógeno.
- **EtOH**: Etanol - Alcohol etílico.
- **Et₂O**: Éter etílico.
- **FDA**: *Food and Drug Administration* de los EE.UU.
- **FPS**: Factor de Protección Solar.
- **FRAP**: *Ferric ion Reducing Activity Power* - Poder Reductor Férrico.
- **HL**: Hongo liquenizado antes denominado líquen.
- **HMBC**: Heteronuclear multiple bond correlation.
- **HMQC**: Heteronuclear multiple quantum correlation.
- **HSQC**: Heteronuclear single quantum correlation.
- **IPL**: Inhibición de la peroxidación lipídica.
- **IR**: Infrarrojo o radiación infrarroja.
- **MATE**: Mecanismo antioxidante por transferencia electrónica.
- **MATH**: Mecanismo antioxidante por transferencia de protones.
- **MED**: Mínima dosis eritematogéna
- **Me₂CO**: Acetona
- **MeOH**: Metanol.
- **MMP**: Metaloproteinasas de la matriz extracelular.

- **MS**: Espectrometría de masas.
- **msnm**: Metros sobre el nivel del mar.
- **n-Hex**: *n*-hexano.
- **NIR**: Infrarrojo cercano.
- **OMC**: Sinónimo INCI del **EHMC** - Metoxicinamato de octilo (etilhexilo)
- **PGE2**: Prostaglandina E2.
- **PPCP**: Productos para el cuidado personal
- **RMN**: Resonancia magnética nuclear.
- **RMN ¹H**: Resonancia magnética nuclear de hidrógeno.
- **RMN ¹³C**: Resonancia magnética nuclear de carbono 13.
- **UV**: Ultravioleta o radiación ultravioleta.
- **SD**: Desviación estándar.
- **SOD**: Superóxido dismutasa.
- **TEAP**: Sigla de Transferencia Electrónica Acoplada a Transferencia de protones.
- **TPNa**: Sigla de tocoferol fosfato de sodio.

Agradecimientos

Doy gracias a la Profesora Liliam Alexandra Palomeque Forero, quien en el momento más crítico de mi Maestría estuvo allí para asesorarme y darme consejos acertados sobre el camino a seguir. Así como a los profesores Norma Angélica Valencia Islas y José Leopoldo Rojas Araque por su asesoría, acompañamiento académico e investigativo, diseño, estructuración y desarrollo de la fase experimental del presente trabajo.

De igual forma, al Profesor Roberto Dávila, quien me guió en el retorno a las ciencias biológicas y que fue crucial para la clasificación taxonómica de las muestras de hongos liquenizados del presente estudio. También al Profesor Jaime Aguirre Ceballos, quien me apoyó con su supervisión y me suministró constantemente material bibliográfico derivado de sus estudios de la flora de hongos liquenizados de Colombia.

Al programa de becas Efi-Ciencias, que me permitió materializar el sueño de realizar un posgrado en mi amada y siempre gloriosa Universidad Nacional de Colombia.

Se agradece al Ministerio de Ambiente y Desarrollo sostenible haber otorgado el Otrosí No. 4 de fecha 21 de marzo del 2018 adicionado al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 del 2016 que cobija 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*” (Código HERMES: **35978** Dirección de Investigación, Universidad Nacional de Colombia), con el que se pudo acceder al material liquénico objeto de estudio. Asimismo, se agradece a Parques Nacionales Naturales de Colombia la gestión realizada para la recolección de las especies.

A mi colega químico y candidato a Doctor en Ciencias Química, Sergio Arquímedes González Monico, por su ayuda en el procesamiento de datos, análisis estadístico y en temas de programación en R para fotoprotección. También a mi colega biólogo y especialista en Estadística, Diego Andrés Benitez por su asesoría en la selección de pruebas estadísticas y adecuado análisis de los datos.

A mis colegas químicos Liz Michelle Juliette Parrado y Julian Rocha Jaime quienes me ayudaron en las últimas etapas de trabajo experimental. Y mi colega química Silvia Lorena Ramirez Marín por sus sugerencias acerca del texto y sus contribuciones sobre temas metrológicos.

A mis compañeros de grupo de investigación, quienes siempre aportaron ideas en los momentos de crisis y fueron una ayuda invaluable, en particular a la Doctora en Ciencias Farmacéuticas Lissy Marcella Núñez Arango.

Igualmente a mis padres quienes siempre han sido un pilar fundamental en mi vida y a mis amigos, quienes siempre han estado ahí para darme sus opiniones, consejos, críticas, sugerencias y en especial su grata compañía.

Resumen

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

Los páramos son biomas de alta montaña *sui generis* localizados en el neotrópico, cuyos organismos están expuestos de forma constante a bajas temperaturas y alta irradiación. La radiación solar en su conjunto, pero en especial la radiación ultravioleta e infrarroja cercana, ha sido identificada como el factor etiológico de problemas de la piel, tales como el fotoenvejecimiento y diversos tipos de cáncer de piel (**CP**). Los productos naturales derivados de la flora de los páramos, en particular los hongos liquenizados (**HL**), han sido poco explorados; no obstante, debido a que los compuestos de líquenes no solo absorben la radiación **UV** sino que tienen actividad antioxidante, es posible proponerlos como una fuente original de compuestos que protejan de la radiación solar.

Se evaluó la actividad antioxidante y fotoprotectora de varios extractos de **HL** del páramo de Sumapaz, donde el extracto de *Lobariella sipmanii* fue uno de los más activos y con mayor variedad de compuestos. De este **HL** se obtuvieron 3 compuestos, reportados por primera vez para la especie. Pseudociferelina A (**1**), 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) y orselinato de metilo (**3**). De ellos, los compuestos monoaromáticos (**2** y **3**) presentaron absorción UV-B (**FPS** = $21,86 \pm 0,09$ y $38,41 \pm 0,26$ a $200 \mu\text{g/mL}$ respectivamente) y baja amplitud espectral ($\lambda_{\text{crit}} = 333,9 \text{ nm}$ y $319,5 \text{ nm}$). Además, sus espectros de infrarrojo cercano son similares a los filtros solares comerciales usados como control y ofrecen protección para esta región del espectro electromagnético. Mientras que el compuesto **1** presentó un **FPS** de $9,82 \pm 0,58$ a $200 \mu\text{g/mL}$ y mayor amplitud espectral ($\lambda_{\text{crit}} = 365,8 \text{ nm}$) similar a la de filtros de amplio espectro como el bemotrizinol ($\lambda_{\text{crit}} = 374,2 \text{ nm}$).

Los compuestos **1** y **2** tuvieron actividad captadora de radicales libres ($\text{CE}_{50} = 217,1 \mu\text{M}$ y $342,3 \mu\text{M}$ respectivamente) y presentaron un porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica a 24 horas comparable con el **BHT** ($p > 0,05$), mientras que el compuesto **3** no presentó actividad antioxidante. Dado que el estrés oxidativo es uno de los factores que aceleran el desarrollo del **CP** y otros problemas cutáneos, la actividad captadora de radicales libres, el poder reductor férrico y la inhibición de la peroxidación lipídica de dos de los compuestos aislados (**1** y **2**) constituyen ventajas con respecto a los filtros solares comerciales disponibles actualmente. Asimismo, los compuestos aislados presentan menor potencial de causar alergias, menor toxicidad y más bajo potencial de bioacumulación para los organismos acuáticos *in silico* y están dentro de los parámetros de seguridad establecidos por la legislación europea. Lo que los convierte en alternativas para la fotoprotección y puede favorecer la bioprospección de los **HL** del neotrópico.

Palabras clave: Bioprospección, Fotoprotección, *Lobariella sipmanii*, Hongos liquenizados, Páramo

Abstract

Bioprospection of lichenized fungi from páramo de Sumapaz (Bogotá - Colombia) as promising sources of antioxidant and photoprotective dual drugs

Paramos are *sui generis* high mountain biomes located in neotropics, whose organisms are constantly exposed to low temperatures and high sun irradiation. Sun rays, especially ultraviolet (**UV**) and near-infrared (**NIR**) radiation, have been identified as an aetiological factor of skin problems including photo-aging and some types of skin cancer (**SC**). Natural products from Paramos' flora, particularly lichenized fungi (**LF**), have been scarcely explored; however, lichen substances not only absorb **UV** radiation, but also have antioxidant activity. Hence, **LF** can be proposed as an original source for compounds with photoprotective activity.

Several paramo's **LF** extracts have been evaluated for antioxidant and photoprotective activities. *Lobariella sipmanii* was one of the most active extracts and has the highest variety of compounds. From this **LF** three compounds were obtained for the first time. Pseudocypherallin A (**1**), 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethyl methylbenzoate (**2**) & methyl orsellinate (**3**). Monoaromatic compounds (**2** and **3**) presented UV-B and near infrared radiation absorption (**SPF** = 21.86 ± 0.09 & 38.41 ± 0.26 at $200 \mu\text{g}/\text{mL}$) and low spectral amplitude ($\lambda_{\text{crit}} = 333.9 \text{ nm}$ & 319.5 nm). Moreover, their **NIR** spectra were similar to commercially available sunscreens; thus, also offered protection in this region. Whereas compound **1** had **SPF** value of 9.82 ± 0.58 at $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ and higher spectral amplitude ($\lambda_{\text{crit}} = 365.8 \text{ nm}$), similar to modern wide-spectrum sunscreens like bemotrizinol ($\lambda_{\text{crit}} = 374.2 \text{ nm}$).

Compounds **1** and **2** had scavenging activity ($\text{EC}_{50} = 217,1 \mu\text{M}$ and $342,3 \mu\text{M}$ respectively) and exhibit lipid peroxidation inhibition percentages in 24 hours similar to **BHT** ($p > 0,05$), while compound **3** had not presented any antioxidant activity. Oxidative stress is one factor that accelerate **SC** and cutaneous problems development; therefore, radical scavenging, ferric reducing power and lipid peroxidation inhibition from compounds **1** and **2** constitute benefits regarding current commercially available sunscreens. Furthermore, isolated compounds obtained lower allergenicity potential, lower predicted *in silico* toxicity and bioaccumulation factors, and complied with safety EU requirements for chemical substances. It converts them into better alternatives for photoprotection and could favour neotropical **LF** bioprospection.

Keywords: Photoprotection, Bioprospection, *Lobariella sipmanii*, Lichenized fungi, Paramo

Zusammenfassung

Bioprospektion von lichenisierten Pilzen aus dem Sumapaz-Páramo (Bogotá - Kolumbien) als vielversprechende Quelle für duale Arzneimittel mit antioxidativer und lichtschtützender Wirkung

Paramos sind *sui generis* Hochgebirgsbiome im Neotropikum, deren Organismen ständig niedrigen Temperaturen und hoher Sonnenbestrahlung ausgesetzt sind. Sonnenstrahlen, insbesondere Ultraviolett- (**UV**) und Nahinfrarotstrahlung (**NIR**), wurde als ätiologischer Faktor von Hautproblemen wie Fotodermatosen und verschiedenen Arten von Hautkrebs identifiziert. Naturalstoffen isolierten von der Flora der Paramos, insbesondere lizenzierte Pilzen (**LP**), sind wenig studiert worden. Nicht nur absorbieren Flechtenstoffen UV-Strahlung sondern auch haben antioxidativen Aktivität, deswegen könnten **LP** als ursprüngliche Quelle für neuen Sonnenschutzmitteln vorschlagen werden.

Antioxidativen and lichtschtützenden Aktivitäten von einigen LP-Extrakten wurden hierin untersucht. *Lobariella sipmanii* war eine von aktivesten Extrakte und hatte die höchste Vielfalt an Flechtenstoffen. Aus dieser Flechte wurden zum ersten Mal drei Flechtenstoffen erhalten: Pseudocypherallin A (**1**), 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylmethylbenzoat (**2**) und Methylorsellinat (**3**). Die monoaromatischen Flechtenstoffen **2** und **3** zeigten eine Absorption von UV-B- und Nahinfrarotstrahlung (SPF = $21,86 \pm 0,09$ und $38,41 \pm 0,26$ zum $200 \mu\text{g}/\text{mL}$) und eine geringe spektrale Amplitude ($\lambda_{\text{krit}} = 333,9 \text{ nm}$ und $319,5 \text{ nm}$). Darüber hinaus waren ihre Nahinfrarotspektren ähnlich wie kommerzielle erhältliche Sonnenschutzmitteln und boten daher auch im diesen Bereich Schutz. Während Flechtenstoffe **1** einen SPF-Wert von $9,82 \pm 0,58$ zum $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ und eine höhere spektrale Amplitude ($\lambda_{\text{krit}} = 365,8 \text{ nm}$) aufwies, ähnlich wie breitspektrales Sonnenschutzmittel wie Bemotrizinol ($\lambda_{\text{krit}} = 374,2 \text{ nm}$).

Flechtenstoffen **1** und **2** hatten Scavenger-Aktivität ($\text{WK}_{50} = 217,1 \mu\text{M}$ und $342,3 \mu\text{M}$ jeweils) and zeigten Lipidperoxidationhemmungsätzen in 24 Stunden ähnlich wie BHT ($p > 0,05$), während Stoffe **3** keine antioxidative Aktivität aufwies. Oxidativer Stress ist ein Faktor, der die Entwicklung von Hautkrebs beschleunigt. Darum sind Radikalfängeraktivität, Eisenreduktionsaktivität und Lipidperoxidationhemmung vorteilhaft im Hinblick auf die derzeit kommerzielle erhältliche Sonnenschutzmittel. Die isolierten Flechtenstoffen erhielten sowohl niedrigeres Allergenespotenzial, und wenige *in silico*-Giftigkeit- und Bioakkumulationsfaktoren als auch EU-Sicherheitsanforderungen für Chemikalien. Dies macht sie zu besseren Alternativen für den Sonnenschutz und könnte die Bioprospektion von Neotropikum **LP** begünstigen.

Schlüsselwörter: Bioprospektion, Fotoprotektion, *Lobariella sipmanii*, lizenzierte Pilze, Paramo

Lista de figuras

5-1	Penetración de la luz solar en la atmósfera y la piel	10
5-2	Modificaciones químicas sobre bases pirimidínicas del ADN.	12
5-3	Mapa de radiación solar de la zona de colecta.	15
5-4	Reacciones de formación de especies reactivas.	16
5-5	Algunos mecanismos de acción de los antioxidantes	17
5-6	Diagrama de Jablonski de los fotoprocesos en moléculas	20
5-7	Origen biosintético de los metabolitos secundarios de los hongos liquenizados	29
5-8	Distribución del género <i>Lobariella</i> a nivel mundial	37
6-1	Mecanismo general de reacción del DPPH	47
6-2	Formación del ferricianuro ferroso en presencia de antioxidantes	50
6-3	Formación de hidroperóxidos lipídicos y su cuantificación	52
6-4	Modelo de bloques y cemento (<i>Bricks and mortar</i>) del estrato córneo	57
7-1	Placas cromatográficas del estudio bioautográfico	60
7-2	Resultados de los parámetros de fotoprotección de los extractos de HL	61
7-3	Resumen de las correlaciones HMBC Anillo A y Anillo B para la pseudociferelina A (1).	64
7-4	Resumen de las correlaciones H → C HMBC del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2).	66
7-5	Resumen de las correlaciones H → C HMBC del orselinato de metilo (3).	67
7-6	Tipos estructurales de los compuestos aislados	70
7-7	Poder reductor férrico de los compuestos aislados de <i>Lobariella sipmanii</i>	73

**Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos
duales con actividad antioxidante y fotoprotectora**

7-8	Inhibición de la peroxidación lipídica de los compuestos aislados de <i>Lobariella sipmanii</i>	75
7-9	Espectros NIR de los compuestos obtenidos de <i>Lobariella sipmanii</i> y los controles	81
B-1	Espectro Infrarrojo de la pseudociferelina A (1).	96
B-2	Espectro de RMN ¹H de la pseudociferelina A (1)	97
B-3	Espectro de RMN ¹³C de la pseudociferelina A (1)	98
B-4	Espectro de correlación hidrógeno-carbono HSQC de la pseudociferelina A (1)	99
B-5	Ampliación del Espectro HSQC de la Pseudociferelina A (1).	100
B-6	Espectro de correlación hidrógeno-carbono HMBC de la pseudociferelina A (1)	101
B-7	Ampliación del Espectro HMBC (δ_H 10,00 ppm - 13,80 ppm) de la pseudociferelina A (1).	102
B-8	Ampliación del Espectro HMBC (δ_H 1,50 ppm - 3,40 ppm) de la pseudociferelina A (1).	103
B-9	Espectro de RMN ¹H de 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2)	104
B-10	Espectro de RMN ¹³C del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2)	105
B-11	Espectro de correlación hidrógeno-carbono HMQC del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2).	106
B-12	Ampliación del Espectro HMQC del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2).	107
B-13	Espectro de correlación hidrógeno-carbono HMBC del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2).	108
B-14	Ampliación del Espectro HMBC (δ_H 2,00 ppm - 2,80 ppm) del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2)	109
B-15	Ampliación del Espectro HMBC ($\delta_H = 11,46$ ppm) del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2).	110
B-16	Espectro de RMN ¹H del orselinato de metilo (3)	111
B-17	Espectro de RMN ¹³C del orselinato de metilo (3).	112
B-18	Espectro HMQC del orselinato de metilo (3)	113
B-19	Ampliación del Espectro HMQC del orselinato de metilo (3)	114
B-20	Espectro de correlación hidrógeno-carbono HMBC del orselinato de metilo (3)	115
B-21	Ampliación del Espectro HMBC (δ_H 2,20 ppm - 11,50 ppm) del orselinato de metilo (3)	116
B-22	Ampliación del Espectro HMBC (δ_H 1,70 ppm - 4,10 ppm) del orselinato de metilo (3)	117
B-23	Ampliación del Espectro HMBC (δ_H 5,40 ppm - 6,80 ppm) del orselinato de metilo (3)	118

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

B-24	Ampliación del Espectro HMBC (δ_H 5,70 ppm - 6,65 ppm) del orselinato de metilo (3), acoplamiento con C4.	119
C-1	Resultados de poder captador y modelo obtenido para el BHT	121
C-2	Resultados de poder captador y modelo obtenido para el AG	121
C-3	Resultados de poder captador y modelo obtenido para la pseudociferelina A (1)	122
C-4	Resultados de poder captador y modelo obtenido para el 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2).	123
D-1	Resultados de los parámetros de fotoprotección de los extractos de HL a 200 $\mu\text{g/mL}$	127
E-1	Diagrama de caja para el poder captador de radicales libres de los extractos de HL	128
E-2	Prueba de Tukey (95 %) para el ensayo de DPPH de los extractos de HL	129
E-3	Diagrama de caja para el ensayo de FRAP de los extractos de HL	130
E-4	Prueba de Tukey (95 %) para el ensayo de FRAP de los extractos de HL	131
E-5	Diagramas de caja de los parámetros de fotoprotección de algunos extractos de HL	132
E-6	Diagramas de Tukey para los parámetros de fotoprotección de algunos extractos de HL	134
E-7	Diagrama de caja para la determinación de la CE_{50} de los compuestos aislados	135
E-8	Prueba de Tukey (95 %) para la determinación de la CE_{50} de los compuestos aislados	135
E-9	Diagrama de caja para el ensayo de reactividad ante radicales libres de los compuestos aislados	136
E-10	Prueba de Tukey (95 %) para el ensayo de reactividad ante el radical DPPH de los compuestos aislados	136
E-11	Diagrama de caja para el ensayo FRAP de los compuestos obtenidos	137
E-12	Prueba de Tukey (95 %) para el ensayo de FRAP de los compuestos aislados	139
E-13	Diagrama de caja para el ensayo de IPL a 24 h de los compuestos aislados	140
E-14	Diagrama de caja para el ensayo de IPL a 48 h de los compuestos aislados	140
E-15	Diagrama de caja para el ensayo de IPL a 72 h de los compuestos aislados	141
E-16	Prueba de Tukey (95 %) para el ensayo de IPL a 24 h de los compuestos aislados	142
E-17	Prueba de Tukey (95 %) para el ensayo de IPL a 48 h de los compuestos aislados	143
E-18	Prueba de Tukey (95 %) para el ensayo de IPL a 72 h de los compuestos aislados	144

**Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos
duales con actividad antioxidante y fotoprotectora**

E-19 Diagrama de caja para fotoprotección a $100\mu\text{g}/\text{mL}$ de los compuestos aislados 145

E-20 Diagramas de Tukey para los parámetros de fotoprotección de los compuestos obtenidos . . . 147

Lista de tablas

5-1	Intervalo de longitud de onda y energía asociada a la radiación ultravioleta.	10
5-2	Filtros solares comunes en cosméticos y su máxima concentración permitida	21
5-3	Actividad antioxidante de extractos y metabolitos secundarios de hongos liquenizados	31
5-4	Actividad fotoprotectora de extractos y metabolitos secundarios de hongos liquenizados	32
5-5	Unidades bioclimáticas de alta montaña.	35
5-6	Metabolitos secundarios reportados para el genero <i>Lobariella</i>	38
6-1	Datos de recolección de las especies del estudio bioautográfico.	39
6-2	Fases móviles empleadas en la CCD-A	42
6-3	Datos de recolección e identificación taxonómica de <i>Lobariella sipmanii</i>	42
6-4	CC-A sobre gel de sílice de la fracción sólida (FSB)	44
6-5	Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción primaria etérea	45
6-6	Factores normalizados necesarios para determinar el FPS por espectrofotometría	53
6-7	Efectividad de los filtros solares ante la radiación UV-A	55
6-8	Asignaciones tentativas en el Infrarrojo Cercano (NIR)	56
7-1	Coloración de las reacciones para <i>Lobariella sipmanii</i>	59
7-2	Actividad captadora de radicales libres de extractos acetónicos de algunos HL del páramo de Sumapaz.	60
7-3	Poder reductor férrico de los extractos acetónicos de HL	61
7-4	Compuestos aislados de <i>Lobariella sipmanii</i>	63
7-5	Datos de RMN de la pseudociferelina A (1)	65

**Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos
duales con actividad antioxidante y fotoprotectora**

7-6	Datos de RMN del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetil benzoato de metilo (2)	65
7-7	Datos de RMN del orselinato de metilo (3)	66
7-8	CE ₅₀ para la captación de radicales libres de los compuestos aislados de <i>Lobariella sipmanii</i>	68
7-9	Reactividad de los compuestos aislados de <i>Lobariella sipmanii</i> como agentes captadores de radicales	71
7-10	Datos promedio de actividad fotoprotectora de los compuestos de <i>Lobariella sipmanii</i>	78
7-11	Valores de coeficiente de reparto (<i>Log P</i>) y de energía libre de Gibbs de transferencia	83
7-12	Valores calculados de toxicidad y bioacumulación en algunos organismos acuáticos.	88
C-1	Datos estadísticos de la regresión para obtener la CE ₅₀	120
C-2	Poder reductor férrico de los compuestos obtenidos de <i>Lobariella sipmanii</i>	124
C-3	Poder inhibidor de la peroxidación lipídica del extracto y los compuestos obtenidos de <i>Lobariella sipmanii</i>	124
D-1	Datos promedio de actividad fotoprotectora de diversos extractos liquénicos	125
D-2	Datos actividad fotoprotectora de los compuestos de <i>Lobariella sipmanii</i>	125
E-1	Comprobación de hipótesis estadísticas para la actividad captadora de radicales libres de los extractos de HL	128
E-2	Resultados del ANOVA de Welch para el ensayo DPPH de algunos extractos de HL	129
E-3	Prueba de Shapiro-Wilk (95 %) para el ensayo de FRAP de los extractos de HL	130
E-4	Prueba de Levene para el ensayo FRAP de los extractos de HL	130
E-5	Resultados del ANOVA a una vía para el ensayo de FRAP de los extractos de HL	131
E-6	Pruebas de comprobación de hipótesis estadísticas para los datos de fotoprotección de algunos extractos de HL	133
E-7	Resultados del ANOVA a una vía para los parámetros de fotoprotección de algunos extractos de HL	133
E-8	Comprobación de hipótesis estadísticas para la determinación de la CE ₅₀	135
E-9	Comprobación de hipótesis estadísticas para la determinación de la reactividad ante radicales libres	136
E-10	Resultados del ANOVA de Welch para el ensayo DPPH de las compuestos aislados	136
E-11	Prueba de Shapiro-Wilk (95 %) para el ensayo de FRAP de los compuestos aislados.	138

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

E-12 Prueba de Bartlett (95 %) para el ensayo de FRAP de los compuestos obtenidos de <i>Lobariella sipmanii</i>	138
E-13 Prueba de Levene (95 %) para el ensayo de FRAP de los compuestos aislados	138
E-14 Resultados del ANOVA a una vía para el ensayo de poder reductor férrico de las sustancias aisladas	138
E-15 Pruebas de comprobación de hipótesis estadísticas al 95 % para los datos de fotoprotección de algunos extractos de HL	141
E-16 Resultados del ANOVA a una vía para el ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica de las sustancias aisladas	142
E-17 Pruebas de comprobación de hipótesis estadísticas para los datos de fotoprotección de los compuestos aislados	146
E-18 Resultados del ANOVA a una vía para los parámetros de fotoprotección de los compuestos obtenidos	146

Contenido

Listado de símbolos y abreviaturas	ii
Agradecimientos	v
Resumen	vi
Abstract	vii
Zusammenfassung	viii
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xiii
Contenido	xvi
1 Introducción	1
2 Planteamiento del Problema	6
3 Hipótesis	7
4 Objetivos	8
4.1 Objetivo general	8
4.2 Objetivos específicos	8
5 Marco teórico y estado del arte	9

**Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos
duales con actividad antioxidante y fotoprotectora**

5.1	Radiación solar y sus efectos en la piel	9
5.2	El cáncer de piel en Colombia	14
5.2.1	Antioxidantes como agentes preventivos del cáncer de piel	16
5.2.2	Protectores solares como agentes preventivos del CP	19
5.3	Hongos liquenizados	26
5.3.1	Usos tradicionales de los HL	27
5.3.2	Metabolitos secundarios de HL	28
5.3.3	Actividad antioxidante y fotoprotectora de las sustancias liquénicas	29
5.4	Los páramos y su flora de hongos liquenizados	33
5.4.1	El bioma páramo y sus condiciones	33
5.4.2	Flora liquénica	35
5.4.3	El género <i>Lobariella</i> y sus metabolitos	36
6	Materiales y Métodos	39
6.1	Recolección del material liquénico y selección de la especie de estudio	39
6.1.1	Tratamiento y limpieza del material biológico	40
6.1.2	Ensayos preliminares a pequeña escala	40
6.1.3	Bioautografía directa	40
6.1.4	Actividad antioxidante y fotoprotectora de los extractos	41
6.2	Estudio químico	41
6.2.1	Procedimientos experimentales generales	41
6.2.2	Confirmación de la identidad taxonómica	42
6.2.3	Extracción	43
6.2.4	Fraccionamiento	43
6.2.5	Aislamiento y purificación de compuestos	44
6.3	Estudio de actividad biológica	46
6.3.1	Procedimientos generales	46
6.3.2	Determinación de la actividad antioxidante	47

**Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos
duales con actividad antioxidante y fotoprotectora**

6.3.3	Determinación de la actividad fotoprotectora	52
6.3.4	Análisis estadístico	56
6.3.5	Lipofilicidad y permeabilidad dérmica	56
6.3.6	Determinación <i>in silico</i> del potencial de bioacumulación y la toxicidad acuática	57
7	Resultados y discusión	59
7.1	Selección de <i>Lobariella sipmanii</i> como especie objeto de estudio	59
7.2	Estudio químico de <i>Lobariella sipmanii</i>	62
7.2.1	Obtención de compuestos	62
7.2.2	Caracterización estructural de compuestos	63
7.3	Actividad biológica de los compuestos obtenidos de <i>Lobariella sipmanii</i>	67
7.3.1	Actividad Antioxidante	67
7.3.2	Actividad fotoprotectora	78
7.3.3	Lipofilicidad y permeabilidad dérmica	82
7.3.4	Relación estructura - riesgos para la salud y el medio ambiente	85
8	Conclusiones	90
9	Recomendaciones y Perspectivas	92
A	Glosario	93
B	Espectros obtenidos	96
B.1	Pseudociferelina A	96
B.2	2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo	104
B.3	Orselinato de metilo	111
C	Datos de actividad antioxidante	120
C.1	Poder captador de radicales libres con el modelo DPPH	120
C.2	Poder Reductor Ferrico - FRAP	124
C.3	Inhibición de la peroxidación Lipídica	124

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos
duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

D Datos de actividad fotoprotectora	125
E Análisis estadístico	128
Referencias Bibliográficas	148

1 Introducción

En la literatura se han propuesto algunas acepciones para el término **bioprospección** [Melgarejo *et al.*. 2002; Melgarejo. 2003; Torres & Velho. 2009].

- Búsqueda de compuestos novedosos en plantas, animales y microorganismos, actividades encaminadas a aumentar el conocimiento de los organismos vivos para potenciar su uso en diversas actividades económicas.
- Búsqueda sistemática de componentes naturales y/o organismos completos para darles valor comercial mediante el desarrollo de productos.
- Búsqueda de recursos químicos y genéticos de valor comercial a través de la investigación y análisis de la diversidad biológica y del conocimiento tradicional.
- Búsqueda de metabolitos secundarios novedosos a partir de fuentes naturales, entre otras.

A partir de las definiciones expuestas, es posible afirmar que la bioprospección no solo contribuiría a enriquecer nuestro conocimiento de la biodiversidad, sino que también puede desempeñar un papel como herramienta para impulsar el desarrollo técnico, científico y económico de país. Esta perspectiva resulta especialmente relevante en naciones como Colombia, donde la biodiversidad y el conocimiento tradicional constituyen riquezas de incalculable valor [Torres & Velho. 2009].

La inmensa riqueza en biodiversidad presente en Colombia puede atribuirse a tres razones fundamentales: En primer lugar, su privilegiada ubicación geográfica en la región ecuatorial del planeta, donde las condiciones de temperatura, humedad e irradiación solar son más uniformes a lo largo del año, comparado con otras regiones [Cuatrecasas. 1958]. En segundo lugar, Colombia se encuentra en la confluencia de diversos componentes biogeográficos propios del neotrópico, como los componentes Amazónico, Andino, Caribe, Centroamericano, entre otros [Sipman. 2002]. En tercer lugar, la cordillera de los Andes constituye una barrera que posibilita gradientes altitudinales desde el nivel del mar hasta más de 4 000 **msnm**, generando así una amplia variedad de ambientes, biomas y ecosistemas; además de propiciar procesos de especiación [Cuatrecasas. 1958].

Dentro de la variedad mencionada, se encuentran los ecosistemas de alta montaña, reconocidos como *hot spots* debido a su alta biodiversidad y al alto grado de amenaza que enfrentan a causa de las actividades humanas [Castaño Uribe. 2002]. En estos ecosistemas se destaca la ocurrencia de un bioma *sui generis*: el

páramo, cuya ubicación geográfica se restringe al neotrópico ecuatorial, en altitudes mayores a los 3 200 **msnm**. Por esta razón, los páramos *sensu stricto* solo se encuentran en Costa Rica, Venezuela, Ecuador, Perú y Colombia. De estas naciones, Colombia alberga en su territorio más del 40 % del área total de páramos en el mundo [*Castaño Uribe*. 2002].

De acuerdo con *Cuatrecasas* [1958] y *Castaño Uribe* [2002] se estima que los páramos se originaron hace aproximadamente 5 millones de años, lo que coincide con la elevación de la cordillera de los Andes. La presencia de abundantes accidentes geográficos da lugar a fenómenos de insularidad, que son típicos de las zonas de alta montaña, lo que origina el alto grado de endemismo de las especies que habitan estas áreas. *Cuatrecasas* [1958] define a los páramos como regiones desarboladas, con condiciones ambientales de alta humedad, bajas temperaturas, constante radiación solar y elevada exposición a la radiación ultravioleta (**UV**) durante todo el año, debido a su altitud. En estas áreas se experimentan fluctuaciones fuertes de humedad y temperatura a lo largo del día, y la flora que allí habita enfrenta grandes restricciones en el acceso a los nutrientes del suelo. Gracias a su singular diversidad biológica y a sus condiciones ambientales, los páramos resultan ser regiones atractivas para ser investigadas con fines de bioprospección y conservación.

La radiación **UV** proveniente del Sol es un tipo de luz ionizante de alta energía (Sección 5.1). Uno de sus principales efectos nocivos en los organismos es la generación de estrés oxidativo, definido como el desbalance entre los mecanismos responsables de la producción de especies oxidantes altamente reactivas y aquellos encargados de su degradación o eliminación [*Helfrich et al.*. 2008; *Stiefel & Schwack*. 2015; *Dias-Ferreira et al.*. 2020]. Estas especies reactivas tienden a atacar componentes celulares sensibles, como el material genético, las proteínas, los lípidos de membrana, entre otros. El daño sobre el material genético de las células y el subsecuente estrés oxidativo en los tejidos inician los procesos fisiopatológicos que desencadenan diversos trastornos cutáneos, como fotoenvejecimiento o el cáncer de piel (**CP**) [*Helfrich et al.*. 2008; *Samarasinghe & Madan*. 2012; *Tewari et al.*. 2013; *Sarkany*. 2017; *Raad et al.*. 2017].

Para contrarrestar los efectos perjudiciales de la exposición repetitiva o excesiva, la flora presente en estos entornos ha desarrollado diversas estrategias en respuesta, entre las cuales se destaca la biosíntesis de metabolitos secundarios. Paralelamente, los seres humanos, quienes también estamos expuestos a esta radiación nociva, adoptamos estrategias similares para resguardarnos de la exposición a la radiación solar, por ejemplo, el uso de protectores solares con filtros o pantallas [*Nash et al.*. 2006; *Lohezic-Le Devehat et al.*. 2013; *Sarkany*. 2017; *Krutmann et al.*. 2021]. Además, no solo la radiación **UV** causa efectos perjudiciales, también otras regiones de espectro electromagnético, como el infrarrojo cercano (**NIR**) potencian estos efectos debido al daño en los citocromos de las mitocondrias y la generación excesiva de especies reactivas, como el anión radical superóxido [*Zastrow et al.*. 2009; *Krutmann et al.*. 2021].

A nivel mundial, la incidencia del **CP** se ha incrementado en los últimos años [*Koshy et al.*. 2010; *Duarte et al.*. 2018]. Colombia no es ajena a esta tendencia; en el año 2010 se atendieron 6 313 casos nuevos, con un subregistro estimado del 90 %, lo que significa que en realidad existe un número de casos aproximadamente 10 veces mayor que el informado al sistema de salud [*Pozzobon et al.*. 2018]. La incidencia de esta enfermedad se duplicó en la década que abarca desde el 2000 al 2010. Para el año 2010, el **CP** representó el 20 % de los casos nuevos de cáncer notificados en el país. Con una ligera predominancia en hombres en comparación con mujeres, y mayor afectación de la población mayor de 60 años [*Sánchez et al.*. 2011; *Pozzobon et al.*. 2018].

1. Introducción

El **CP** se subdivide en dos tipos principales, cáncer de piel de tipo melanoma (**CPTM**) y cáncer de piel de tipo no melanoma (**CPTNM**), este último es el tipo más frecuente. Dentro del **CPTNM**, el cáncer de células basales representa entre el 75% y el 80% del total de los casos, mientras que el 15% es carcinoma escamoso [Stiefel & Schwack. 2015; Duarte et al.. 2018; Pozzobon et al.. 2018]. A pesar de que el **CPTNM** presenta baja mortalidad, genera un impacto significativo en la salud pública y conlleva elevados costos para el sistema de salud [Sánchez et al.. 2011; Minsalud. 2015; Duarte et al.. 2018]. En contraste, el **CPTM**, aunque solo representa el 5% del total de los casos, presenta una baja tasa de supervivencia ($\leq 5\%$) una vez ha hecho metástasis y suele hacerlo en etapas tempranas [Sánchez et al.. 2011; Stiefel & Schwack. 2015].

Los productos fotoprotectores contienen dos tipos de sustancias que desempeñan esta función: los filtros solares inorgánicos, también llamados pantallas solares o filtros físicos, y los filtros solares orgánicos [Koshy et al.. 2010; Stiefel & Schwack. 2015; Juliano et al.. 2017]. Estos últimos son compuestos sintéticos que absorben ciertas regiones del espectro electromagnético y se emplean en altas concentraciones en formulaciones cosméticas y productos para el cuidado personal (**PPCPs**) [Stiefel & Schwack. 2015; Juliano et al.. 2017; Carve et al.. 2021]. De hecho, en todo el mundo se utilizan anualmente más de 10 000 toneladas métricas de protectores solares y muchas de estas sustancias terminan por lavado en los cuerpos de agua [Blüthgen et al.. 2012; Juliano et al.. 2017; Kar et al.. 2020; Huang et al.. 2021; Carve et al.. 2021]. Por ejemplo, filtros como la avobenzona (**AVO**), octocrileno, benzofenonas (**BP**) 1, 3, 4 y 8, homosalato, metoxicinamato de octilo (**OMC - EHMC**), entre otras, se detectan con frecuencia en aguas residuales en diversos lugares del mundo [Kar et al.. 2020]. La contaminación con estos filtros solares orgánicos tiene múltiples efectos perjudiciales tanto para el medio ambiente, los organismos, como para la salud humana, producto de su elevada hidrofobicidad, el potencial de bioacumulación y la disrupción endocrina que se ha reportado para algunos de estos compuestos en varios organismos, incluido el ser humano [MacManus-Spencer et al.. 2011; Blüthgen et al.. 2012; Ozáez et al.. 2014; Juliano et al.. 2017; Lorigo et al.. 2018; Kar et al.. 2020].

En los ecosistemas acuáticos algunos de los protectores solares orgánicos disponibles comercialmente causan efectos nocivos agudos y crónicos sobre ciertos organismos, como los corales y varias especies de peces [Schlumpf et al.. 2004; Blüthgen et al.. 2012; Kaiser et al.. 2012; Juliano et al.. 2017; Kar et al.. 2020]. Además, como estos ecosistemas actúan como sumideros de estas sustancias y de algunos de sus productos de biotransformación, existe la posibilidad de acumulación y persistencia en los sedimentos, así como la potencial bioacumulación y biomagnificación en los organismos [Juliano et al.. 2017; Kar et al.. 2020]. La bioconcentración de los filtros solares en organismos acuáticos es preocupante, ya que algunos de estos organismos forman parte de la cadena alimentaria e incluso son consumidos por las personas [Wen et al.. 2012].

Por otro lado, fotoprotectores comerciales como el **OMC - EHMC** o la **AVO** pueden sufrir reacciones químicas o fotoisomerización al ser expuestos a la radiación **UV**, lo que puede resultar en la pérdida de eficacia como protectores solares, la generación de derivados nocivos en la piel de los usuarios (fototoxicidad), la posibilidad de desencadenar estrés oxidativo o de inducir la fotosensibilización de la piel (fotoalergenicidad) [Huong et al.. 2007; MacManus-Spencer et al.. 2011; Lodén et al.. 2011; Gaspar et al.. 2012; Gilbert et al.. 2013; Afonso et al.. 2014; Heurung et al.. 2014]. Adicionalmente, se ha reportado que algunos filtros no solo permean la epidermis, sino que penetran hasta la dermis y pueden ser absorbidos por los vasos sanguíneos, lo que podría resultar en efectos sistémicos nocivos [Schlumpf et al.. 2004; Lodén et al.. 2011; Gilbert et al.. 2013; Watanabe et al.. 2018; Lorigo et al.. 2018]. Por ejemplo, el **OMC - EHMC** puede ser absorbido por

la piel y luego ser detectado en el torrente sanguíneo, en muestras de orina e incluso en leche materna, lo que implica una exposición sistémica a esta sustancia [Axelstad *et al.* 2011; Gilbert *et al.* 2013].

Por estos motivos, resulta conveniente y necesario encontrar sustancias alternativas, que de ser posible reúnan las siguientes características:

1. Alta absorción de la radiación solar, en especial la luz **UV**.
2. Estabilidad química ante la radiación **UV**.
3. Bajo potencial de bioacumularse en los organismos acuáticos.
4. Fácil biodegradabilidad.
5. Actividad antioxidante complementaria.

La actividad antioxidante es un complemento deseable en fotoprotección, ya que se ha reportado que el uso de antioxidantes, tanto por vía oral como por vía tópica, contribuye a evitar el estrés oxidativo inducido por la exposición a la luz **UV** [Rancan *et al.* 2002; Matsui *et al.* 2009]. De hecho, la aplicación tópica de antioxidantes lipofílicos como el tocoferol (Vitamina E) aumenta la eficacia fotoprotectora, dado que retrasa la dosis de radiación mínima de eritema hasta en un 26% [De Gálvez. 2010]. Sin embargo, es importante considerar que se han descrito posibles efectos de disrupción endocrina, carcinógenos y tóxicos para antioxidantes sintéticos ampliamente utilizados, como el butilhidroxitolueno (**BHT**), butilhidroxianisol (**BHA**), entre otros [Xu *et al.* 2021]. Es por ello que resulta ideal que los filtros solares alternativos sean moléculas de obtención sencilla, con capacidad antioxidante, que no sean carcinogénicas, ni tengan efectos tóxicos.

Por otra parte, en diversas regiones del mundo desde las décadas del 2000 y 2010 se exige que los protectores solares reivindiquen protección en el **NIR**, debido a su papel en el fotoenvejecimiento y el **CP** [Grether-Beck *et al.* 2014; Diffey & Cadars. 2016]. No obstante, es necesario destacar que en la actualidad existe una notable escasez de información sobre fotoprotección para esta región del espectro electromagnético. En vista de estas consideraciones y en consonancia con la creciente tendencia global hacia productos químicos más seguros y sostenibles [DeVito. 2016; Kar *et al.* 2020]. Una alternativa plausible y prometedora para la obtención de tanto de fármacos, como de activos cosméticos novedosos son los productos naturales [Velasco *et al.* 2008; Mishra *et al.* 2011].

Un **producto natural** puede ser definido como aquellos metabolitos secundarios obtenidos a partir de algún organismo vivo. Estas sustancias presentan como principales ventajas respecto a los compuestos de origen sintético las siguientes características: Son menos bioacumulables, se biodegradan con más facilidad, presentan mayor complejidad estructural y un mayor grado de diversidad química. Sin embargo, la mayor complejidad estructural también conlleva mayor dificultad de obtención mediante síntesis, debido a la necesidad de múltiples pasos de reacción y bajos rendimientos finales [Rancan *et al.* 2002]. Asimismo, otro inconveniente de los productos naturales es el suministro, ya que generalmente aquellos metabolitos más activos suelen encontrarse en cantidades muy pequeñas. No obstante, los líquenes u hongos liquenizados (**HL**) resultan ser prometedores en este sentido. Estos organismos producen una gran variedad de metabolitos

1. Introducción

secundarios únicos en proporciones que oscilan entre el 1 % hasta más del 20 % del peso seco de los talos [Hüneck. 1973; Masuch. 1993; Zambare & Christopher. 2012; Ureña-Vacas et al.. 2022], lo que los convierte en potenciales fuentes alternativas y novedosas de compuestos bioactivos. (Sección 5.3.2).

Adicionalmente, los metabolitos secundarios de los **HL** poseen un amplio espectro de actividades biológicas (Sección 5.3.3), tales como antioxidantes, antimicrobianas, antifúngicas, antineoplásicas, gastroprotectoras, fotoprotectoras, entre otras [Müller. 2001; Mitrović et al.. 2011; Shrestha & St. Clair. 2013; Fernández-Moriano et al.. 2016]. Muchos de los compuestos presentes en los **HL** actúan como fotoprotectores, previenen los daños causados por la radiación solar, al atenuar la radiación incidente y absorber de forma preferente la luz **UV** [Solhaug & Gauslaa. 1996; Müller. 2001; Boustie et al.. 2011; Molnár & Farkas. 2010; Nguyen et al.. 2013]. Además, la mayoría de las sustancias de los **HL** son compuestos fenólicos que tienen diversos mecanismos de actividad antioxidante [Molnár & Farkas. 2010; Fernández-Moriano et al.. 2016].

Por estas razones, los **HL** se perfilan como una fuente promisoría de sustancias que protejan la piel de la radiación solar, presentando ventajas comparativas respecto a los filtros comerciales tradicionales [Lohezic-Le Devehat et al.. 2013; Nguyen et al.. 2013]. Dado que poseen sustancias que no solo absorben la luz **UV**, sino que también tienen actividad antioxidante, lo que contribuye a prevenir y atenuar varios de los efectos perjudiciales de la luz solar sobre la piel, como el fotoenvejecimiento, la pérdida del colágeno y elastina, la inmunosupresión local y el **CP**. Que son causados por la formación foto-inducida de especies reactivas y el subsecuente estrés oxidativo en los tejidos [Masaki. 2010; Sklar et al.. 2013; Dias-Ferreira et al.. 2020].

Con todo esto en mente, desde hace algunos años en el Grupo de Investigación en Estudios Biológicos y Físicoquímicos de Líquenes Colombianos (GRIEB) y en el Grupo de Investigación en Química Medicinal (GRIQUIMED) se ha confirmado el potencial de los **HL** como alternativas en la fotoprotección. Por lo que, en este trabajo, a partir del estudio preliminar de la actividad antioxidante y fotoprotectora de un conjunto de extractos de **HL** obtenidos del páramo de Sumapaz se seleccionó a la especie *Lobariella sipmanii* para la obtención de compuestos con estas actividades biológicas. Como criterio adicional se consideró la poca información existente acerca de la química de esta especie y que además su estudio contribuye notablemente en la bioprospección de los **HL** del páramo.

2 Planteamiento del Problema

La exposición de la piel a la radiación ultravioleta causa toda una serie de problemas de salud, incluido diversos tipos de cáncer de piel. Dentro de las estrategias actuales de protección se incluye el uso de filtros solares orgánicos sintéticos. No obstante, algunas de estas sustancias presentan efectos perjudiciales sobre el ser humano y el medio ambiente. Por tal motivo, se buscan nuevas sustancias preferiblemente de origen natural, que permitan utilizar la biodiversidad propia del país, no tengan estos efectos nocivos y sean alternativas seguras para su eventual uso en productos cosméticos.

3 Hipótesis

Considerando las condiciones ambientales propias de los páramos, que son biomas únicos de las regiones de alta montaña de los Andes, se plantea la posibilidad de que algunos hongos liquenizados que allí habitan, como *Lobariella sipmanii*, *Thamnolia vermicularis*, *Everniastrum* sp, *Peltigera neopolydactyla* y *Cladonia didyma*, puedan ser empleados como fuentes novedosas y prometedoras de nuevos compuestos con actividad dual antioxidante y fotoprotectora. Estos compuestos podrían encontrar eventuales aplicaciones en la industria, impulsando la potencial prospección económica de estos organismos, así como brindar una estrategia adicional en la prevención del cáncer de piel.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar el potencial que posee una especie seleccionada de hongo liquenizado del páramo de Sumapaz como fuente de compuestos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora, con la finalidad de contribuir al desarrollo de principios activos de origen natural con uso potencial en formulaciones destinadas a la protección de la piel ante la radiación solar, que constituyan alternativas viables o complementarias de los fotoprotectores actualmente utilizados.

4.2 Objetivos específicos

- Seleccionar la especie de hongo liquenizado que será objeto de estudio con base en análisis bioautográficos de la actividad antioxidante y la determinación del factor de protección solar de extractos obtenidos a partir de algunas especies colectadas en el páramo de Sumapaz.
- Aislar, caracterizar e identificar los compuestos mayoritarios del hongo liquenizado seleccionado mediante una estrategia fitoquímica convencional, la determinación de las constantes físicas, análisis espectroscópicos y espectrométricos.
- Verificar la actividad antioxidante de las sustancias aisladas mediante la determinación del poder captador y la constante de reactividad ante radicales libres, así como otros mecanismos como el poder inhibidor de la peroxidación lipídica y su poder reductor férrico.
- Verificar la actividad fotoprotectora de las sustancias aisladas mediante la determinación *in vitro* del factor de protección solar, la longitud de onda crítica y la relación UVA/UVB, entre otros.
- Calcular el coeficiente de reparto en el sistema n-octanol/agua de los compuestos aislados como medida de su lipofiliidad y de su potencial aplicación a nivel dérmico.
- Establecer posibles correlaciones entre la estructura química de los compuestos aislados con la actividad antioxidante y fotoprotectora mostrada.

5 Marco teórico y estado del arte

5.1 Radiación solar y sus efectos en la piel

De toda la radiación solar, solo ciertas regiones del espectro logran penetrar la atmósfera y llegar a la superficie [Sklar *et al.*. 2013; Stiefel & Schwack. 2015]. Aproximadamente entre el 3% y el 7% de la luz solar corresponde a la luz ultravioleta (**UV**), mientras que alrededor del 44% constituye la luz visible, que se define de manera arbitraria como aquella que podemos percibir como colores. La luz infrarroja (**IR**) comprende el porcentaje remanente, que oscila entre el 49% y el 53% [Kim *et al.*. 2006; Liebel *et al.*. 2012; Kolbe. 2012; Stiefel & Schwack. 2015]. Dentro de esta última categoría, la luz IR-A (760 - 1400) nm hace parte del infrarrojo cercano (**NIR** 760 nm - 3000 nm) y representa alrededor de un tercio de la energía transferida por el Sol [Kim *et al.*. 2006; Schroeder *et al.*. 2008a]. En contraste, el resto de la radiación **IR** es la que se asocia con la transferencia de energía en forma de calor [Cho *et al.*. 2008].

Debido a esta distribución, a partir de la década del 2000 la preocupación sobre los efectos de la radiación solar en la piel no solo se ha enfocado en los conocidos efectos nocivos de la luz **UV**, sino también en otras regiones presentes en la luz solar [Zastrow *et al.*. 2009; Grether-Beck *et al.*. 2014]. Como consecuencia, desde el año 2006 están disponibles en Estados Unidos y Europa productos cosméticos que mencionan en sus declaraciones (*claims*) ejercer protección para las regiones **IR** y visible [Grether-Beck *et al.*. 2014].

La mayor parte de las investigaciones acerca de los efectos de la luz solar en la piel se han centrado en la región de la radiación **UV**. Esta se define como la luz o radiación electromagnética con longitudes de onda comprendidas entre (10 y 400) nm [Cockell & Knowland. 1999; Sklar *et al.*. 2013]. Según su energía y longitud de onda, se clasifica en cuatro regiones principales: UV-A, UV-B, UV-C y UV de vacío (Tabla 5-1). De estas cuatro regiones, solo las radiaciones UV-B y UV-A que corresponden a las longitudes de onda más largas, son capaces de atravesar la capa de ozono y llegar a la superficie terrestre [Nash *et al.*. 2006; Grether-Beck & Krutmann. 2009; Sklar *et al.*. 2013; Stiefel & Schwack. 2015]. De estas, la radiación UV-B es atenuada al ser absorbida parcialmente por la atmósfera; mientras que casi toda la radiación UV-A llega a la superficie y constituye entre el 95% y 98% del total de la luz UV, aproximadamente 20 veces más que la luz UV-B [Cockell & Knowland. 1999; Mishra *et al.*. 2011; Stiefel & Schwack. 2015].

La penetración de la radiación solar en la piel no solo depende de la longitud de onda y de la cantidad de radiación que incide en la superficie del planeta, también depende del fototipo de la piel en la escala

Tabla 5-1: Intervalo de longitud de onda y energía asociada a la radiación ultravioleta. [Gasparro. 2000; Mishra et al.. 2011; Sklar et al.. 2013; Stiefel & Schwack. 2015]

Región	Intervalo de longitud de onda λ (nm)	Energía asociada	
		(eV)	(kJ mol ⁻¹)
Ultravioleta de vacío	10 a 190	124 - 6,2	11 960 - 598
Ultravioleta C	190 a 290	6,2 - 4,4	598 - 424
Ultravioleta B	290 a 320	4,4 - 3,9	424 - 376
Ultravioleta A-2	320 a 340	3,9 - 3,1	376 - 299
Ultravioleta A-1	340 a 400		

Fitzpatrick, el tiempo de exposición, el grosor y la zona de la piel sobre la que incide la radiación [Meinhardt et al.. 2008; Grether-Beck & Krutmann. 2009]. El fototipo se define según el contenido de melanina en la piel, este pigmento actúa como un fotoprotector de amplio espectro, lo que afecta la penetración de la radiación UV-A y UV-B. Por otra parte, la radiación UV-B con longitud de onda más corta penetra solo el estrato córneo y llega a la lámina basal de la epidermis, debido a que la queratina de esta zona de la piel absorbe y dispersa dicha radiación [Meinhardt et al.. 2008]. Mientras que la radiación UV-A, visible y en particular la **IR** que poseen mayores longitudes de onda logran llegar a la dermis o incluso a la hipodermis y otras zonas subcutáneas, pudiendo afectar el tejido conectivo [Velasco et al.. 2008; Grether-Beck & Krutmann. 2009; Stiefel & Schwack. 2015] (Figura 5-1).

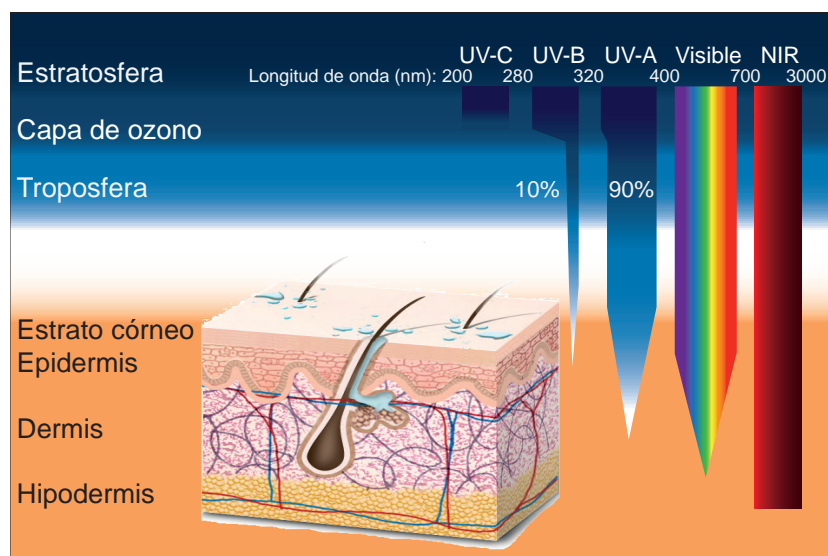


Figura 5-1: Penetración de las diferentes regiones de la luz solar en la atmósfera y en las capas de la piel

Radiación UV La luz **UV** posee suficiente energía para causar la ruptura de los enlaces químicos en muchos de los compuestos presentes en los seres vivos, cuya energía de enlace es del orden de 100 kJ mol⁻¹. Por tal motivo, se considera a los rayos **UV** parte de la radiación electromagnética ionizante y por tanto genera efectos genotóxicos [Ravanat et al.. 2001]. En consecuencia, es considerada como uno de los factores físicos relacionados con la aparición de algunos tipos de cáncer en seres humanos y otros organismos [Minsalud. 2015; Varol et al.. 2015].

De forma similar, los efectos biológicos sobre la piel también dependen de la longitud de onda. Tanto

la radiación UV-B, como la UVA-2 generan eritema, mientras que la UVA-1 no. A nivel molecular, la radiación UV-B produce daños al material genético debido a la formación de glicoles de timina, dímeros de ciclobutano-dipirimidina y aductos (6-4) pirimidina-pirimidona (Figura 5-2) [Velasco *et al.* 2008; Grether-Beck & Krutmann. 2009; Kolbe. 2012]. Estos dos últimos causantes de mutaciones y asociados a aparición de carcinomas de células basales y de células escamosas (**CPTNM**) después de una prolongada exposición [Schieke *et al.* 2003; Grether-Beck & Krutmann. 2009; Stiefel & Schwack. 2015; Sarkany. 2017]. De igual forma, la luz UV-B cambia citosinas por timinas y genera las mutaciones C \rightarrow T y CC \rightarrow TT típicas del **CPTM** [Sarkany. 2017]. Mientras que la luz UV-A induce la formación de especies reactivas, que producen reacciones de fotooxidación en diversas dianas celulares; tales como lípidos insaturados, aminoácidos, proteínas de la matriz extracelular, e incluso algunas bases nitrogenadas del ADN [Gasparro. 2000; Kolbe. 2012; Sklar *et al.* 2013].

En el caso del ADN, se induce la oxidación de las bases nitrogenadas (p.ej guanina \rightarrow 8-hidroxi-2'-guanosina), lo que eventualmente genera mutaciones puntuales del tipo G \rightarrow T o T \rightarrow G [Stiefel & Schwack. 2015]. Además, se altera la expresión genética de algunos genes supresores de tumores [Velasco *et al.* 2008; De Gálvez. 2010]. Asimismo, el estrés oxidativo produce la degradación de los elementos de la matriz extracelular, como el colágeno y la elastina, lo que genera la pérdida de elasticidad y firmeza de la piel, y lleva eventualmente al fotoenvejecimiento [Velasco *et al.* 2008; Sklar *et al.* 2013; Stiefel & Schwack. 2015].

La fotocarcinogénesis asociada a la luz UV-A y relacionada con el cáncer de piel de tipo melanoma, se debe principalmente a la inmunosupresión causada por la disminución del número y la pérdida de funcionalidad de las células de Langerhans, que impide la destrucción de las células dañadas, junto con la incapacidad de reparación de las posibles mutaciones generadas sobre otros tipos de células de la piel [Grether-Beck & Krutmann. 2009; Sklar *et al.* 2013; Stiefel & Schwack. 2015]. No obstante, la radiación **UV** no es la única capaz de generar especies reactivas, se ha encontrado recientemente que la radiación infrarroja cercana (**NIR**) y la luz visible también son capaces de propiciar el estrés oxidativo [Zastrow *et al.* 2009; Schroeder *et al.* 2008b].

Radiación Visible e Infrarroja Como se observa en la Figura 5-1 la radiación visible va desde 400 nm hasta 700 nm y la infrarroja es la región adyacente cuya longitud de onda es mayor a 700 nm. En dosis elevadas la luz visible también es capaz de originar eritema y otros efectos observados para la luz **UV**; como, por ejemplo, aumentar la pigmentación de la piel. Adicionalmente, se considera que la radiación visible puede ser la causante de cerca de la mitad de los radicales libres generados por la exposición a la luz solar [Zastrow *et al.* 2009]. No obstante, aún no se han elucidado los cromóforos implicados en la generación de dichas especies reactivas, aunque se ha considerado que la riboflavina, hemoglobina, bilirrubina, melanina o el β -caroteno podrían cumplir este rol [Lieber *et al.* 2012]. También causa efectos de foto-oxidación del ADN particularmente la región entre (410 y 490) nm, debido a especies reactivas de oxígeno que generan 8-oxo guanosina [Kolbe. 2012; Lieber *et al.* 2012].

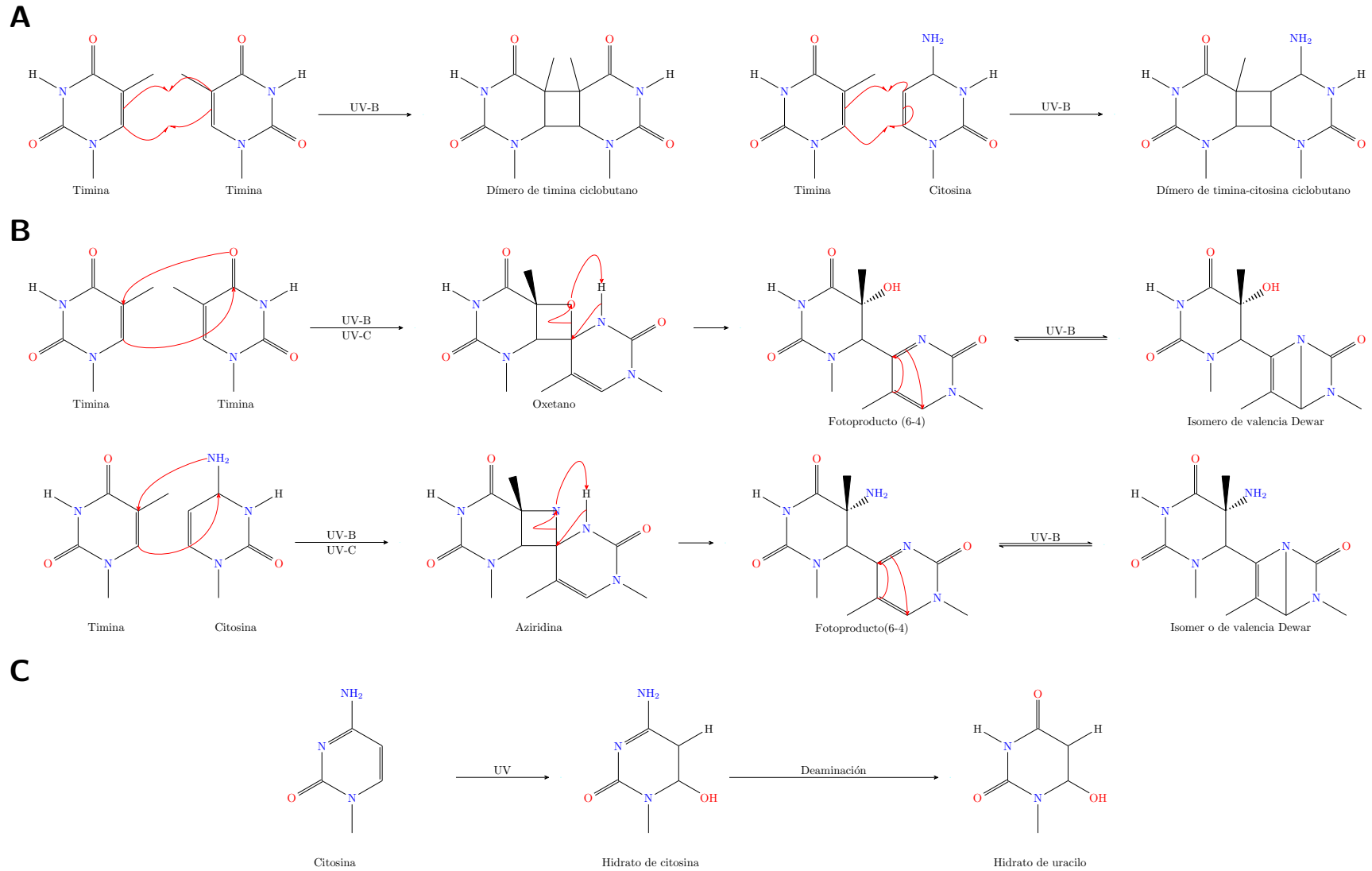


Figura 5-2: Modificaciones químicas sobre bases pirimidínicas del ADN. A. Cicloadición [2+2] para formar dímeros de ciclobutadipirimidina. B. Formación de aductos (6-4). C. Deaminación de la citosina. Adaptado de *Ravanat et al.* [2001] & *Kammeyer & Luiten* [2015]

Por su parte, la radiación infrarroja cercana o IR-A cuya longitud de onda oscila entre (700 y 1 400) nm ($14\ 000\ \text{cm}^{-1}$ - $7\ 000\ \text{cm}^{-1}$) es la más próxima al espectro visible. Contrario a los otros tipos de radiación solar que no son capaces de penetrar íntegramente en la piel, la luz IR-A es capaz de penetrar hasta las capas más profundas de la piel y el tejido subcutáneo (Figura 5-1) [Schieke *et al.*. 2003]. Algunos de sus efectos consisten en alterar la expresión proteica de algunos tipos de células presentes en la piel, activar la ruta del ácido araquidónico e inducir la expresión de la metaloproteinasas 1 (MMP-1) o colagenasa, enzima que degrada el colágeno de la matriz extracelular [Horton *et al.*. 2023].

La **UV** y la luz **IR** se relacionan con procesos de fotoenvejecimiento de la piel, aunque todavía no se ha elucidado por completo si existen efectos sinérgicos o antagónicos entre estas [Schroeder *et al.*. 2008a; Cho *et al.*. 2008]. La degradación de la matriz extracelular de la dermis es una de sus causas, dicho proceso es mediado por ciertas metaloproteinasas, tales como la MMP1, MMP-3, MMP9 y MMP12. A lo que se suma la disminución de la síntesis *de novo* de colágeno inducidos por la radiación **IR** y visible [Cho *et al.*. 2008 2009; Grether-Beck *et al.*. 2014]. Además, la radiación **IR** induce la angiogénesis de forma análoga a como sucede con la radiación **UV**, lo que lleva eventualmente a la extravasación del plasma y genera procesos locales de inflamación y estrés oxidativo [Cho *et al.*. 2009; Kim *et al.*. 2006]. El estrés oxidativo generado por la radiación infrarroja cercana (IR-A) y la luz visible se origina por el aumento súbito de especies reactivas, como el anión radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, lo que conduce al agotamiento de los mecanismos celulares endógenos de control del estrés oxidativo [Schroeder *et al.*. 2008b; Sondenheimer & Krutmann. 2018].

El aumento de especies reactivas ocurre en la cadena de transporte de electrones, específicamente en la citocromo oxidasa mitocondrial, cuyos máximos de absorción están en el rango de (400 a 800) nm. La absorción de la radiación provoca que esta proteína inicie la generación de especies reactivas [Schroeder *et al.*. 2008a; Karu. 2008]. Adicionalmente, se producen alteraciones en los potenciales de membrana mitocondriales y la liberación de calcio intracelular, que desencadenan la regulación retrograda de la expresión de ciertas proteínas, incluidas las metaloproteinasas de la matriz extracelular (**MMPs**) [Karu. 2008; Schroeder *et al.*. 2008b]. Se ha observado que tanto la radiación **UV** como la luz visible y el **NIR** comparten la señalización a través de quinasas MAP, aunque las vías de señalización celular difieren entre las dos regiones del espectro [Schieke *et al.*. 2002; Schroeder *et al.*. 2008b].

A pesar de que la radiación **IR** de onda larga no logra penetrar más allá de la epidermis, sí aumenta de forma significativa la temperatura de la piel, causa daños térmicos, eritema *ab igne* y genera cambios en la piel, como la queratosis térmica [Cho *et al.*. 2009; Diffey & Cadars. 2016; Horton *et al.*. 2023]. De otra parte, los fenómenos físicos de disipación de la radiación **UV** y visible generan luz **IR** (Ver Figura 5-6), ya sea mediante la emisión de radiación **NIR** o por la transferencia de energía en forma de calor. Se ha observado que la piel expuesta directamente al Sol puede alcanzar temperaturas mayores a 40 °C y que la exposición crónica y repetida a este calor excesivo puede generar efectos nocivos, como fotoenvejecimiento, carcinoma de células basales y elastosis [Schieke *et al.*. 2002; Cho *et al.*. 2009; Sklar *et al.*. 2013; Grether-Beck *et al.*. 2014].

5.2 El cáncer de piel en Colombia

A nivel mundial se reportan en promedio 160 000 nuevos casos de cáncer de piel (**CP**) [Sánchez *et al.* 2011]. Según el tipo celular que lo origina se divide en dos grandes grupos que representan el 95 % de los casos de **CP** a nivel mundial [Craythorne & Al-Niami. 2017]. El cáncer de piel de tipo melanoma (**CPTM**) se origina por la replicación incontrolada de las células que dan lugar a la pigmentación a la piel (melanocitos) [Craythorne & Al-Niami. 2017]. Y el cáncer de piel de tipo no melanoma (**CPTNM**) que se origina en otros tipos celulares presentes en la epidermis, como las células de la lámina basal o las células escamosas [Craythorne & Al-Niami. 2017]. Para el **CPTNM** el factor más importante son las mutaciones en el material genético originadas principalmente por fotorreacciones, como las mostradas en la Figura 5-2 [Samarasinghe & Madan. 2012].

En Colombia la incidencia del **CP** se ha duplicado desde 23 casos por cada 100 000 habitantes en el año 2003, hasta 41 casos por cada 100 000 habitantes en 2007 [Sánchez *et al.* 2011]. Para el año 2017, la incidencia había aumentado hasta alcanzar los 102 casos por cada 100 000 habitantes y se estimaba que para 2020 llegaría a 264 casos nuevos por cada 100 000 habitantes [Velazquez. 2020]. Según los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Cancerología, el **CP** es aproximadamente representó el 15 % del total de los casos nuevos de cáncer reportados entre 1996 y 2010 [Pozzobon *et al.* 2018]. El **CP** afecta predominantemente a las personas de raza blanca mayores de 40 años, quienes conforman el 91 % de los casos reportados a nivel nacional. Adicionalmente, se ha reportado que su incidencia es ligeramente mayor en hombres comparado con mujeres y es particularmente frecuente en los adultos mayores de 60 años [Sánchez *et al.* 2011; CAC. 2016; Pozzobon *et al.* 2018].

Una tendencia ascendente similar se ha observado para el melanoma cutáneo (**CPTM**) a nivel mundial, donde los casos se han triplicado o cuadruplicado desde los años 70 [Stiefel & Schwack. 2015]. Colombia en este sentido tampoco es una excepción, el melanoma cutáneo representó entre el 3 % y 5 % del total de casos nuevos de **CP** reportados [Pozzobon *et al.* 2018]. Aunque el **CPTM** tiene tratamiento, es responsable del 75 % de las muertes asociadas al cáncer de piel [Pozzobon *et al.* 2018]. Este tipo de cáncer tiene la particularidad de poder hacer metástasis en etapas tempranas y una vez esto sucede, su tasa de supervivencia es de solo el 5 % [Sánchez *et al.* 2011; Stiefel & Schwack. 2015]. Por otro lado, aunque el **CPTNM** presenta bajas tasas de mortalidad, implica un marcado impacto en la salud pública debido a que representa más del 80 % de los casos de **CP** reportados y genera elevados costos al sistema de salud, costos que se incrementan año tras año [Sánchez *et al.* 2011; Duarte *et al.* 2018; Velazquez. 2020].

La exposición crónica a la radiación **UV** puede dar lugar a varios tipos de lesiones precancerosas en la piel, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (**EROs**). Estas especies no solo regulan procesos celulares, sino que también pueden actuar como agentes citotóxicos o genotóxicos [Samarasinghe & Madan. 2012; Raad *et al.* 2017]. Algunas lesiones típicas asociadas a la exposición excesiva a la luz solar son: el aumento en la cantidad de melanocitos en áreas específicas de la piel, lo que resulta en el desarrollo de *Lentigo simplex*. También puede inducir la formación de lunares irregulares pigmentados que pueden sangrar o presentar alguna secreción (Melanoma *in situ*), o inclusive causar el aumento en el grosor del estrato córneo, conocido como queratosis actínica [Samarasinghe & Madan. 2012; Herrmann & Trinkkeller. 2015; Raad *et al.* 2017]. Este último tipo de lesión se considera como el antecedente inmediato del carcinoma de

células escamosas [Stiefel & Schwack. 2015; Thomas et al.. 2019].

La ubicación geográfica del país ejerce una significativa influencia en la alta incidencia de cáncer de piel. Las regiones intertropicales presentan los valores más altos de irradiación solar de todo el planeta, alcanzando su punto máximo durante las horas del mediodía [Sánchez et al.. 2011]. En Colombia, la radiación UV es relativamente constante durante el año, pero se intensifica notablemente en los meses de febrero, marzo, abril, septiembre y octubre. Durante estos meses, la región Andina y las principales ciudades experimentan valores de índice ultravioleta mayores a 11 [IDEAM - UPME. 2005; IDEAM. 2014]. Estas variaciones estacionales coinciden con el tránsito de la zona de confluencia intertropical (ZCIT) por el territorio nacional [IDEAM - UPME. 2005].

Cabe resaltar que por cada 1 000 m de elevación se produce un aumento de un 20 % en la irradiación de luz UV-B. Esto implica que a mayor altitud, la atmósfera realiza un filtrado menos efectivo de la radiación [Nybakken et al.. 2004]. Por tal motivo, se observa que los valores de índice ultravioleta son mayores a 6 durante todo el año, en especial para la región Andina que comprende los departamentos de Antioquia, Eje Cafetero, Nariño, Boyacá y Cundinamarca (Figura 5-3). En esta zona, el valor mínimo de este índice es 8 [IDEAM. 2014]. Esto significa que la exposición directa a la luz solar durante más de 15 min sin la protección adecuada puede resultar en una quemadura solar.

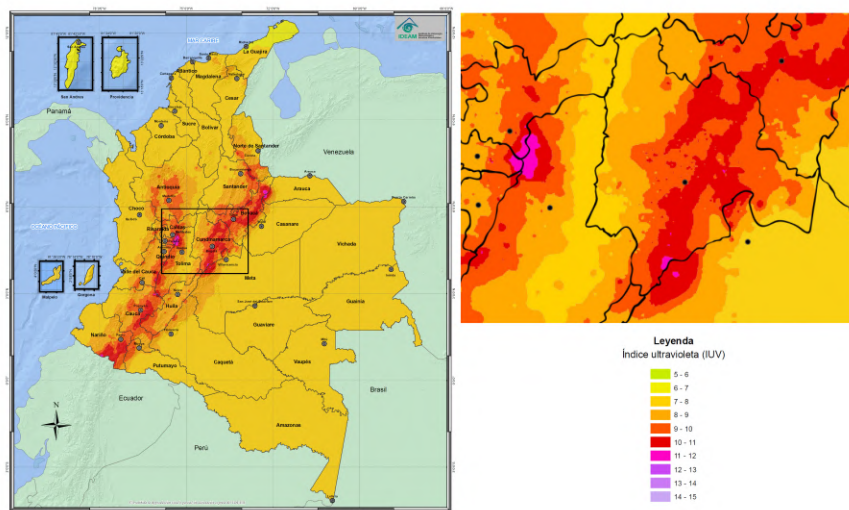


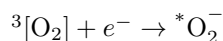
Figura 5-3: Mapa promedio interanual de radiación ultravioleta para Colombia y la zona del páramo de Sumapaz. Adaptado de IDEAM [2014]

Sánchez et al. [2011] & Pozzobon et al. [2018] mencionan que Bogotá DC, Antioquia, Cundinamarca, Boyacá, Valle, Santander y Nariño son los departamentos con mayor prevalencia, incidencia y mortalidad del CP y otras enfermedades de la piel asociadas a la luz solar en Colombia. Existen dos factores que explican esta tendencia. En primer lugar, estos departamentos se encuentran en la región Andina en zonas de montaña o de alta montaña y concentran más de un tercio de la población del país, incluidas varias de las ciudades más grandes. En segundo lugar, esta región posee un mayor número de centros médicos y de especialistas, comparado con otras regiones [Sánchez et al.. 2011; CAC. 2016].

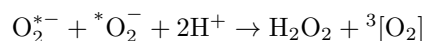
5.2.1 Antioxidantes como agentes preventivos del cáncer de piel

El oxígeno molecular (O_2) desempeña un papel esencial en los organismos aerobios al actuar como aceptor final de los electrones en el proceso de obtención de energía. En consecuencia, la mayor fuente endógena de producción de especies reactivas oxidantes es el metabolismo energético (Figura 5-4) [Sayre *et al.* 2008; İşıl Berker *et al.* 2010]. Además de su función vital, el oxígeno puede inducir reacciones secundarias de oxidación que potencialmente resultan nocivas para los organismos [Kranner & Birtic. 2005]. Las especies reactivas producto de estas reacciones secundarias, como los radicales hidroxilo, los hidroperóxidos lipídicos, entre otros, muestran mayor grado de reactividad y toxicidad en comparación con las especies reactivas de oxígeno (**EROs**) primarias, como el anión radical superóxido, el oxígeno singlete o el peróxido de hidrógeno [Pisoschi & Pop. 2015; Apak. 2019].

Para defenderse de las **EROs**, los organismos aerobios han desarrollado mecanismos y estrategias que les permiten en condiciones fisiológicas normales evitar o contrarrestar sus efectos nocivos [Pai *et al.* 2014], al punto que algunas de ellas resultan incluso ser esenciales en algunos procesos fisiológicos normales de los organismos [De Gálvez. 2010; Pai *et al.* 2014; Pisoschi & Pop. 2015].



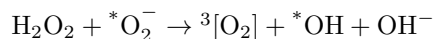
Formación de anión radical superóxido.



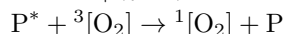
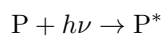
Dismutación del anión radical superóxido catalizada por la SOD.



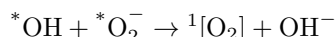
Formación de radical hidroxilo a partir de peróxido por oxidación de iones metálicos (Reacción de Fenton).



Formación de radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno y anión radical superóxido.



Formación actínica de oxígeno singlete con la intervención de un pigmento o cromóforo (P).



Formación radicalaria de oxígeno singlete.

Figura 5-4: Reacciones de formación de especies reactivas en el medio celular. Adaptado de Kranner & Birtic [2005]

Existen dos tipos principales de mecanismos para controlar la producción de **EROs** por parte del metabolismo energético y de los procesos fotosintéticos [Kranner & Birtic. 2005]. En primer lugar se encuentran los mecanismos **enzimáticos**, conformados por enzimas que degradan *in situ* a las especies reactivas, como por ejemplo la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa, oxidasas, entre otras, en conjunto con algunas sustancias endógenas como el glutatión, carotenoides, vitaminas C y E, etc [Molnár & Farkas. 2010; Kranner *et al.* 2005; Masaki. 2010; Carcho & Ferreira. 2013].

En segundo lugar, están los mecanismos **no enzimáticos**, constituidos por sustancias que reaccionan principalmente con las **EROs** secundarias, menos controlables mediante mecanismos enzimáticos [Carcho & Ferreira. 2013; Apak. 2019]. La reacción con las especies reactivas puede llevarse a cabo de forma directa (captación de radicales), también pueden actuar como terminadores de reacciones en cadena, lo que impide

la propagación de las reacciones radicalarias y la eventual acción de las especies reactivas sobre dianas intracelulares. De igual forma, pueden quelar metales libres en el medio celular que desencadenen la formación de especies reactivas o modular los mecanismos enzimáticos ya mencionados [Huang *et al.*. 2005; Luo *et al.*. 2006]. A aquellas sustancias que llevan a cabo una o varias de las anteriores reacciones se les denomina **antioxidantes**.

Los antioxidantes se caracterizan por actuar a bajas concentraciones respecto a un sustrato oxidable, retrasando y/o previniendo la oxidación de dicho sustrato [Antolovich *et al.*. 2002; Carocho & Ferreira. 2013; Apak. 2019]. Además, los antioxidantes tienen otras tres características: Inicialmente, si la sustancia es lo que se denomina un antioxidante suicida, éste debe impedir la formación *in situ* de especies reactivas, es decir evitar la oxidación primaria. Seguidamente, debe evitar la oxidación de otras moléculas. Por último, una vez reaccione debe quedar como especie inactiva evitando la propagación de la reacción [Huang *et al.*. 2005; Carocho & Ferreira. 2013; Pai *et al.*. 2014].

De otro lado, los antioxidantes tienen propiedades, la primera es la **capacidad antioxidante** que es una definición termodinámica, relacionada con la estequiometría y con la constante de equilibrio de la reacción entre el antioxidante y la especie reactiva; por tanto, es indicadora de la eficacia de la sustancia. Mientras que la segunda es la **actividad antioxidante**, que se define a partir de la velocidad de extinción de una especie reactiva al entrar en contacto con el antioxidante y se relaciona con la reactividad de la sustancia [Apak. 2019].

Antolovich *et al.* [2002] menciona que los compuestos con actividad antioxidante se pueden clasificar según su modo de acción en dos tipos: Antioxidante primario o terminador de reacción en cadena, que son los compuestos que reaccionan directamente con la especie reactiva o con las especies propagadoras de las reacciones radicalarias (Figura 5-5). Generalmente a través de un mecanismo de transferencia de hidrógeno (**MATH**) o mecanismo de transferencia electrónica acoplado a transferencia de protón (**TEAP**) que elimina la especie oxidante y genera un radical, el cual puede reaccionar con otra molécula oxidante [Masaki. 2010; Amorati *et al.*. 2016; Apak. 2019]. Mientras que un antioxidante secundario, es aquel compuesto que retrasa el proceso de oxidación; por ejemplo, al evitar la reacción de Fenton mediante la descomposición de peróxidos e hidroperóxidos, al quelar metales redox libres o débilmente coordinados, o al reducir (donar electrones - **MATe**) iones metálicos [Apak. 2019]. Las sustancias liquénicas por su naturaleza fenólica actúan principalmente como antioxidantes primarios, captando radicales libres (*scavengers*) [Masaki. 2010].

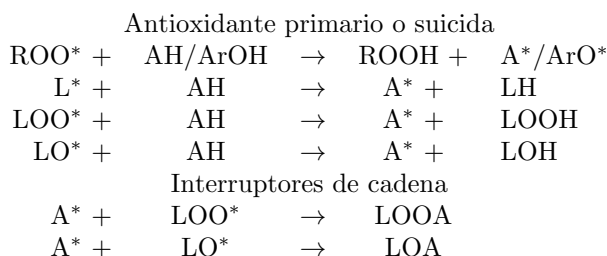


Figura 5-5: Algunos mecanismos de acción de los antioxidantes. ArOH representa los compuestos fenólicos, L representa lípidos. Adaptado de Antolovich *et al.* [2002]; Amorati *et al.* [2016]; Apak [2019]

Cuando la generación de especies reactivas desborda los mecanismos fisiológicos diseñados para contrarrestar

sus efectos nocivos, se habla de estrés oxidativo [Pai et al.. 2014; De Gálvez. 2010]. Como se detalló en la Sección 5.1 y en la Figura 5-4, todo el espectro de radiación electromagnética ($h\nu$) proveniente del Sol y no solo una parte del espectro, es capaz de producir especies reactivas que causan daños en la piel por un mecanismo oxidativo [Zastrow et al.. 2009]. Entre estas especies, los radicales libres son los más peligrosos, ya que poseen un electrón desapareado en su estructura, y al reaccionar generan disparidad electrónica en la molécula objetivo, originando reacciones en cadena radicalarias.

Las especies reactivas producidas varían en función de la longitud de onda de la radiación incidente. Por ejemplo, la radiación UV-B genera principalmente anión radical superóxido ($^{\bullet}\text{O}_2^-$) y radical hidroxilo ($^{\bullet}\text{OH}$), mientras que la radiación UV-A produce oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) utilizando cromóforos como la porfirina o la riboflavina [Lieber et al.. 2012]. El oxígeno singlete puede reaccionar con los lípidos de la parte externa de la piel para dar lugar a hidroperóxidos lipídicos [Masaki. 2010; Zastrow et al.. 2009; Lieber et al.. 2012]. En el caso de la radiación infrarroja cercana (**NIR**) se cree que se produce radical superóxido a nivel de las mitocondrias, óxido nítrico (NO) y radicales libres que agotan los niveles de carotenoides y otros antioxidantes endógenos existentes en la piel [Zastrow et al.. 2009].

El eritema característico de las quemaduras solares se debe a la síntesis de prostaglandina E2 (**PGE2**) inducida por óxido nítrico, que estimula procesos inflamatorios a nivel de la piel. De otro lado, los hidroperóxidos producidos por la oxidación de lípidos de la piel reaccionan para dar lugar a aldehídos que se unen a proteínas del estrato córneo [Masaki. 2010]. Estos productos de peroxidación lipídica también pueden agotar las moléculas antioxidantes endógenas y saturar los mecanismos enzimáticos contra las especies reactivas [Lieber et al.. 2012]. De igual modo, compuestos como el 7-dehidrocolesterol en las membranas celulares producen mayor oxidación lipídica y contribuyen a la disociación de los microdominios lipídicos (*rafts*) ante la exposición a la luz UV [Grether-Beck & Krutmann. 2009]. La destrucción de los *rafts* lleva a la liberación de calcio intracelular, el cual activa la liberación de fosfolipasa A2 y promueve la síntesis de **PGE2**, acentuando la respuesta del tejido [Grether-Beck & Krutmann. 2009].

Además, los *rafts* son un punto susceptible a la acción del oxígeno singlete generado por la luz UV-A, ya que no solo reaccionan con esta especie reactiva, también propagan la reacción y generan otras especies reactivas. Esto lleva a la disminución del colesterol y de esfingomielina de las membranas celulares, ésta última reacciona con las especies reactivas para dar lugar a la ceramida, lípido que está implicado en la regulación negativa de la expresión de genes como el ICAM-1. La exposición a la luz UV suprime la expresión de esta proteína, evitando que los linfocitos lleguen al sitio de la quemadura, lo que es una de las causas de la inmunosupresión [Grether-Beck & Krutmann. 2009]. La inmunosupresión tanto a nivel local, como sistémico impide que las células dañadas por la radiación hagan apoptosis, lo que lleva a que acumulen progresivos daños en su material genético y eventualmente desencadena la fotocarcinogénesis [Gonzalez & Gilaberte-Calzada. 2008; De Gálvez. 2010].

El metabolismo energético, en particular las mitocondrias, que son los organelos encargados de generar la energía de la célula, son sitios sensibles a todo el espectro de la radiación solar (**UV**, Visible e **IR**) [Krutmann & Schroeder. 2009]. En el caso de la radiación UV, sus efectos nocivos se deben a la capacidad de inducir mutaciones en el material genético propio de la mitocondria, lo que implica la producción de proteínas defectuosas en la cadena de transporte de electrones, que a su vez estimula la generación de especies reactivas y provoca el estrés oxidativo [Krutmann & Schroeder. 2009]. Por su parte, la radiación visible e **IR** ejerce su

efecto de manera más directa. Esto se debe a que la citocromo oxidasa C mitocondrial (Complejo IV) puede absorber radiación entre 400 nm y 1 400 nm. Dicho complejo posee en su sitio activo un átomo de cobre que actúa como grupo cromóforo. Las alteraciones de este sitio activo desencadenan la producción de anión radical superóxido en la cadena de transporte de electrones [Karu. 2008; Krutmann & Schroeder. 2009].

Pero el estrés oxidativo asociado a la luz **IR** no solo se vincula con los daños al metabolismo energético, también tienen relación con la reacción de la piel al aumento de la temperatura y su respuesta ante el choque térmico, en este caso se produce peróxido de hidrógeno y anión radical superóxido. Estas **EROs** llevan a daños oxidativos principalmente sobre el material genético [Cho et al.. 2009]. La acumulación de daños en el material genético; como, por ejemplo, en el gen regulador de la apoptosis de la proteína *p53* están implicados en la fotocarcinogénesis, especialmente en los **CPTNM** [Leftell & Brash. 1996; Gonzalez & Gilaberte-Calzada. 2008].

5.2.2 Protectores solares como agentes preventivos del **CP**

Lohezic-Le Devehat et al. [2013], Stiefel & Schwack [2015], Shanbhag et al. [2019] y Krutmann et al. [2021], entre otros autores, destacan que una de las estrategias más eficaces que existen en la actualidad para evitar las quemaduras solares, el fotoenvejecimiento, y en última instancia, el **CP**, consiste en el uso de cremas y otras formulaciones con sustancias que actúen como protectores solares. Estos productos minimizan los efectos nocivos de la exposición a la radiación solar. Las sustancias fotoprotectoras se dividen en dos categorías: Los protectores físicos, pantallas solares o filtros inorgánicos, que reflejan o dispersan la luz solar. Las sustancias más empleadas de esta categoría son el dióxido de titanio y el óxido de zinc. El segundo tipo son los protectores químicos o filtros solares orgánicos, que son sustancias que absorben longitudes de onda específicas del espectro **UV** (Tabla 5-2). En general, los productos cosméticos están constituidos por mezclas de sustancias de ambas categorías [Baran & Maibach. 2010; Schalka & Silva dos Reis. 2011; Stiefel & Schwack. 2015].

Los filtros orgánicos pueden absorber la radiación **UV** gracias a la presencia de grupos cromóforos en su estructura que les permiten absorber selectivamente diversas longitudes de onda. La absorción de la radiación en el **UV** y en la región visible está asociada a las transiciones electrónicas permitidas según la estructura química del compuesto, donde toman parte los electrones de orbitales π enlazantes o los electrones no enlazantes (n), que se encuentran en los cromóforos y cuyas transiciones los llevan a orbitales moleculares antienlazantes π^* o σ^* [Cockell & Knowland. 1999; Nguyen et al.. 2013]. Es necesario mencionar que los electrones de orbitales de mayor energía son los que con mayor probabilidad pueden sufrir estas transiciones, es decir aquellos ubicados en el HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) y donde el orbital destino constituye el LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) [Nguyen et al.. 2013].

La energía que es absorbida por estos compuestos puede ser disipada por dos tipos de mecanismos (Figura 5-6). El primero comprende procesos tales como fluorescencia, fosforescencia o a través de relajación vibracional, que normalmente se lleva a cabo con radiación que se encuentra en la región infrarroja cercana (**NIR**). Al conjunto de estos tres procesos se los denomina **disipación radiativa**. Otro mecanismo, es la transferencia de energía a otras moléculas por reacciones fotoquímicas (fotosensibilización), lo que constituye la **disipación**

no radiativa [Varol *et al.* 2015; Lohezic-Le Devehat *et al.* 2013]. Dentro de las reacciones fotoquímicas existen varias modificaciones estructurales que pueden ser reversibles, como los equilibrios *cis-trans* (Z-E) o la tautomería ceto-enol, aunque también la molécula puede descomponerse y/o originar especies reactivas, en este último caso se habla de **fotoinestabilidad** [Nguyen *et al.* 2013].

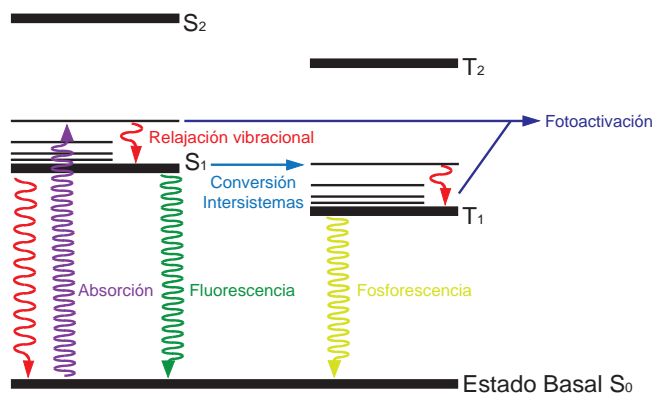


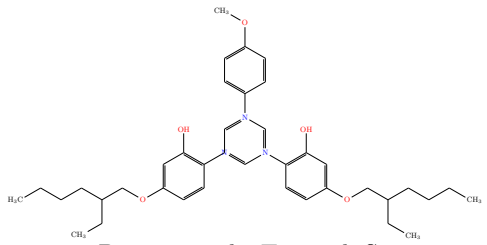
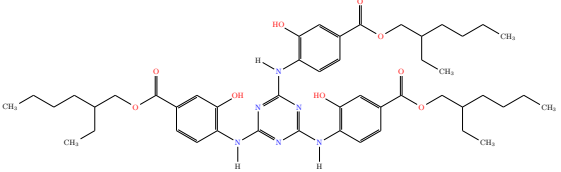
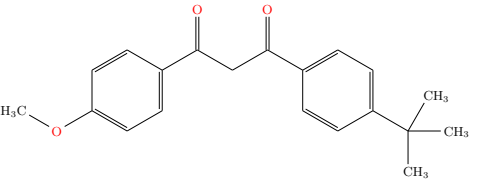
Figura 5-6: Diagrama de Jablonski de los fotoprocesos en moléculas y los mecanismos de disipación de la energía absorbida. Las letras S hacen referencia a estados electrónicos de espín apareado (singlete) y las letras T a estados de espín desapareado (triplete). Los procesos de fotoactivación corresponden a cambios químicos en la molécula producto de la absorción de la radiación solar. Adaptado de Bernath [2005]

Según menciona Cockell & Knowland [1999], los compuestos que presentan sistemas de electrones π conjugados presentan buena absorción de la radiación **UV**. Además, cuando el tamaño de la molécula aumenta, generalmente también lo hace su longitud de onda de absorción (λ_{\max}), lo que se denomina **efecto batocrómico**. Del mismo modo, sucede cuando aumenta la conjugación del sistema. Con respecto al grado de absorción, éste se mide con la absortividad molar o coeficiente de extinción molar (ϵ), el cual suele variar con el grado de sustitución de la molécula [Cockell & Knowland. 1999]. El patrón de sustitución también es un factor relevante, en particular en las moléculas que poseen anillos aromáticos [Nguyen *et al.* 2013].

Por su parte, los grupos cromóforos que presentan electrones no enlazantes (n) ejercen un efecto batocrómico, que depende del grado de conjugación de la molécula. Los compuestos insaturados no cíclicos presentan mayores coeficientes de extinción molar y por tanto una mayor capacidad de absorción de la luz **UV**, con respecto a los compuestos aromáticos, a pesar de que la absorción se lleva a cabo en la misma región del **UV**[Cockell & Knowland. 1999; Nguyen *et al.* 2013]. De otro lado, aquellos compuestos que sean capaces de formar tautómeros pueden contribuir tanto con la absorción **UV**, como con los efectos antioxidantes, esto sucede por ejemplo con los dibenzoilmetanos (sintéticos) [Nguyen *et al.* 2013].

Los compuestos con funciones fotoprotectoras actúan como mecanismo de protección pasiva en muchas clases de organismos, para el caso de los organismos fotosintéticos es muy relevante evitar los efectos deletéreos de la radiación **UV** y la fotoinhibición, dado que sus fotosistemas son los componentes más expuestos y sensibles [Cockell & Knowland. 1999]. Se ha observado que por cada 1 000 m de elevación aumenta un 20 % la irradiación con luz UV-B, esto constituye un factor de presión ambiental, en especial para los organismos que habitan ambientes de alta montaña, como por ejemplo los **HL** [Nybakken *et al.* 2004].

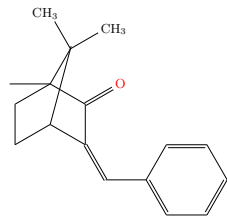
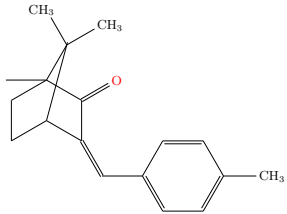
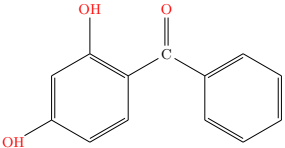
Tabla 5-2: Filtros solares comúnmente encontrados en productos cosméticos, su máxima concentración según el Parlamento Europeo [2009]^a, la FDA^b, MERCOSUR^c y algunos problemas asociados a su uso

Grupo de Compuestos	Estructura Nombre común / Nombre químico	Rango de Protección	Concentración Máxima (%)	Riesgos Reportados	
				Riesgo	Referencia
Triazinas	 <p>Bemotrizinol - Tinosorb S 2,4-bis[4-(2-etilhexiloxi)-2-hidroxifenil]-6-(4-metoxifenil)-1,3,5-triazina</p>	Amplio Espectro (UVA/UVB)	10 ^{a,c}	-	-
	 <p>Uvinul T150 - Etilhexiltriazona tris (benzoato de 4,4',4''-(2-etilhexil)-2,4,6-triiltriimino)-1,3,5-triazina</p>	UV-B	5 ^{a,b}	Alergia de contacto	Lodén et al. [2011]
Dibenzoilmetanos	 <p>Avobenzone 1-(4-ter-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)-propano-1,3-diona</p>	UV-A	5 ^a 3 ^b	Alergias de contacto, fotoalergeno, fotoinsensible, fototoxicidad	Lodén et al. [2011]; Gilbert et al. [2013]; Heurung et al. [2014]

^a Según Parlamento Europeo [2009]. ^b Según la FDA [Gilbert et al., 2013]. ^c Según Stiefel & Schwack [2015]

Continúa en la página siguiente

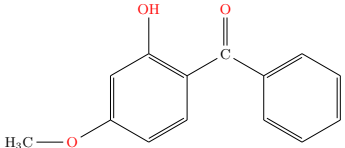
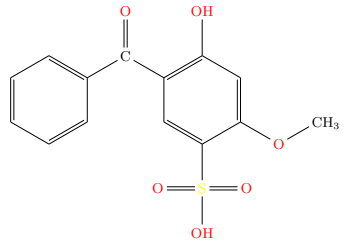
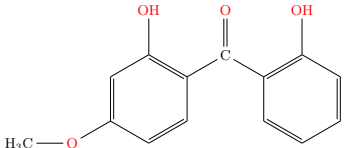
Tabla 5-2- Continúa de la página anterior

Grupo de Compuestos	Estructura Nombre común / Nombre químico	Rango de Protección	Concentración Máxima (%)	Riesgos Reportados	
				Riesgo	Referencia
Derivados del alcanfor	 <p>3-BC (3-bencilidencanfor) 1,7,7-trimetil-3-(fenilmetileno)biciclo[2.2.1]heptan-2-ona</p>	UV-B	2 ^{a,c}	Alergia de contacto, fotoalergeno, disruptor endocrino	<i>Lodén et al.</i> [2011]; <i>Gilbert et al.</i> [2013]; <i>Wang et al.</i> [2016]
	 <p>4-MBC - Enzacameno (4-metilbencilidencanfor) 1,7,7-trimetil-3-[(4-metilfenil)metileno]-biciclo[2.2.1]heptan-2-ona</p>	UV-B	4 ^{a,b,c}	Alergias de contacto, fotoalergias, disruptor endocrino	<i>Lodén et al.</i> [2011]; <i>Heurung et al.</i> [2014]; <i>Wang et al.</i> [2016]
Benzofenonas	 <p>Benzofenona 1 (BP-1) 2,4-dihidroxibenzofenona</p>	UV-B y UV-A 2	10 ^a	Efecto estrogénico, bioacumulación en peces y bivalvos	<i>Schlumpf et al.</i> [2004]; <i>Huang et al.</i> [2021]

^a Según Parlamento Europeo [2009]. ^b Según la FDA [*Gilbert et al.* 2013]. ^c Según *Stiefel & Schwack* [2015]

Continúa en la página siguiente

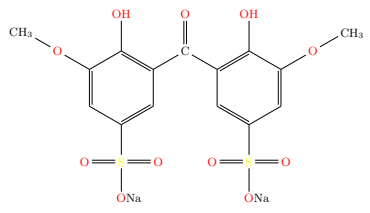
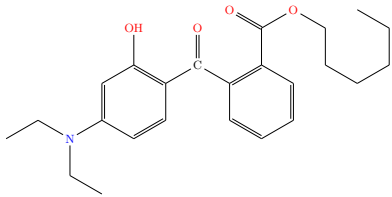
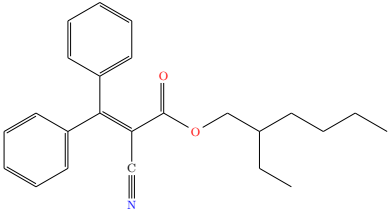
Tabla 5-2- Continúa de la página anterior

Grupo de Compuestos	Estructura Nombre común / Nombre químico	Rango de Protección	Concentración Máxima (%)	Riesgos Reportados	
				Riesgo	Referencia
	biciclo[2.2.1]heptan-2-ona				
Benzofenonas	 <p>Benzofenona 3 (BP-3) - Oxibenzona 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona</p>	UV-B y UV-A 2	10 ^a 6 ^b	Efecto estrogénico y antiandrogénico, afecta el desarrollo en invertebrados. Dermatitis de contacto.	<i>Schlumpf et al.</i> [2004]; <i>Ozáez et al.</i> [2014]; <i>Heurung et al.</i> [2014]
	 <p>Benzofenona 4 (BP-4) - Sulisobenzona Ácido 5-Benzoil-4-hidroxi-2-metoxibenzen-1-sulfónico</p>	UV-B y UV-A	5 ^a	Efecto estrogénico. Fotoalergias y dermatitis de contacto.	<i>Schlumpf et al.</i> [2004]; <i>Heurung et al.</i> [2014]
	 <p>Benzofenona 8 (BP-8) - Dioxibenzona 2,2'-dihidroxi-4-metoxibenzofenona</p>	UV-B y UV-A	10 ^a	Presenta bioacumulación en bivalvos, corales y peces. Fotoalergias.	<i>Heurung et al.</i> [2014]; <i>Huang et al.</i> [2021]

^a Según Parlamento Europeo [2009]. ^b Según la FDA [Gilbert et al., 2013]. ^c Según Stiefel & Schwack [2015]

Continúa en la página siguiente

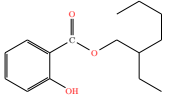
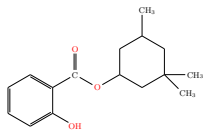
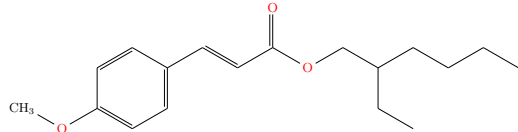
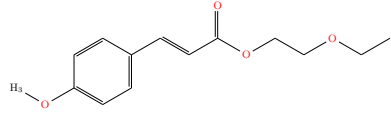
Tabla 5-2- Continúa de la página anterior

Grupo de Compuestos	Estructura Nombre común / Nombre químico	Rango de Protección	Concentración Máxima (%)	Riesgos Reportados	
				Riesgo	Referencia
Benzofenonas	 <p>Benzofenona 9 (BP-9) 2,2'-dihidroxi-4,4'-dimetoxibenzofenona-5,5'-disulfonato de sodio</p>	UV-B y UV-A	10 ^a	-	-
	 <p>Uvinul A - Dietilamino hidroxibenzoil hexilbenzoato Benzoato de 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil]hexilo</p>	UV-A	10 ^a	Alergia de contacto y fotoalergias	<i>Heurung et al.</i> [2014]
Derivados de Benzofenonas	 <p>Octocrileno 2-ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etilhexilo</p>	UV-B	10 ^{a,b,c}	Alergia de contacto, fotoalergeno, disruptor endocrino	<i>Lodén et al.</i> [2011]; <i>Gilbert et al.</i> [2013]; <i>Heurung et al.</i> [2014]; <i>Wang et al.</i> [2016]

^a Según Parlamento Europeo [2009]. ^b Según la FDA [*Gilbert et al.*, 2013]. ^c Según *Stiefel & Schwack* [2015]

Continúa en la página siguiente

Tabla 5-2- Continúa de la página anterior

Grupo de Compuestos	Estructura Nombre común / Nombre químico	Rango de Protección	Concentración Máxima (%)	Riesgos Reportados	
				Riesgo	Referencia
Salicilatos	 <p>Salicilato de octilo 2-hidroxibenzoato de 2-etilhexilo</p>	UV-B	5 ^{a,b}	-	-
	 <p>Homosalato Salicilato de 3,3,5-trimetilciclohexilo</p>	UV-B	5 ^a 15 ^b	Alergias	<i>Lodén et al.</i> [2011]; <i>Heurung et al.</i> [2014]
Cinamatos	 <p>Metoxicinamato de octilo - Uvinul MC80 Etilhexilmetoxicinamato - Octinoxato 3-(4-metoxifenil)-(2E)-propenoato de (RS)-2-etilhexilo</p>	UV-B	10 ^{a,c} 7,5 ^b	Tóxico y bioacumulable en organismos marinos (bivalvos, peces y crustáceos), antiandrogénico, antitiroideo. Dermatitis de contacto, fotoalergenicidad. Disruptor endocrino	<i>Heurung et al.</i> [2014]; <i>Wang et al.</i> [2016]; <i>Watanabe et al.</i> [2018]; <i>Lorigo et al.</i> [2018]; <i>Huang et al.</i> [2021]
	 <p>Cinoxato - 2-etoxietil-<i>p</i>-metoxicinamato 3-(4-metoxifenil)-(2E)-propenoato de 2-etoxietilo</p>	UV-B	3 ^{b,c}	Bioacumulación en corales	<i>Huang et al.</i> [2021]

^a Según *Parlamento Europeo* [2009]. ^b Según la FDA [*Gilbert et al.*, 2013]. ^c Según *Stiefel & Schwack* [2015]

La presencia de cromóforos, como los anillos aromáticos, grupos carbonilo e hidroxilo en estos compuestos, no solo resulta en absorciones en la región **UV**, sino que también pueden generar absorciones debidas a sobretonos o combinaciones de modos vibracionales en el **NIR**. Por ejemplo, las absorciones de los sobretonos vibracionales de los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos están entre (1 000 - 1 400) nm [Siesler *et al.*. 2001]. La absorción de radiación de la región **IR** no solo contribuye a prevenir daños causados por la radiación incidente o de aquella liberada en los procesos de dispersión radiativa, sino que también impide la generación de daños en la piel, como la producción de especies reactivas en los centros metálicos (como los grupos *hemo* y átomos de cobre) de las proteínas mitocondriales, o la formación de 8-oxo-2'-deoxiguanosina en el material genético [Cho *et al.*. 2009]. Además, la radiación **IR**, al estimular las metaloproteinasas, desempeña un papel en la invasión tumoral y la metástasis del **CP** [Schroeder *et al.*. 2008a].

5.3 Hongos liquenizados

La palabra liquen ($\Lambda\epsilon\iota\chi\eta\nu$) se origina aproximadamente 300 años antes de Cristo, cuando el filósofo natural Teofrasto (371 – 286 aC) denominó de esta forma a las excrecencias de la corteza del árbol de olivo [Masuch. 1993; Crawford. 2015]. Posteriormente, el botánico francés **de Tournefort** usó este nombre para distinguirlos de los musgos. Sin embargo, fue el botánico sueco **Acharius**, considerado como el padre de la liquenología moderna, quien estudió sistemáticamente estos organismos y los clasificó de acuerdo con la morfología del talo y sus características microscópicas [Masuch. 1993].

A pesar de la similitud de estos organismos con los hongos, fue durante el siglo XIX cuando el botánico suizo **Simon Schwendener** descubrió que eran “organismos duales”, al notar la presencia de algas dentro de los talos [Muggia *et al.*. 2009]. Posteriormente, **De Bary** en 1879 acuñó el término **simbiosis** para el crecimiento conjunto de 2 tipos distintos de organismos, luego de estudiar algunas especies de líquenes u **hongos liquenizados (HL)**. No obstante, su naturaleza dual fue algo que tardó bastante tiempo en aceptarse [Muggia *et al.*. 2009]. A causa de lo anterior, inicialmente se propuso que alguno de los organismos estaba parasitando o esclavizando al otro [Masuch. 1993; Nash III. 2010].

Sin embargo, **Smith** al comenzar a elucidar el transporte de los hidratos de carbono dentro del talo liquénico, encontró que éste se lleva a cabo en una sola dirección, desde el alga hacia el hongo, a través de polioles derivados de azúcares o glucosa [Masuch. 1993]. Lo que permitió postular la definición moderna de **HL**, que considera a estos organismos como una asociación entre un hongo (**micobionte**) y un simbionte fotosintético (**fotobionte**) que conforman una estructura duradera y específica [Masuch. 1993]. Recientemente se ha encontrado evidencia de que además del micobionte y del fotobionte existe una levadura que posiblemente actúa como mediador en el proceso simbiótico [Pennisi, E. 2016]. Debido a las interacciones entre los biontes de la asociación y entre el **HL** con otros organismos algunos autores consideran a los líquenes no solo un organismo simbiótico, sino como metaorganismos (holobionte) o como ecosistemas en si mismos [Molnár & Farkas. 2010; Cernava *et al.*. 2019]. Solamente un número limitado de hongos son capaces de formar **HL**, se estima que es aproximadamente la quinta parte del total de especies [Muggia *et al.*. 2009]. El 98% de los **HL** tienen como micobionte un hongo ascomiceto, de hecho aproximadamente la mitad de las especies de ascomicetos pueden formar **HL**. El 2% restante de los **HL** forma la asociación principalmente

con basidiomicetos, aunque también puede formarla con otros tipos de hongos, tales como deuteromicetos, mastigomicetos o mixomicetos [Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002; Oksanen. 2006; Nash III. 2010; Molnár & Farkas. 2010; Zambare & Christopher. 2012; Calcott et al.. 2018].

Como se trata de la asociación de al menos dos organismos diferentes, que provienen de diferentes taxones, los líquenes no pueden considerarse como un grupo natural. Además, la liquenización puede ser definida de dos formas: Como un proceso ecofisiológico implementado por los fotobiontes para permitir su dispersión, colonización y supervivencia en ambientes extremos, donde los biontes aislados son incapaces de sobrevivir; y como un modo o estrategia de vida de los micobiontes, que permite aumentar la eficiencia reproductiva de los organismos que conforman la asociación [Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002; Kranner et al.. 2005; McEvoy et al.. 2006; Muggia et al.. 2009; Nash III. 2010]. Por los motivos antes expuestos, se considera obsoleto actualmente el término **líquenes** y se prefiere usar **hongos liquenizados (HL)** para referirse a estos organismos [Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002; Oksanen. 2006].

Esta estrategia es tan exitosa que le permitió a los **HL** habitar en prácticamente todos los ambientes terrestres, desde el trópico a los polos y desde el nivel del mar hasta zonas de alta montaña; e inclusive soportar las condiciones del espacio exterior [Raggio et al.. 2011]. En ambientes tales como los polos o los ecosistemas de alta montaña, los **HL** son una de las formas de vida predominantes. Además, estos ambientes no suelen tener alta complejidad, por lo que los **HL** también son considerados organismos pioneros en el proceso de sucesión ecológica [Zambare & Christopher. 2012; Boustie et al.. 2011; Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002; Molnár & Farkas. 2010].

Para sobrevivir en estas condiciones adversas, muchas especies de **HL** desarrollan diversas estrategias. Algunos ejemplos son el engrosamiento del talo o formación de un tomento, que se hace más grueso en función del grado de irradiación [Notov. 2014]. Adicionalmente, al ser organismos poiquilohídricos, los **HL** pueden variar su contenido de agua según la disponibilidad hídrica del entorno [Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002; Nash III. 2010]. Esto implica un metabolismo adaptado a ciclos de hidratación y deshidratación, capaz de soportar estas variaciones de forma repetida sin que se produzcan daños importantes en sus membranas y mecanismos enzimáticos. Como resultado, el metabolismo de estos organismos puede volverse lento e incluso latente por momentos [Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002].

Otro mecanismo de protección es la biosíntesis de metabolitos secundarios, los cuales tienen un rol ecológico ante diversos factores ambientales, tales como los ciclos hidratación - desecación, la alta irradiación solar, prevenir la herbivoría, controlar el crecimiento de otros organismos competidores, etc [Hüneck. 1999; Gómez Serranillos et al.. 2014]. Muchas de estas sustancias son exclusivas de los **HL** y se trata principalmente de compuestos fenólicos, aunque también hay otras sustancias como antraquinonas, terpenos, etc (Sección 5.3.2).

5.3.1 Usos tradicionales de los **HL**

Los **HL** han sido empleados por el ser humano desde la antigüedad, destacándose el género *Usnea* por sus usos culturales y medicinales [Crawford. 2015]. Así como otros taxones de la familia *Parmeliaceae*, como *Evernia prunastri*, *Parmelia sulcata*, *Cetraria islandica*, *Alectoria* sp, entre otros [Gómez Serranillos et al..

2014; *Crawford*. 2015]. No obstante, los reportes a nivel mundial indican una tendencia de preferencia en el uso tradicional de los **HL** hacia las zonas templadas y polares en comparación con las regiones tropicales. Esta disparidad posiblemente se debe a la prevalencia ecológica de los **HL** en estas zonas [*Crawford*. 2015].

Los **HL** han sido utilizados tradicionalmente por diversas culturas, ya sea como fuente de alimento, bebida, medicinas, colorantes, etc. Dentro de los usos medicinales se han reportado su uso para la curación de heridas, tratamiento de problemas cutáneos, digestivos, ginecológicos u obstétricos; así como de trastornos renales, cardiovasculares y algunas infecciones [*Vinayaka et al.*. 2009; *Mitrović et al.*. 2011; *Crawford*. 2015]. El uso más antiguo de un **HL** se documentó en China durante los siglos XVIII y XVII antes de Cristo, como remedio [*Malhotra et al.*. 2007]. Su uso alimenticio es posterior, por ejemplo, *Thamnolia vermicularis* y *Thamnolia subuliformis* son utilizadas como bebidas (té) en muchas regiones de la China, *Lecanora esculenta* es el maná bíblico y *Cetraria islandica* se consumía habitualmente en Europa [*Wang et al.*. 2001; *Boustie & Grube*. 2005; *Luo et al.*. 2006; *Mitrović et al.*. 2011; *Crawford*. 2015]. En la actualidad, algunas especies de *Lobaria* y de *Ramalina* se usan en la preparación de alimentos y se consumen en ciertas zonas de China [*Wang et al.*. 2001].

5.3.2 Metabolitos secundarios de **HL**

Los metabolitos secundarios de los **HL** presentan una considerable diversidad química, con más de 1 000 compuestos identificados hasta la fecha [*Mitrović et al.*. 2011; *Gómez Serranillos et al.*. 2014; *Ureña-Vacas et al.*. 2022]. Entre estos compuestos se encuentran ácidos fenólicos débiles, ácidos grasos, terpenos, entre otros [*Masuch*. 1993]. Los metabolitos secundarios más destacados de los **HL** son las sustancias fenólicas con peso molecular inferior a 500 g/mol. Estas sustancias a menudo se encuentran depositadas en la superficie de las paredes celulares de las hifas corticales y medulares, y su biosíntesis puede llevarse a cabo en respuesta a algunos factores ambientales [*Ozenda et al.*. 1970; *Molnár & Farkas*. 2010; *Stocker-Wörgötter et al.*. 2013].

La biosíntesis de las sustancias liquénicas recae principalmente en el micobionte y sigue cuatro rutas principales (Figura 5-7) [*Mosbach*. 1969; *Hüneck*. 1999; *Nash III*. 2010]. La diversidad de rutas biosintéticas contribuye a la amplia diversidad de sustancias liquénicas existente [*Gómez Serranillos et al.*. 2014]. Estas sustancias representan entre el 0,15% y el 30% de peso seco de los **HL** y suelen ser poco solubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos como etanol o acetona [*Ozenda et al.*. 1970; *Hüneck*. 1973; *Masuch*. 1993; *Chaparro de Valencia & Aguirre*. 2002; *Nash III*. 2010].

La mayoría de las sustancias liquénicas presentan reacción ácida y son sólidos con puntos de fusión que normalmente oscilan entre 125 °C y 250 °C. Esto llevó a que su denominación inicial fuera **ácidos liquénicos** [*Ozenda et al.*. 1970]. No obstante, debido a la diversidad química que presentan y al hecho de que muchas de estas sustancias son exclusivas de los **HL**, se prefiere referirse a estas como **sustancias liquénicas sensu stricto** [*Mosbach*. 1969; *Ozenda et al.*. 1970; *Hüneck*. 1999].

En los **HL**, los compuestos se dividen en varias categorías. En primer lugar, encontramos los productos del metabolismo primario, como polioles, carbohidratos y polisacáridos, que son comunes tanto al fotobionte, como al micobionte [*Hüneck*. 1973]. En segundo lugar, se hallan la mayoría de las sustancias liquénicas, que derivan de la ruta de los policétidos o ruta del acetato-polimalonato. Estas incluyen ácidos grasos, algunas

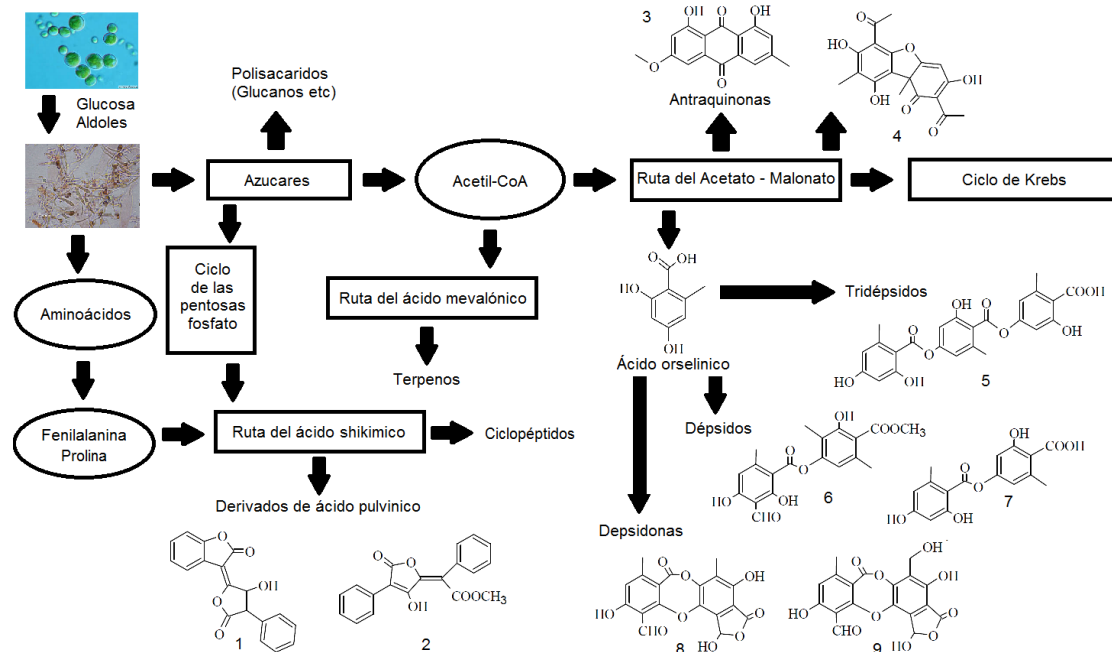


Figura 5-7: Origen biosintético de los metabolitos secundarios de los hongos liquenizados. 1. calicina; 2. ácido vulpínico; 3. Parietina; 4. ácido úsnico; 5. ácido girofórico; 6. atranorina; 7. ácido lecanórico; 8. ácido norestictico; 9. ácido salazínico. Adaptado de Hüneck [1999] & Nash III [2010].

lactonas, dépsidos, depsidonas, depsonas, dibenzoquinonas, cromonas, xantonas y antraquinonas [Ozenda et al., 1970; Muggia et al., 2009; Thadhani et al., 2011]. En tercer lugar, se encuentran los compuestos fúngicos provenientes de la ruta del ácido shikímico, como el ácido pulvínico, los ciclopéptidos, las dicetopiperazinas, las terpenilquinonas, entre otros. Por último, tenemos los derivados del ácido mevalónico, como terpenos, esteroides, carotenoides, entre otros [Ozenda et al., 1970].

5.3.3 Actividad antioxidante y fotoprotectora de las sustancias liquénicas

Los **HL** han sido sometidos a diversos estudios que han mostrado una amplia variedad de actividades biológicas. Algunos extractos de **HL** han presentado actividades antimicrobianas, citotóxicas, antineoplásicas, fotoprotectoras, neuroprotectoras, hepatoprotectoras, entre otras [Luo et al., 2006; Molnár & Farkas, 2010; Thadhani et al., 2011; Kosanić et al., 2011; Lohezic-Le Devehat et al., 2013; Shrestha & St. Clair, 2013; Perico Franco et al., 2015a; Fernández-Moriano et al., 2016]. Algunos metabolitos secundarios de **HL**; como, por ejemplo, ciertas antraquinonas se usan en terapia fotodinámica como fotosensibilizadores [Nguyen et al., 2013]. Adicionalmente, existen en la actualidad varios productos comerciales con sustancias liquénicas, como el ácido úsnico, que se emplea como antiséptico por vía tópica, en *after-shaves* y otros productos cosméticos o la 1-cloropananarina que se ha utilizado para tratar la leishmaniasis cutánea [Rancan et al., 2002].

Dentro de las diversas actividades biológicas atribuidas a los metabolitos secundarios de los **HL**, se destaca la actividad antioxidante. Los extractos acetónicos o metanólicos suelen exhibir mayor actividad, comparados con aquellos obtenidos en agua o en otros disolventes orgánicos (Tabla 5-3) [Bhattarai et al., 2008; Molnár & Farkas, 2010; Kosanić et al., 2011]. Como se mencionó en la Sección 5.1, los principales efectos de la

radiación **UV** incluyen las reacciones fotoinducidas sobre algunas de las bases nitrogenadas del ADN y el estrés oxidativo posterior a la exposición. En relación con este último punto, la existencia de metabolitos secundarios que se acoplen o capten estas especies reactivas representa una respuesta importante para reducir el daño causado por esta radiación [Cockell & Knowland. 1999].

Algunos de los compuestos de **HL** que han reportado actividad antioxidante son dépsidos como la atranorina, el ácido divaricático o depsidonas como la panarina o la esferoforina. Estas sustancias pueden actuar por sí mismas o mediante la inducción de los sistemas enzimáticos endógenos [Jayaprakasha & Jaganmohan Rao. 2000; Molnár & Farkas. 2010]. Las sustancias más comúnmente encontradas y reportadas en **HL** son la atranorina y el ácido úsnico, estas sustancias presentan actividad captadora del radical **DPPH**, inhiben la peroxidación lipídica y tienen poder reductor férrico, lo que puede ser empleado en el proceso de reparación de la piel y curación de heridas [White et al.. 2014]. No obstante, en algunos ensayos y bajo ciertas condiciones pueden actuar como pro-oxidantes [White et al.. 2014; Apak. 2019].

Las sustancias liquénicas que tienen actividad antioxidante por lo general comparten la presencia de grupos hidroxilo fenólicos en sus estructuras [Fernández-Moriano et al.. 2016]. White et al. [2014] al revisar diversos estudios de actividad antioxidante sobre las sustancias liquénicas más comunes identificó que esta actividad suele ser mayor en los compuestos monoaromáticos. A continuación se encuentran los dépsidos y por último con menor actividad captadora de radicales y otros tipos de actividad antioxidante están las depsidonas. Esto concuerda con lo mencionado por Thadhani et al. [2011] que afirma que los compuestos fenólicos que tienen un solo anillo aromático son más activos captando radicales libres, con respecto a compuestos de mayor tamaño molecular.

Con respecto al patrón de sustitución, los compuestos más activos como antioxidantes para ensayos de **MATe** son aquellos cuyos anillos tienen patrón de sustitución *orto* o *para*, comparados con el patrón de sustitución en *meta*. Sin embargo, para ensayos como la actividad captadora de radicales en modelos como el **DPPH** donde hay transferencia de protones (**MATH**) el patrón más activo es el *meta* disustituido respecto de las otras dos opciones [Thadhani et al.. 2011; White et al.. 2014]. De otro lado, los anillos que presentan al menos dos grupos hidroxilo y con estructura similar al β -orcinol suelen ser más activos que los que los anillos derivados del orcinol [Perico Franco et al.. 2015a].

Con respecto a la actividad fotoprotectora algunas sustancias liquénicas, como el ácido úsnico, el ácido vulpínico o la parietina regulan la luz que incide sobre los fotobiontes, mediante la absorción de ciertas longitudes de onda, protegiéndolos de la irradiación excesiva. Estas sustancias también pueden presentar fluorescencia o emitir radiación infrarroja lo que hace que la radiación que emiten sea de mayor longitud de onda y de menor energía, con respecto a la radiación que incide sobre ellas [Molnár & Farkas. 2010; Nguyen et al.. 2013]. Muchas sustancias liquénicas presentan intensas absorciones en el **UV** (Tabla 5-4), particularmente en la región UV-B, debido a que en el medio ambiente natural esta luz no solo causa daños en el material genético del **HL**, sino que también inhibe la fotosíntesis [Solhaug & Gauslaa. 1996; Molnár & Farkas. 2010]. Por estas razones, es posible sugerir a los **HL** como fuentes de productos naturales que puedan ser utilizados como sustancias protectoras ante la radiación **UV** [Rojas et al.. 2015; Perico Franco et al.. 2015a].

Tabla 5-3: Actividad antioxidante de extractos y metabolitos secundarios de hongos liquenizados

Especie	Extracto o Sustancia Liquénica		Ambiente y Hábito	Propiedad Antioxidante			Referencia
				Poder captador de radicales libres (SOS, NORS HPS, DPPH)	Inhibición de la peroxidación de Lípidos	Poder reductor o Actividad Quelante (PR - AQ)	
<i>Parmotrema stuppeum</i>	Benceno	Orselinato de metilo	NR		++ (500 µg/L)		<i>Jayaprakasha & Jaganmohan Rao</i> [2000]
	y Acetona	ácido orselinico			+ (500 µg/L) Modelo: β-caroteno		
<i>Lethariella canariensis</i>	Metanol	Hematomato de Metilo y Etilo	Alta Montaña - NR		1 nmol/mg Prot (250 µM)		<i>Toledo Marante et al.</i> [2003]
		Atranorina Cloroatranol, ácido hematomico			2 nmol/mg Prot (150 µM) Modelo: Cerebro homogenizado		
<i>Thamnotia vermicularis</i>	Metanol	Ácido Thamnoico	Alta Montaña - Terricola	DPPH: 72 % (2 mg/mL) +++ SOS: 20 % (0,2 - 2,0 mg/mL)	67 % Inhibición (2 mg/mL) +	PR: +	<i>Luo et al.</i> [2006]
<i>Usnea articulata</i>	Metanol	Compuesto 1	Montaña - Epifito	DPPH: 30 % (3 mM) +	Modelo: Ácido linoleico		<i>Lohezic-Le Devehat et al.</i> [2007]
		Acido fumarprotocetrarico		DPPH: 20 % (3 mM) +			
		Acido norestictico		SOS: IC ₅₀ : 580 µM +++			
<i>Umbilicaria antarctica</i>	Acetona	ND	Polar - NR	SOS: 90 % Inhibición +++	90 % +++	PR: +	<i>Luo et al.</i> [2009]
<i>Cladonia furcata</i>	Metanol	Ácido lecanorico			95 % +++		
	Metanol				92 % +++		
<i>Usnea antarctica</i>	Acetona	ND			95 % +++		
	Metanol				88 % +++		
	Acetona				77 % +++		
<i>Ramalina conduplicans</i>	Metanol	Ácido sekikaico, taninos y esteroides		DPPH: 72,63 % ++		PR: ++	
<i>Ramalina conduplicans</i>	Metanol	Ácido sekikaico	Alta montaña - NR	DPPH: 55,8 % (330 µg/L) +	85,2 % Inhibición (2 mg/mL) +++ Modelo: Ácido linoleico	PR: +	<i>Luo et al.</i> [2010]
<i>Lecanora atra</i>	Acetona	ND	Alta Montaña - NR	DPPH: 94,7 % (330 µg/mL) +++ SOS: 84,5 % (45 µg/mL) ++		PR: +	<i>Ranković et al.</i> [2011]
<i>Everniastrum cirrhatum</i>	Metanol	Atranorina	Montaña - Epifito	DPPH: EC ₅₀ : 6,73 µg/L ++		AQ IC ₅₀ : 29,28 µg/L ++	<i>Kekuda et al.</i> [2011]
		Ácido protoliqueterico					
<i>Lasalia pustulata</i>	Metanol	ND	Alta Montaña - NR	DPPH: 91 % Captación SOS: ++			<i>Kosanić et al.</i> [2011]
	Acetona			SOS: ++		PR: ++	
<i>Lecanora atra</i>	Acetona	ND	Alta Montaña - NR	DPPH: 94 % Inhibición +++ SOS: 84 % +++		PR: +++	<i>Kosanić & Ranković</i> [2011]
	Metanol			DPPH: 93 % Inhibición +++			
<i>Pseudoevernia furfuraceae</i>	Acetona			DPPH: 87 % Inhibición +++		PR: ++	
<i>Lobaria pulmonaria</i>	Acetona	Isidioforina y Rizonaldehido	Costero - NR	DPPH: 75 % +++	++		<i>Atalay et al.</i> [2011]
<i>Usnea longissima</i>	Acetona	Acido usnico y difractaico			+++ Modelo: Liposoma de lecitina y ácido linoleico		
<i>Rocella montagnei</i>	Acetona	Montagnetol y Eritrina	NR - Epifito	NORS: +++ / ++			<i>Thadhani et al.</i> [2011]
<i>Parmeliopsis ambigua</i>	Acetona	ND	Alta Montaña - NR	DPPH: 62,11 % Inhibición ++ SOS: 52,38 % ++		+ (3 spp)	<i>Kosanić et al.</i> [2013]

Actividad comparada con patrones reportados: +++ Alta (Similar o mayor al patrón), ++ Moderada (50 a 80 %), + Baja (<50 % comparada con el patrón); DPPH: Ensayo de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
NORS: Captación de Radical Nitrosilo; SOS: Captación de Anión Superóxido; HORS: Captación de Radical hidroxilo; TEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente Trolox
ND: No Determinada; NR: No Reportada

Tabla5-3 - Continúa de la página anterior

Especie	Extracto o Sustancia Liguénica		Ambiente y Hábito	Propiedad Antioxidante			Referencia
				Poder captador de radicales libres (SOS, NORS HPS, DPPH)	Inhibición de la peroxidación de Lípidos	Poder reductor o Actividad Quelante (PR - AQ)	
<i>Usnea roccellina</i>	Metanol	Ácido decarboxitamnico	Alta Montaña - Epilito	DPPH: +		PR: ++	<i>Rojas et al.</i> [2015] <i>Perico Franco et al.</i> [2015a]
<i>Lobariella pallida</i>	Metanol	Lobarielina	Alta Montaña - Epifito	DPPH: +++		PR: +++	
		Ácido porfirilico Estereocaulina		DPPH: +++ DPPH: +++			

Actividad comparada con patrones reportados: +++ Alta (Similar o mayor al patrón), ++ Moderada (50 a 80%), + Baja (<50% comparada con el patrón); DPPH: Ensayo de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
NORS: Captación de Radical Nitrosilo; SOS: Captación de Anión Superóxido; HORS: Captación de Radical hidroxilo; TEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente Trolox
ND: No Determinada; NR: No Reportada

Tabla 5-4: Actividad fotoprotectora de extractos y metabolitos secundarios de hongos liquenizados

Especie	Extracto/Sustancia Liguénica		Ambiente y Hábito	Actividad Fotoprotectora				Antioxidante	Referencia	
				λ_{max} (nm)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{crit} (nm)	FP-UV Relación UVA/UVB			SPF
<i>Xanthoparmelia farinosa</i>	Acetona	Ácido úsnico	Alta montaña - NR				3,6 - 5,0 +++		<i>Rancan et al.</i> [2002]	
<i>Erioderma leylandii</i> <i>Stereocaulon halei</i>	n-hexano	1-cloropararina Lobarina	Montaña - Epilito	324			1,4 - 2,7 + 1,05 +++	1,44 ++	+++	<i>Ismed et al.</i> [2012] <i>Milot et al.</i> [2012]
<i>Pertusaria pseudocoralina</i>	Acetona	4-O-metildiploicina	Costero - Epilito	342	200			1,20	0,21	
<i>Tephromela atra</i> <i>Diploicia canescens</i>		O-metildeclorodiploicina Ácido secalónico B Ácido secalónico D		326 338 337	6500 36000 37000	374 372		1,07 3,37 2,79	0,15	
<i>Lasalia pustulata</i>	Acetona	Ácido girofórico	Montaña - Epilito	300	16000		1,77 ++		5,03 +	++
<i>Usnea roccellina</i>	Metanol	Ácido úsnico	Alta Montaña - Epilito			370		1,24	29,01	++
		Ácido decarboxitamnico				372		1,14	30,38	+

ND: No Determinada; NR: No Reportada

Las sustancias líquénicas comparten varias características en su estructura química con los compuestos fotoprotectores comerciales, lo que podría hacerlas eficientes como filtros solares. Algunas de estas características incluyen la presencia de grupos electrodonores sobre anillos aromáticos y un cierto grado de conjugación en su estructura, lo que les permite absorber radiación **UV** [Nguyen *et al.* 2013]. Por ejemplo, los compuestos líquénicos derivados de la ruta del acetato-polimalonato, como los derivados del ácido orselínico (depsidonas, dépsidos, depsonas y difeniléteres), absorben principalmente la luz UV-B y responden a cambios en la irradiación *in vivo* [Varol *et al.* 2015; McEvoy *et al.* 2006].

Por otra parte, los dépsidos y los compuestos monoaromáticos comparten algunas características en términos de su absorción **UV**, aunque por lo general los dépsidos absorben radiación **UV** en longitudes de onda más largas. Sin embargo, los efectos de los patrones de sustitución de los anillos aromáticos son similares para ambos tipos de compuestos [Nguyen *et al.* 2013]. Algunos dépsidos, como la atranorina o el ácido evérnico, tienen su máximo de absorción en el UV-B, mientras que sustancias como el ácido vulpínico o el ácido fumarprotocetrarico absorben en el UVA-2 y en el UVA-1 respectivamente. Además, tridépsidos, como el ácido girofórico pueden presentar valores de **FPS** comparables a filtros comerciales como el homosalato [Lohezic-Le Devehat *et al.* 2013].

Una ventaja adicional que ofrecen la mayoría de las sustancias líquénicas es su fotoestabilidad, lo que permite que las formulaciones cosméticas mantengan su eficacia fotoprotectora en el tiempo. Además, la actividad antioxidante resulta ser un beneficio adicional para una sustancia que actúe como filtro solar, al complementar los sistemas antioxidantes endógenos de la piel [Lohezic-Le Devehat *et al.* 2013; Nguyen *et al.* 2013].

5.4 Los páramos y su flora de hongos liquenizados

5.4.1 El bioma páramo y sus condiciones

El Convenio para la Diversidad Biológica define un ecosistema como “*el complejo dinámico de comunidades vegetales, animales y de microorganismos, y su medio no viviente, los cuales interactúan como una unidad funcional*”. Dado que los ecosistemas se presentan de manera continua en la naturaleza, es factible considerar una unidad más amplia que comprenda varios ecosistemas interrelacionados, los cuales forman en conjunto una unidad del paisaje y que abarcan considerables extensiones de territorio con condiciones climáticas, edáficas y bióticas similares; a esto se le denomina **bioma** [Chapin III *et al.* 2002; Van der Hammen *et al.* 2002; Rodríguez *et al.* 2006; Molles Jr. 2008].

Al observar la biosfera en su totalidad, se evidencian dos tipos de gradientes que explican la composición de organismos en los biomas y ecosistemas terrestres. En primer lugar, el gradiente latitudinal, que refleja las diferencias que presenta la biota a medida que nos alejamos desde el ecuador hacia los polos. En segundo lugar, el gradiente altitudinal, que representa las diferencias en los organismos existentes a medida que ascendemos desde el nivel del mar hasta las cimas de las montañas. Sin embargo, al comparar las condiciones ambientales y la biota en función de los gradientes antes mencionados, se encuentran similitudes

y paralelismos entre ellos [Gritzner, C. F. 2007]. Por lo tanto, los páramos, al estar ubicados en elevadas altitudes, comparten similitudes en sus condiciones ambientales y bioclimáticas con respecto a ecosistemas y biomas localizados en altas latitudes. En ambos tipos de entornos se observan patrones climáticos como temperaturas consistentemente inferiores a los 10 °C, cambios abruptos de temperatura y alta irradiación solar, entre otras [Boustie et al.. 2011; Gritzner, C. F. 2007]. Estas condiciones son factores determinantes de la disponibilidad hídrica, el tipo de suelo y la composición florística [Cuatrecasas. 1958; Gritzner, C. F. 2007].

A pesar de las similitudes, existen dos diferencias relevantes entre los ambientes de altas latitudes y los de alta montaña. Primero, el gradiente latitudinal da lugar a una estacionalidad anual cerca de los polos, mientras que en el aumento de altitud conduce a una estacionalidad diaria, en especial en los ambientes más próximos al Ecuador. En los páramos y otros ambientes de alta montaña intertropicales, se manifiestan fluctuaciones anuales moderadas en las temperaturas máximas y mínimas. No obstante, se observan cambios abruptos a lo largo del día, que incluso pueden alcanzar diferencias de más de 20 °C [Cuatrecasas. 1958; Castaño Uribe. 2002; Pedraza-Peñalosa et al.. 2004]. La segunda diferencia reside en la irradiación solar, que difiere notablemente de las regiones templadas y polares. Dada su localización ecuatorial, la radiación solar incide en los páramos casi perpendicularmente, presenta escasas diferencias en su intensidad durante el año y debido a la delgadez de la atmósfera, por lo que el filtrado atmosférico de la radiación **UV** es menos efectivo. Estas condiciones indudablemente influyen en las estrategias de protección que deben adoptar los organismos expuestos [Cuatrecasas. 1958; Castaño Uribe. 2002].

La estacionalidad diaria particular de este tipo de ambientes, junto con las demás características ambientales, confiere a los páramos una alta vulnerabilidad frente a cambios prolongados y repentinos en los patrones climáticos y medioambientales [Castaño Uribe. 2002]. Cambios como los que actualmente se experimentan producto del calentamiento global. A pesar de ello, la flora es capaz de translocarse altitudinalmente en respuesta, ascendiendo o descendiendo por las laderas de las montañas [Van der Hammen et al.. 2002; Sipman. 2002]. Según Van der Hammen et al. [2002] durante el último millón de años se han registrado más de 10 episodios de avance-retroceso durante los periodos glaciales e interglaciares, que llevaron a los páramos a altitudes tan bajas como 2 500 **msnm**. No obstante, es necesario resaltar que durante los periodos de retroceso, los páramos se convierten en islas biológicas aisladas entre sí, lo que no solo potencia los procesos de especiación, sino también la aparición de endemismos y el aumento de la biodiversidad [Castaño Uribe. 2002; Van der Hammen et al.. 2002].

Los páramos son biomas con zonación altitudinal definida, también denominados **orobiomas** [Castaño Uribe. 2002; Rodríguez et al.. 2006]. Su origen se remonta a aproximadamente hace 5 millones de años, cuando se produjo la elevación definitiva de la cordillera de los Andes [Cuatrecasas. 1958; Castaño Uribe. 2002]. Se ubican exclusivamente en la región septentrional de Suramérica a altitudes mayores de 2 800 **msnm** [Castaño Uribe. 2002], estos biomas exhiben una notable diversidad biológica, como resultado de la conjunción de tres grandes factores. Primero, se encuentran en la convergencia de varias ecozonas del neotrópico [Sipman. 2002]. Segundo, la existencia de procesos de insularidad relacionados con la topografía y la orografía genera barreras geográficas que limitan la dispersión de las especies vegetales y promueven procesos de especiación [Castaño Uribe. 2002; Van der Hammen et al.. 2002]. Tercero, la propia cordillera sirve de corredor para la movilidad de la biota, facilitando su desplazamiento desde el norte hacia el sur del continente y viceversa [Sipman. 2002].

En relación con la composición florística en función de los gradientes de latitud y de altitud, se observa una disminución de la vegetación arbórea y un aumento en la flora de **HL**, hasta llegar a dominar en estos hábitats [Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002; Boustie et al.. 2011]. El páramo puede subdividirse en tres zonas según su vegetación (Tabla 5-5). El **subpáramo** que se localiza entre (2 800 y 3 200) **msnm** y su vegetación son arbustos y plantas de porte bajo, esta zona es el límite superior del bosque altoandino y el inferior del páramo [Rodríguez et al.. 2006]. El **páramo sensu stricto**, que se caracteriza por tener una cobertura vegetal mayormente herbácea de tipo graminoide, con arbustos y formas arborescentes arrossetadas llamadas frailejones [Cuatrecasas. 1958; Rodríguez et al.. 2006]. Además, estudios posteriores en esta zona diferenciaron al menos tres comunidades de plantas, pajonales, frailejonales y matorrales enanos [Van der Hammen & Rangel-Ch. 1997]. Finalmente, el **superpáramo** que está situado por encima de 4 000 **msnm**, allí la vegetación presenta cobertura irregular y la mayoría son organismos pioneros como briófitos y **HL** [Rodríguez et al.. 2006].

Tabla 5-5: Unidades bioclimáticas de las regiones de alta montaña del neotrópico. [Van der Hammen et al.. 2002]

Unidad bioclimática	Zona	Temperatura Promedio	Precipitación
Nival	Nival	< 1,5 °C	-
Tundra pluvial alpina	Superpáramo	(1,5 - 3,0) °C	(500 - 1 000) mm
Páramo pluvial subalpino	Páramo <i>sensu stricto</i>	(3,0 - 6,0) °C	(1 000 - 2 000) mm
Páramo subalpino			(500 - 1 000) mm
Bosque montano pluvial	Subpáramo - Bosque alto andino	(6,0 - 12,0) °C	(2 000 - 4 000) mm
Bosque montano muy húmedo			(1 000 - 2 000) mm
Bosque montano húmedo			(500 - 1 000) mm

5.4.2 Flora liquénica

La flora de **HL** de Colombia cuenta con más de 1 550 especies reportadas a la fecha, a pesar de que existen zonas de difícil acceso donde aún no se ha logrado hacer el inventario correspondiente [Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002; Sipman. 2002; Sipman et al.. 2008]. De ellas, alrededor de 1 400 especies se encuentran en regiones de vida montañosa por encima de los 1 000 **msnm**, lo que se denomina en conjunto como sistema cordillerano, y que está constituido por 3 regiones de vida: subandina, andina y páramo. En la Cordillera Oriental, donde se localiza nuestro sitio de estudio, se encuentran 1 071 de las especies reportadas para Colombia. Y en conjunto, los páramos de Colombia reúnen aproximadamente el 20 % de las especies de **HL** existentes en el país [Aguirre. 2010].

La flora de **HL** de los páramos y las zonas de alta montaña del neotrópico es al menos el doble de diversa si se la compara con las zonas de montaña alpinas o del paleotrópico [Sipman. 2002]. Se observan variaciones altitudinales en la diversidad de **HL** tanto a nivel de familias como en la riqueza de especies. La riqueza de **HL** aumenta en función de la altitud, alcanzando un máximo en la zona andina (2 000 **msnm** - 3 000 **msnm**) y disminuyendo ligeramente en los páramos, tendencias similares se han observado para algunas familias de **HL**, como la familia *Lobariaceae* [Aguirre. 2010]. Con respecto al tipo de crecimiento, en la zona tropical por debajo de los 2 000 **msnm** predominan los **HL** costrosos. A medida que se asciende, disminuye la abundancia de **HL** costrosos, mientras que las formas foliosas y fruticosas se hacen más abundantes y en el páramo constituyen los tipos de **HL** más frecuentes [Sipman. 1989 2002].

A pesar de la alta diversidad y el grado de endemismo que presentan muchos tipos de organismos en los páramos, la flora liquénica no tiene el mismo comportamiento, ya que muchas especies cuentan con una distribución más amplia [Sipman. 2002]. De todas las especies presentes en los páramos y zonas de montaña, aquellas de distribución restringida representan aproximadamente el 10 % del total. Las de distribución neotropical comprenden cerca del 50 %, siendo más abundantes entre los (2 000 y 3 500) **msnm**. Por otro lado, el porcentaje restante son especies de distribución cosmopolita o que también se encuentran presentes en zonas templadas y cuya abundancia es mayor por encima de los 2 000 **msnm** [Sipman. 1989 2002]. Esto podría deberse a que la región septentrional de los Andes no solo es la confluencia de varias zonas florísticas (Centroamérica, Sudamérica y el Caribe), sino que también funciona como un corredor de dispersión biológica [Sipman. 2002].

El páramo se diferencia florísticamente de los otros componentes del sistema cordillerano, no solo por el porte más bajo de la vegetación, sino también por su composición y los tipos de comunidades y hábitats disponibles [Aguirre. 2010]. En relación con los tipos de hábitat, el epífito-corticícola es el de mayor preferencia en todas las zonas de vida del sistema cordillerano. El número de especies de **HL** epífito-corticícola alcanza su máximo en las zonas de vida subandina y andina, mostrando una leve disminución en los páramos [Aguirre. 2010]. El segundo lugar lo ocupa el hábito saxícola-terricola, que incrementa su número de especies en función de la altitud, llegando a su punto máximo en las zonas de vida andina y páramo. El hábito saxícola-epífito sigue una tendencia similar, aunque su máxima diversidad se alcanza en la región andina [Aguirre. 2010]. Por último, los **HL** epífito-folícola presentan baja riqueza en los páramos, lo que podría estar relacionado con la disminución de la cobertura vegetal con la altitud hasta llegar a ambientes desarbolados como los páramos, donde la hojarasca es muy reducida [Cuatrecasas. 1958].

En cuanto a las comunidades vegetales, los páramos presentan tres comunidades principales [Van der Hammen & Rangel-Ch. 1997]. Los pajonales y frailejonales, donde suele haber presencia de **HL** de hábito saxícola-terricola, algunos de los cuales tienen modo de crecimiento costroso, y los matorrales enanos, cuyos bordes suelen albergar gran diversidad de **HL**, principalmente de hábito corticícola-epífito y de crecimiento fruticoso o folioso altamente expuestos a la radiación solar [Aguirre. 2010], como es el caso de la especie de estudio, *Lobariella sipmanii*.

5.4.3 El género *Lobariella* y sus metabolitos

Los **HL** del género *Lobariella* pertenecen a la familia *Lobariaceae*, que posee actualmente entre 400 y 800 especies a nivel mundial, distribuidas principalmente en el neotrópico, América Central y el Pacífico (Figura 5-8) [Moncada et al.. 2013; GBIF. 2022]. Las principales características que distinguen a las especies del género son: Presencia o ausencia de pseudocifelas, máculas e isidios; el tipo de fotobionte para algunas especies es un alga verde como sucede con *Lobariella pallida*, mientras que en otras se trata de cianobacterias, como es el caso de *L. sipmanii* en donde el fotobionte son cianobacterias del género *Nostoc* sp [Lumbsch et al.. 2011; Moncada et al.. 2013].

Estudios fitoquímicos del género han reportado la presencia de las siguientes sustancias liquénicas en especies de este género: atranorina, ácido úsnico, ácido estictico. Adicionalmente, Perico Franco et al. [2015b] en su



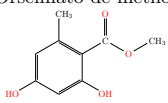
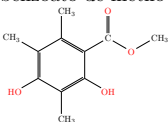
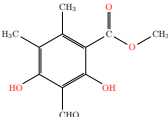
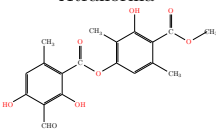
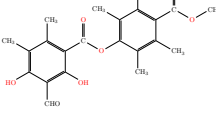
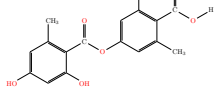
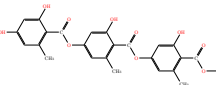
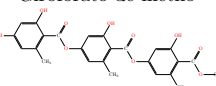
Figura 5-8: Distribución del género *Lobariella* a nivel mundial. [GBIF. 2022]

estudio de la especie *Lobariella pallida* encontró la presencia de las siguientes sustancias liquénicas: orselinato de metilo, 2,4-dihidroxi-5,6-dimetilbenzoato de metilo y lobarielina, las cuales tienen actividad antioxidante (Tabla 5-6). En estudios posteriores, se ha reportado para *Lobariella pallida* pseudociferelina A, lobarielina y 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetil benzoato de metilo [Angulo Castro. 2020]. Por su parte, en el caso de *L. sipmanii* se ha reportado como sustancia mayoritaria el ácido girofórico y sus derivados [Lumbsch et al.. 2011].

La principal actividad biológica reportada para muchas de las sustancias liquénicas obtenidas de especies del género *Lobariella* es la actividad citotóxica. Un ejemplo notable es la atranorina, sustancia identificada en algunas especies del género que ha demostrado actividad citotóxica sobre líneas celulares tales como la 4T1 de carcinoma mamario murino y la A549 de cáncer de pulmón [Solár et al.. 2016; Zhou et al.. 2017]. Otra sustancia de interés es el ácido girofórico, que es un tridépsido activo como antiproliferativo contra la línea celular HaCaT y sobre otras líneas celulares, lo que lo hace prometedor para el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas de la piel, como la psoriasis [Kumar KC & Müller. 1999; Bačkorová et al.. 2011 2012].

Recientemente, se evaluó la actividad inmunomoduladora a través del efecto antioxidante de diversas sustancias liquénicas, como el hematomato de metilo, atranorina, lobarielina, el triterpeno zeorina, de estas el hematomato de metilo fue activo contra especies reactivas [Mesaik. 2015; Perico Franco et al.. 2015a]. Adicionalmente, sustancias como el 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo, la lobarielina, el ácido girofórico y la pseudociferelina A aisladas de *Lobariella pallida* muestran actividad fotoprotectora moderada en el UV-B [Angulo Castro. 2020].

Tabla 5-6: Metabolitos secundarios reportados para el genero *Lobariella*

Categoría Estructural	Sustancia	Especie	Actividad Reportada	Referencias
Monofenólicos	Orselinato de metilo 	<i>Lobariella pallida</i>	Citotóxico	<i>Perico Franco et al.</i> [2015b]
	2,4-dihidroxi-3,5,6-trihidroxi benzoato de metilo 	<i>Lobariella pallida</i>	Fotoprotector	<i>Angulo Castro</i> [2020]
	Lobarielina 	<i>Lobariella pallida</i>	Antioxidante	<i>Perico Franco et al.</i> [2015a] <i>Angulo Castro</i> [2020]
Dépsidos y tridépsidos	Atranorina 	<i>Lobariella pallida</i>	Antimicrobiana Citotóxica	<i>Zhou et al.</i> [2017]
	Pseudociferelina A 	<i>Lobariella pallida</i>	Fotoprotectora	<i>Angulo Castro</i> [2020]
	Ácido lecanórico 	<i>L. peltata</i> , <i>L. ecorticata</i>	Antimicrobiana	<i>Moncada et al.</i> [2013]
	Ácido girofórico 	<i>Lobariella sipmanii</i>	Antimicrobiana Antiproliferativo Fotoprotector	<i>Lumbsch et al.</i> [2011] <i>Kumar KC & Müller</i> [1999] <i>Angulo Castro</i> [2020]
	Giroforato de metilo 	<i>L. crenulata</i> , <i>L. soledians</i>	Antimicrobiana	<i>Moncada et al.</i> [2013]

6 Materiales y Métodos

6.1 Recolección del material liquénico y selección de la especie de estudio

Para seleccionar la especie objeto de estudio, se llevó a cabo un estudio bioautográfico (Sección 6.1.3), se determinó la actividad fotoprotectora y la captación de radicales libres con el modelo **DPPH** (Sección 6.1.4) de los extractos acetónicos de cinco especies de **HL**. Los especímenes fueron colectados en el Parque Nacional Natural Sumapaz, ubicado en la Localidad 20 de Bogotá DC, Colombia (Tabla 6-1), se seleccionaron aquellas especies que se encontraban expuestas directamente a la radiación solar en su entorno natural, específicamente sobre corteza de forófitos arbustivos, rocas o suelo.

Tabla 6-1: Datos de recolección de las especies del estudio bioautográfico

Especie	<i>Lobariella sipmanii</i>	<i>Thamnolia vermicularis</i>	<i>Everniastrum</i> sp	<i>Peltigera neopolydactyla</i>	<i>Cladonia didyma</i>
Lugar	Parque Nacional Natural Sumapaz - Localidad 20 - Bogotá DC - Colombia				
Coordenadas	04° 07.899' N 74° 14.685' W	04° 17.845' N 74° 12.659' W	04° 07.574' N 74° 14.801' W	04° 09.233' N 74° 14.353' W	04° 17.845' N 74° 12.659' W
Altitud (msnm)	3754	3842	3832	3700	3754
Sustrato	Forófito	Tierra/Rocas	Forófito	Suelo/Musgo	
Temperatura Promedio	2 - 8 °C				
Número Ejemplar COL	609185	609186	609190	609191	609187

Las especies se recolectaron al amparo del Otrosí número 4 del 21 de marzo de 2018 adicionado al Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos número 121 del 22 de enero de 2016, que cubre al proyecto: “Bioprospección de líquenes y sus productos derivados 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.”

A partir del ensayo bioautográfico se escogió el hongo liquenizado *Lobariella sipmanii* (Moncada, Betancourt & Lüking), este **HL** fue encontrado sobre la corteza de forófitos arbustivos, posiblemente de los géneros *Diplostephium* e *Hypericum*. Estos forófitos suelen hallarse en los límites de matorrales enanos o como elementos aislados dentro del paisaje de páramo. Además, debido a su ubicación suelen estar directamente expuestos a la radiación **UV**.

6.1.1 Tratamiento y limpieza del material biológico

Lugar de realización La limpieza y tratamiento del material biológico colectado se realizó en el laboratorio 126 del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá DC, al igual que los ensayos espectrofotométricos cuantitativos de actividad antioxidante y fotoprotectora de los extractos. Por su parte, el estudio bioautográfico se llevó a cabo en el laboratorio 319 del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá DC.

Tratamiento del material El material colectado fue secado inicialmente con papel periódico y luego fue lavado con agua destilada y limpiado bajo el estereoscopio, para eliminar musgos, hojarasca e insectos. Una vez limpio, se secó en una estufa de aire circulante (ca. 45 °C, 2 días). El material seco, se fragmentó en un molino de discos hasta obtener un polvo fino.

6.1.2 Ensayos preliminares a pequeña escala

Los extractos de prueba para el ensayo bioautográfico y los ensayos preliminares fueron obtenidos a partir 2 g de material liquénico, mediante 2 ciclos de maceración estática en viales cerrados con 30 mL acetona (Me_2CO) cada uno, seguidos de 2 ciclos de maceración dinámica con el mismo volumen de disolvente. Cada ciclo tuvo una duración de 3 días, al finalizar cada ciclo se filtró por gravedad el extracto a través de un embudo con algodón y se concentró mediante evaporación a presión reducida, para obtener los extractos secos.

6.1.3 Bioautografía directa

Con el fin de definir la especie que se utilizó en el presente trabajo, se realizó un estudio bioautográfico mediante cromatografía de capa delgada analítica (CCD) en fase normal de los diferentes extractos de **HL**. Los extractos (Tabla **6-1**) se aplicaron 10 veces con capilares graduados (ca. 10 mg/mL) sobre cromatofolios de gel de sílice (CCD-**A**). Posteriormente, se eluyeron con la fase móvil Tolueno:Ácido Acético 85:15 y se empleó atranorina (**A**) como sustancia de referencia, tal y como reporta en literatura [*Culverson & Kristinsson*. 1970]. Una vez eluidos se dejó evaporar el disolvente y se visualizaron las placas bajo luz **UV** ($\lambda = 254 \text{ nm}$) y se registró fotográficamente el resultado.

A continuación, las placas se asperjaron con solución del radical libre **DPPH** (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) al 0,2% en metanol. Se observó la reacción inmediata y a los 20 min, para determinar los extractos que presentan actividad captadora de radicales libres mediante el cambio de color de zonas de la placa de morado a amarillo [*Bhattarai et al.* 2008; *Luo et al.* 2009]. Esto permite establecer de manera cualitativa la actividad antioxidante de los componentes de los extractos acetónicos durante el proceso de selección de la especie que sería objeto de estudio.

6.1.4 Actividad antioxidante y fotoprotectora de los extractos

Aquellos extractos que reaccionaron con el **DPPH** en el ensayo bioautográfico fueron seleccionados para la cuantificación de su poder captador de radicales libres en el modelo radical **DPPH**, como se describe en la Sección 6.3.2 [Brand-Williams *et al.* 1995]. Adicionalmente, para poder evaluar otros posibles mecanismos de actividad antioxidante se realizó el ensayo de poder reductor férrico, como se describe en la Sección 6.3.2. [Berker *et al.* 2007] Por último, se determinó la actividad fotoprotectora del extracto y se estableció el Factor de Protección Solar (**FPS**) *in vitro* como se detalla más adelante en la sección 6.3.3 [Manzur *et al.* 1986].

6.2 Estudio químico

6.2.1 Procedimientos experimentales generales

Disolventes y reactivos Se emplearon los reactivos que se mencionan a continuación, cuyo grado de pureza fue grado analítico: ácido acético glacial (100 % - JT Baker), ácido fórmico (88,0 % - JT Baker), e igual para el caso de los disolventes: cloroformo (99,0 % - Carlo Erba), éter etílico (99,7 % - Panreac), dioxano (99,2 % - Carlo Erba), metanol (**MeOH** - 99,5 % - JT Baker); acetato de etilo (**AcOEt** - 99,5 % - Carlo Erba); diclorometano (**DCM** - 99,0 % - Mallinckrodt), n-hexano (**n-Hex** - 95,0 % - Panreac), tolueno (99,5 % - Mallinckrodt), acetona (**Me₂CO** - 99,0 % - Carlo Erba) y etanol (**EtOH** - 96,0 % - Merck).

Lugar de realización y equipos El componente fitoquímico de este estudio se llevó a cabo en el laboratorio 319 del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá DC. Los pesos se midieron en una balanza analítica digital Sartorius Entris. (Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, Alemania). Los puntos de fusión no corregidos fueron tomados en un fusiómetro Electrothermal Mel-Temp [®] 9100 Series (Reino Unido).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (**RMN**) uni y bi dimensionales se realizaron en el equipo Bruker Avance 400 (Billerica, Massachusetts, EE.UU), que se encuentra en el Departamento de Física de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá DC, tomando como compuesto de referencia el tetrametilsilano (**TMS**) y procesando los espectros en el software MestReNova v 14.2.0-26256. Los espectros infrarrojos medio se determinaron con un espectrómetro infrarrojo de Transformada de Fourier Thermo Scientific Nicolet iS10 (Waltham, Massachusetts, EE.UU) ubicado en el Laboratorio de Análisis Instrumental del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá DC.

Cromatografía y seguimiento La cromatografía en columna abierta (**CC-A**) se realizó sobre gel de sílice 60 (0,063 - 0,200 mm, Merck) o Sephadex LH 20 (Sigma) según la necesidad. Para el monitoreo de las fracciones obtenidas en las **CC-A** se utilizó cromatografía en capa fina (**CCD-A**) con fase estacionaria de gel de sílice (0,25 mm F₂₅₄ - Merck). El revelado de las placas se llevó a cabo empleando luz **UV** ($\lambda = 254$ nm) y agentes reveladores como ácido sulfúrico (20 % y calentamiento a 100 °C). Para la elución de las placas de **CCD** se

utilizaron los siguientes sistemas (Tabla 6-2):



Tabla 6-2: Fases móviles empleadas en la CCD-A

Fase butanólica			
Nombre	Disolventes	Proporción	Polaridad Calculada
Mezcla C	Tolueno:Ácido acético	85:15	2,97
Mezcla A	Tolueno:Dioxano:Ácido Fórmico	139:83:8	4,30
Esticticina	Butanol:Ácido acético:Agua	60:25:15	26,17

6.2.2 Confirmación de la identidad taxonómica

La identidad taxonómica de *Lobariella sipmanii* (Tabla 6-3) se confirmó empleando las claves de Sipman (1982), corroborando la consistencia de las características morfológicas, anatómicas y químicas del talo con las indicadas en las claves. La identificación fue llevada a cabo por el Biólogo Roberto Dávila, director de la Fundación para el estudio de la biodiversidad en Colombia (FUNBIOCOL). Una muestra de referencia reposa en el Herbario Colombiano del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (COL 609185).

Tabla 6-3: Datos de colecta y clasificación taxonómica de *Lobariella sipmanii*

			
Foto: David Torres V		Foto: David Torres V	
Datos de Colecta			
Lugar:	Parque Nacional Natural Sumapaz - Localidad 20 Sumapaz - Bogotá DC - Colombia.		
Coordenadas geográficas:	4 °06' 38.02 N - 74 °15' 03.71 W		
Altitud:	3765 msnm		
Temperatura promedio:	0 - 10 °C		
Sustrato:	Colectada sobre forófito, se encontró junto con <i>Hypotrachyna</i> sp, <i>Everniastrum</i> sp, <i>Usnea</i> sp & <i>Oropogon</i> sp.		
Colectores:	Roberto Dávila, Norma Valencia Islas, Jose L Rojas, David Torres V		
Numero COL:	609185		
Taxónomo:	MSc Roberto Dávila		
Especie:	<i>Lobariella sipmanii</i> (Moncada, Betancourt & Lüicking)		
Características morfológicas y anatómicas		Pruebas de coloración	
Cara adaxial de color gris azulado pálido, glabra, sin isidios ni soledios, márgenes lobulados enteros o ligeramente crenulados, con abundantes apotecios cafe anaranjados en forma de copa, cuyos márgenes son de color blanco. [Lumbsch et al.. 2011]		Ensayo	Coloración
		P	(+) Verde
		K	(+) Amarillo
		C	Sin cambio
		KC	(+) Rojo Anaranjado

Para confirmar la identificación taxonómica, se realizó el ensayo que se describe a continuación sobre cuatro muestras de material homogeneizado de cada una de las especies de **HL**, aplicando en cada una de ellas en orden los siguientes reactivos [Masuch. 1993].

- **Reactivo P:** Solución fresca de p-fenilendiamina (1 g) en 50 mL de etanol 96 %.
- **Reactivo K:** Solución de hidróxido de potasio 10 % p/v.
- **Reactivo C:** Solución de hipoclorito de sodio al 4 %.
- **Reactivo KC:** Mezcla 1:1 del Reactivo K y del Reactivo C.

Se observó y registró los cambios de coloración del material vegetal en contacto con cada reactivo, para conocer los tipos de compuestos que se encuentran en cada uno de los extractos, en algunos casos, el patrón de coloración es específico para un compuesto liquénico. [Masuch. 1993]

6.2.3 Extracción

Se tomó 65 g de material liquénico seco de la especie *Lobariella sipmanii* y se realizó la extracción utilizando 3 ciclos de maceración estática, cada uno con 600 mL de acetona (**Me₂CO**) durante 5 días. Al finalizar cada ciclo se filtró el extracto a presión reducida para eliminar material particulado y luego el extracto filtrado se concentró a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio para recuperar la mayor cantidad posible de disolvente. Sobre el marco se adicionó el disolvente recuperado y disolvente nuevo hasta completar 600 mL para iniciar un nuevo ciclo. Luego de los 3 ciclos estáticos se realizaron ciclos de maceración dinámica por periodos de 2 días utilizando el mismo procedimiento de filtrado y recuperación de disolvente antes descrito.

Al final de cada extracción se tomó una muestra del extracto concentrado para evaluar la presencia de compuestos por **CCD**, los ciclos de maceración dinámica se realizaron hasta que por **CCD** no se encontraron compuestos en los concentrados. Los concentrados obtenidos en cada ciclo se reunieron en un mismo recipiente, para finalmente ser llevado a sequedad en la estufa a 40 °C, obteniéndose el extracto seco de color verde oscuro. (3,2228 g - 4,9 %)

6.2.4 Fraccionamiento

El extracto seco (2,9 g) se suspendió en 20 mL de agua destilada y se extrajo con éter diétilico (3 × 15 mL). Durante este proceso precipitó un sólido color blanco (FSB) que se filtró al vacío (892,8 mg). La fase etérea se llevó a sequedad (FE: 1,6118 g) y la acuosa se extrajo con n-butanol (3 x 15 mL) para dar lugar a la fracción butanólica (FB: 103,8 mg). La fase acuosa se liofilizó dando lugar a la fracción acuosa (FA: 286,3 mg).

6.2.5 Aislamiento y purificación de compuestos

Obtención de pseudociferelina A (**1**)

El sólido blanco (FSB - 892,8 mg) se sometió a cromatografía en columna abierta (**CC-A**) sobre gel de sílice (41,54 g) eluyendo por gradiente de polaridad de **n-hex:DCM** (1:0 → 0:1), **DCM:Me₂CO** (1:0 → 0:1) y **Me₂CO** dando lugar a 384 fracciones (4 mL) que se reunieron en 9 fracciones combinadas (FSB-1 a FSB-9) de acuerdo a su similitud en **CCD** (Tabla 6-4).

Tabla 6-4: **CC-A** sobre gel de sílice de la fracción sólida (FSB) que precipitó durante el proceso de extracción de *L. sipmanii*.

Fase móvil de elución			Actividad Antioxidante	Fracciones Combinadas	Clave	Peso (mg)
Disolvente	Proporción	Fracciones				
Hexano	100	1 - 9	+	1-42	FSB-1	2,9
Hex:DCM	90:10	10-16				
	70:30	16-26				
	60:40	27-42				
	50:50	43-60				
	40:60	61-72				
	30:70	73-84				
	20:80	85-92				
10:90	93-112	78-128		FSB-3	10,1	
DCM	100					113-125
DCM:Me ₂ CO	95:5	126-174	+	129-133	FSB-4	2,7
	90:10	175-212		134-164	FSB-5	17,5
	85:15	213-225		164-190	FSB-6	47,3
	80:20	226-237		191-286	FSB-7	198,7
	70:30	238-304		287-329	FSB-8	369,7
	50:50	305-323				
	40:60	324-339		330-445	FSB-9	230,7
	30:70	340-355				
	20:80	356-369				
	10:90	370-379				
Me ₂ CO	100	380-384				

A partir de la fracción FS-2 (219,9 mg) se obtuvo un sólido que fue lavado varias veces con acetona, seguido de recristalización con mezcla **MeOH:Me₂CO** dando lugar a un sólido color blanco (68,0 mg - 2,4%), soluble en CHCl₃, DCM y MeOH, **Pf** (°C): 174-175. **IR** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3377, 3367, 3208, 2916 (O-H); 2953 (C-H), 2932 (C-H); 2704 (CHO Sobretono); 1647 (C=O); 1577 (C=C); 1261 (C-O); 1198 (C-O); 1076 (C-O). **RMN** ¹H (CDCl₃ - 400 MHz): 2,09 (3H, s, CH₃-9'); 2,11 (3H, s, CH₃-10'); 2,21 (3H, s, CH₃-9); 2,50 (3H, s, CH₃-8'); 2,73 (3H, s, CH₃-10); 4,01 (3H, s, COOCH₃); 10,40 (1H, s, CHO); 11,14 (1H, s, OH-2'); 12,41 (1H, s, OH-4); 13,10 (1H, s, OH-2). **RMN** ¹³C (CDCl₃): C-1: 102,8; C-2: 166,9; C-3: 107,9; C-4: 166,1; C-5: 118,2; C-6: 150,1; C-7: 169,8; C-8: 194,0; C-9: 10,8; C-10: 20,5; C-1': 111,9; C-2': 158,9; C-3': 116,2; C-4': 151,5; C-5': 120,5; C-6': 137,6; C-7': 172,1; C-8': 18,9; C-9': 13,3; C-10': 9,8; C7'-COOMe: 52,3.

Esta sustancia fue identificada como Pseudociferelina A por análisis y comparación de sus datos espectroscópicos con lo reportado en literatura [Hüneck. 1984; Jakupovic & Hüneck. 1989; Hüneck. 1999].

Obtención del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**)

La fracción primaria etérea (FE - 1.200 g) se sometió a **CC-A** sobre gel de sílice (50 g) eluyendo por gradiente de polaridad de mezclas de *c*-hex:AcOEt (0.9:0.1 → 0:1) dando lugar a 25 fracciones (20 mL) que se reunieron en 6 fracciones combinadas (FE-1 a FE-6) de acuerdo a su similitud en **CCD** (Tabla **6-5**).

Tabla 6-5: Cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice de la fracción primaria etérea

Fase móvil	Proporción	Fracciones	Fracción combinada	Clave	Peso (mg)
<i>c</i> -hex:AcOEt	90:10	1 – 2	1 – 2	FE-1	50,4
	80:20	3 – 6	3 – 6	FE-2	203,0
	70:30	7 – 14	7 – 9	FE-3	87,6
	10:90	15 – 20	10 – 14	FE-4	239,3
AcOEt	100	21 – 25	15 - 20	FE-5	403,0
			21 - 25	FE-6	100,9

A partir de la fracción combinada FE-4 (239,3 mg) se formó un semi-sólido color anaranjado que se lavó con mezcla CHCl₃:MeOH (1:1) dando lugar a un sólido amorfo naranja amarillento (52,3 mg - 1,8 %) soluble en CHCl₃, **pF** (°C): 96-98. **RMN ¹H (CDCl₃ - 400 MHz):** 2,13 y 2,14 (6H, ds, CH₃-8, CH₃-9); 2,43 (3H, s, CH₃-10); 3,92 (3H, s, COOCH₃); 11,46 (1H, s, OH-2). **RMN ¹³C (CDCl₃):** C-1: 106,3; C-2: 159,7; C-3: 107,4; C-4: 156,8; C-5: 115,0; C-6: 137,7; C-7: 172,9; C-8; 12,0; C-9; 8,1; C-10: 18,9; C7-COOMe: 52,0.

Esta sustancia fue identificada como 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) por análisis y comparación de sus datos espectroscópicos con lo reportado en literatura [Hüneck & Yoshimura. 1996; Angulo Castro. 2020].

Obtención del orselinato de metilo (**3**)

A partir de la fracción combinada FE-5 (403,0 mg - Tabla **6-5**) y de la fracción FSB-7 (198,7 mg - Tabla **6-4**) se precipitó un sólido beige amarillento que se recrystalizó de mezcla CHCl₃:AcOEt (9:1) dando lugar a un sólido cristalino transparente (140 mg - 4,9 %) soluble en CHCl₃, MeOH y DMSO. **Pf** (°C): 138-139. **RMN ¹H (Acetona-d₆) - 400 MHz):** 2,47 (3H, s, CH₃-8); 3,93 (3H, s, COOCH₃); 6,25 (1H, s, C3); 6,30 (1H, s, C5); 9,12 (1H, s, OH-4); 11,64 (1H, s, OH-2). **RMN ¹³C (Acetona-d₆):** C-1: 105,4; C-2: 166,2; C-3: 101,3; C-4: 163,4; C-5: 112,3; C-6: 144,3; C-7: 173,1; C-8; 24,0; C7-COOMe: 52,0.

Esta sustancia fue identificada como orselinato de metilo (**3**) por análisis y comparación de sus datos espectroscópicos con lo reportado en literatura [Hüneck & Yoshimura. 1996].

6.3 Estudio de actividad biológica

6.3.1 Procedimientos generales

Reactivos Para los ensayos de actividad antioxidante se emplearon los siguientes reactivos: Ácido gálico (**AG**) (98,0 % - Merck), butilhidroxitolueno (**BHT**) (99,0 % - Sigma Aldrich), 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (**DPPH**) (90,0 % - Sigma Aldrich), ácido linoleico (99,0 % - Sigma Aldrich), fosfato dibásico de sodio - Na_2HPO_4 (99,3 % - Mallinckrodt), fosfato básico de sodio NaH_2PO_4 (99,6 % - Mallinckrodt), Tween 20 (95,0 % - PanReac), tiocianato de amonio (99,0 % - Merck), cloruro ferroso - FeCl_2 (99,0 % - JT Baker), tocoferol fosfato de sodio (**TPNa** - 99 %), cloruro férrico - FeCl_3 (98,0 % - Merck), ferricianuro de potasio - $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (94,0 % - PanReac), etanol absoluto (PanReac), ácido clorhídrico concentrado (37,0 % - JT Baker), ácido tricloroacético (99,5 % - Merck).

Por otro lado, para los ensayos de actividad fotoprotectora los filtros solares orgánicos empleados como patrón fueron los siguientes: Bemotrizinol (**BMT**) (Amplio espectro), metoxicinamato de octilo (**OMC** - **EHMC**) (UV-B), benzofenona-3 (**BP3**) (UV-B y UV-A 2) y avobenzona (**AVO**) (UV-A), donados al laboratorio por parte de la industria.

Lugar de realización y equipos Para las mediciones espectrofotométricas en **UV** y visible se utilizó un espectrofotómetro Shimatzu Pharmaspec UV-1700 (Shimadzu, Kyoto, Japan) ubicado en el laboratorio 126 del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá DC. Por otro lado, el ensayo de captación de radicales libres y la reactividad de los compuestos obtenidos con el modelo **DPPH** fueron realizados espectrofotométricamente con el equipo Hewlett-Packard 8453 (Waldbronn, Alemania) ubicado el Laboratorio de Análisis de Materias Primas de GRASCO ubicado en la ciudad de Bogotá DC.

Preparación de soluciones Stock y diluciones Para el extracto de *Lobariella sipmanii*, los compuestos obtenidos y los patrones se pesan aproximadamente 5,0 mg, este valor se consigna en una hoja de cálculo de ExcelTM para realizar las posteriores diluciones. Luego, se transfiere cuantitativamente la sustancia a un matraz aforado de 10,00 mL y se completa a volumen con alcohol etílico al 96 %. En caso de que la sustancia no sea fácilmente soluble en etanol, se realiza la reconstitución en la mínima cantidad de DMSO, cloroformo, DCM o el disolvente adecuado para la sustancia y luego se completa el volumen con etanol. De ser necesario se colocan en ultrasonido por 5 min para garantizar su completa disolución.

A partir de las disoluciones Stock preparadas (Aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 500 ppm) se realizaron las correspondientes diluciones utilizando micropipetas para obtener 2 o 3 réplicas de las disoluciones de las concentraciones requeridas para cada uno de los ensayos.

6.3.2 Determinación de la actividad antioxidante

Poder captador de radicales libres

La actividad captadora de radicales libres basada en el mecanismo de transferencia de protones (**MATH**) de los extractos y compuestos aislados de *Lobariella sipmanii* fue evaluada en el modelo del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo o **DPPH** según metodología de *Brand-Williams et al.* [1995]. Esta especie química es un radical estable, debido a la deslocalización del electrón desapareado a través de toda la molécula. [Blois. 1958; Molyneux. 2004] Producto de esta deslocalización, las soluciones alcohólicas de este reactivo poseen un color violeta y una longitud de máxima absorción entre 515 y 520 nm. [Molyneux. 2004; Mishra et al. 2012] Cuando el radical libre **DPPH** se mezcla con sustancias que donen un protón o con otra especie radicalaria se forma la especie no radicalaria de color amarillento, debido a la presencia del grupo picrilo. (Figura 6-1) En el caso de las sustancias que donan protones, el subproducto es una especie radicalaria, que puede llevar a cabo reacciones adicionales con radical **DPPH** presente en el medio. [Molyneux. 2004; Blois. 1958]

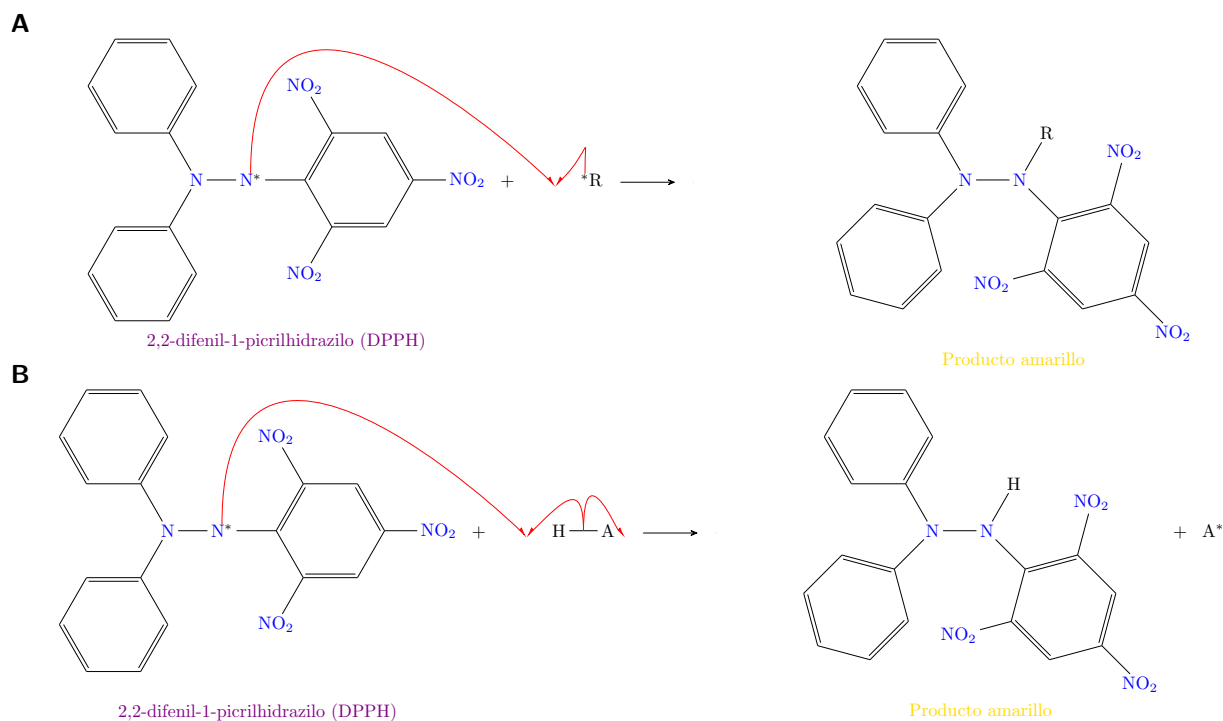


Figura 6-1: Mecanismo general de reacción del **DPPH**. **A.** Reacción con una especie radicalaria - **R** (*quenching*); **B.** Reacción con un compuesto antioxidante donador de protones - **AH** (*scavenging*)

A partir de la reacción con el radical **DPPH** no solo es posible establecer la actividad captadora de un compuesto antioxidante, también se puede determinar su reactividad. Esto hace posible conocer posibles relaciones estructura actividad, así como la potencia antioxidante de las sustancias evaluadas. Para determinar la concentración del radical **DPPH** en los ensayos subsiguientes, se empleó la curva de calibración que se

muestra en la Ecuación 6-1.

$$Abs_{515\text{ nm}} = 9,55 \times 10^{-3}[DPPH^*] + 1,21 \times 10^{-2} \quad (6-1)$$

Cuantificación del poder captador de radicales libres a través de la determinación de la concentración efectiva media (CE₅₀). Se preparó una solución Stock de **DPPH** en etanol a partir de aproximadamente 5 mg de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo sólido que fueron llevados a 100,00 mL en un matraz aforado. La concentración real de esta disolución se determinó midiendo la absorbancia a 515 nm y aplicando la Ecuación 6-1.

Para determinar la concentración efectiva media de los extractos de **HL** se adicionan volúmenes variables de disoluciones etanólicas de los extractos para obtener 10 relaciones de masa Extracto/DPPH entre 0,1 y 10, estas se llevan a un volumen de 3,5 mL y para iniciar la reacción se adicionan 1,5 mL de la solución Stock de **DPPH**. Los blancos de reacción se preparan con 1,5 mL de la solución Stock de DPPH y se completan a 5 mL con etanol.

Por su parte, para los compuestos se hace un procedimiento similar, se adicionan volúmenes variables de diluciones de los compuestos obtenidos (3 µg/mL - ca. 15 µM y 500 µg/mL - 2200 a 3115 µM según el compuesto), con el fin de obtener 10 relaciones de concentración Compuesto/DPPH entre 0,01 y 40. Se lleva a un volumen de 3,2 mL y para iniciar la reacción se agregan 800 µL de la solución Stock de **DPPH**. Los blancos se prepararon con 800 µL llevados a 4000 µL (4,0 mL) con etanol.

Al momento de adicionar el Stock de **DPPH** se registra la hora de inicio para cada una de las soluciones usando como referencia la Hora Legal Colombiana (<http://horalegal.inm.gov.co>) y se mide la absorbancia a 515 nm de las muestras aproximadamente cada 2 horas, tomando la hora al momento de medir, durante 3 días para los extractos y 2 días para los compuestos hasta que la absorbancia alcance una tendencia lineal constante (Estado estacionario).

Para cada sistema en el estado estacionario se determinó mediante la relación de absorbancias entre muestra y los blancos en cada uno de los tiempos, se determina el porcentaje de **DPPH** remanente para cada muestra. (Ecuación 6-2) Donde $[DPPH^*]_t$ es la concentración en el tiempo t y $[DPPH^*]_0$ es la concentración del blanco de DPPH para el mismo tiempo.

$$\% \text{ Remanente } \mathbf{DPPH} = \frac{[DPPH^*]_t}{[DPPH^*]_0} \times 100 \quad (6-2)$$

A partir de los valores obtenidos de % Remanente de **DPPH** se realizó una curva entre este porcentaje y la relación de concentración de cada uno de los sistemas. Posteriormente, se determinó la función que presenta el mejor ajuste para cada sistema y con esto se calculó el poder captador de radicales libres expresado como concentración efectiva media (CE₅₀). La CE₅₀ se define como la relación de concentración de la muestra evaluada (extracto/sustancias) necesaria para que la concentración de radical **DPPH** se reduzca en un 50% respecto a su concentración inicial [Antolovich et al., 2002; Huang et al., 2005]. Por lo tanto, un menor valor de CE₅₀ indica que el extracto o compuesto evaluado tiene un mayor poder captador de radicales libres.

De igual forma, para poder comparar la actividad captadora de radicales libres con otros estudios de sustancias líquénicas y de extractos se determinó el porcentaje de captación de radicales o actividad captadora (Ecuación

6-3) a partir del porcentaje remanente a una concentración de 200 o 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ según el compuesto. Un mayor porcentaje indica que la sustancia es más activa como captador de radicales [Huang *et al.* 2005].

$$\% \text{ Actividad Captadora (Concentración)} = 100 \left(1 - \frac{[DPPH^*]_t}{[DPPH^*]_0} \right) \quad (6-3)$$

$$\% \text{ Actividad Captadora (Concentración)} = 100 - \% \text{ Remanente DPPH}$$

Determinación de la reactividad para captación de radicales libres Para determinar la reactividad de los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*, se llevó a cabo un estudio cinético de la reacción con el radical **DPPH**, mediante el método de aislamiento reportado por Mishra *et al.* [2012] & Rojas *et al.* [2015]. Este método requiere el uso de altas concentraciones de todos los reactivos, excepto uno, para asegurar que la velocidad de la reacción dependa únicamente del reactivo que esté presente en menor concentración [Logan. 2000].

Se consideraron relaciones de concentración Antioxidante:DPPH superiores a 1:1 (5:1, 10:1, 20:1 y 40:1), con el propósito de determinar la constante de velocidad aparente (k_{obs}). La cinética de esta reacción es de primer orden tanto para el **DPPH**, como para la especie antioxidante; en consecuencia, el orden global de la reacción es dos y nos permite expresar la Ley de Velocidad de la reacción de la siguiente forma (Ecuación 6-4) [Rojas *et al.* 2015].

$$V = K_2[DPPH^*][AntiOx] \quad \text{Ley de Velocidad.} \quad (6-4)$$

Cuando la concentración de la especie antioxidante es significativamente mayor a la de **DPPH**, es posible asumir que el cambio en la concentración de la especie antioxidante en el tiempo es despreciable y, por tanto, la concentración de la especie antioxidante se mantiene constante. Lo que modifica la Ley de Velocidad de esta manera (Ecuación 6-5).

$$V = K_2[DPPH^*][AntiOx]$$

$$\text{Donde: } [AntiOx] = \text{Constante}$$

$$\text{Y: } k_{\text{obs}} = K_2[AntiOx]$$

$$\text{Quedando:} \quad (6-5)$$

$$V = k_{\text{obs}}[DPPH^*]$$

$$\frac{\Delta[DPPH^*]}{\Delta t} = k_{\text{obs}}[DPPH^*]$$

La velocidad de reacción adopta un comportamiento de *pseudo*-primer orden, que depende exclusivamente del cambio en la concentración del **DPPH**. Por lo que para determinar la concentración de **DPPH** en cualquier tiempo t se integra ecuación previa, obteniéndose:

$$[DPPH^*]_t = [DPPH^*]_0 e^{-k_{\text{obs}} t} \quad (6-6)$$

Aquí, k_{obs} representa la constante de velocidad aparente para la reacción y $[DPPH^*]_0$ corresponde a la concentración inicial de **DPPH**. Esta ecuación puede ser linealizada mediante el uso del logaritmo natural. En tal caso, la pendiente de la curva resultante resulta ser la constante de velocidad aparente (k_{obs}), bajo

condiciones de temperatura constante (Ecuación 6-7).

$$\ln[DPPH^*]_t = \ln[DPPH^*]_0 - k_{\text{obs}} t \quad (6-7)$$

A partir de la constante de velocidad aparente (k_{obs}), es posible determinar la constante de velocidad de segundo orden (K_2). Al dividir la constante de velocidad aparente por la concentración inicial del antioxidante empleada en cada ensayo (Ecuación 6-8).

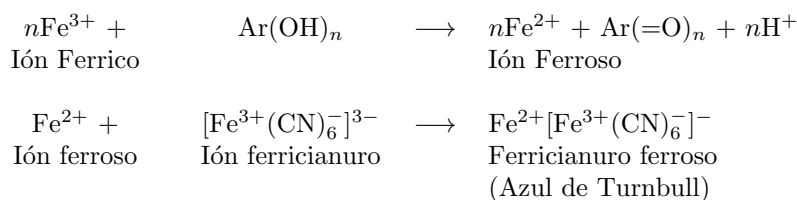
$$K_2 = k_{\text{obs}}/[AH]_0 \quad (6-8)$$

La constante de velocidad de segundo orden (K_2) es un indicador de la reactividad del compuesto. A mayor valor de esta constante, el compuesto ensayado es más reactivo ante especies radicalarias [Brand-Williams *et al.*, 1995].

Poder reductor férrico (FRAP)

Los iones metálicos suelen estar en muy bajas concentraciones en el medio celular, en especial cuando catalizan reacciones de oxido-reducción. En el caso del ion ferroso y del ion férrico, estos hacen parte de la reacción de Fenton para la formación del radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno [Björn, 2008, pp. 516]. El poder reductor férrico (**FRAP**) permite cuantificar de forma indirecta la capacidad reductora de un compuesto antioxidante. Según Berker *et al.* [2007] existen al menos 6 métodos que emplean la reducción del ión férrico para formar complejos coloreados que se determinan espectrofotométricamente, ya sea con fenantrolinas, 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina o el método del ferricianuro (Figura 6-2).

Reacción 1: Reducción directa



Reacción 2: Reducción indirecta

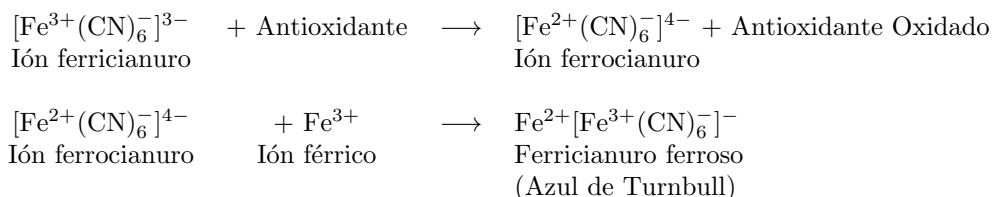


Figura 6-2: Reacción de formación del ferricianuro ferroso (Azul de Turnbull o Azul de Prusia) en presencia de un compuesto antioxidante. Adaptado de Berker *et al.* [2007]

En el presente trabajo, se determinó el poder reductor férrico de los extractos acetónicos, los compuestos aislados de *L. sipmanii* y los controles (**BHT** y ácido gálico) mediante la formación de un complejo coloreado

de ferricianuro con el ion ferroso (Azul de Turnbull, $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]^-$) en exceso estequiométrico del ferricianuro en relación con los antioxidantes, cuya concentración se mide espectrofotométricamente a $\lambda_{Abs} = 700 \text{ nm}$. A mayor cantidad de complejo formado, mayor absorbancia y en consecuencia, mayor capacidad reductora tiene la sustancia o extracto [Sharma & Kalikotay. 2012]. Para ello se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones de los extractos, de las sustancias liquénicas (10, 50, 100 & 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de antioxidantes comerciales. Se toma 1,0 mL de esta disolución y se mezcla con 2,5 mL de solución amortiguadora de fosfatos $\text{pH} = 6,6$ y con 2,5 mL de ferricianuro de potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), la mezcla deja en reposo a temperatura ambiente por 20 min. Luego se le adiciona 2,5 mL de ácido tricloroacético al 10 % y se centrifuga a 3000 rpm por 10 min. Se toman 2,5 mL del sobrenadante se llevan a 5,0 mL con agua destilada y luego se adiciona 0,5 mL de solución de cloruro férrico al 0,1 % y se determina la absorbancia a 700 nm pasados 30 min [Berker et al.. 2007].

Inhibición de la peroxidación lipídica

Los lípidos poliinsaturados en lipoproteínas y membranas celulares son altamente sensibles al daño causado por el estrés oxidativo. Esto se debe a que las **EROs** pueden abstraer los protones de los grupos metileno alílicos de estos ácidos grasos. Entre mayor sea el grado de insaturación del ácido graso, más fácil es abstraer dichos protones. El radical dienilo originado puede rearrreglarse posteriormente para dar lugar a un dieno conjugado (Figura 6-3). Esta especie puede reaccionar en condiciones aerobias con el dióxígeno, generando radicales peroxilo lipídicos que pueden abstraer átomos de hidrógeno de otro ácido graso insaturado (Etapas de propagación) y simultáneamente generar hidroperóxidos lipídicos [Gutteridge & Halliwell. 1990; Halliwell & Chirico. 1993; Moore & Roberts. 1998]. Estos hidroperóxidos lipídicos son los principales productos de los procesos de peroxidación [Moore & Roberts. 1998].

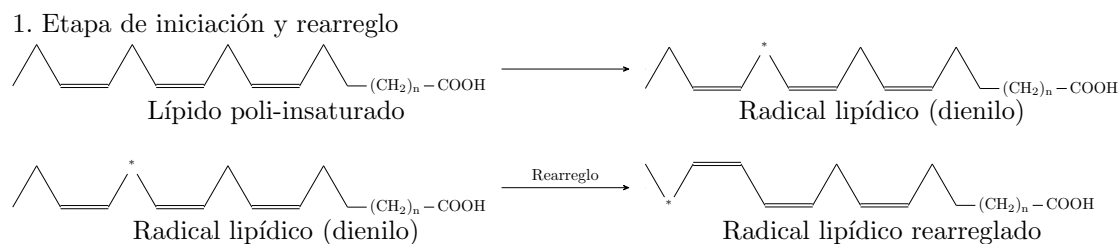
En este ensayo se determina de manera indirecta la formación de hidroperóxidos lipídicos, los cuales oxidan al ion ferroso a ion férrico el cual se compleja con el ion tiocianato para dar un complejo coloreado vino tinto ($\lambda_{Abs} = 500 \text{ nm}$) (Figura 6-3). Se prepararon soluciones stock del extracto y compuestos aislados de *L. sipmanii* (50, 100, 200 y 500 ppm) en **EtOH** y una alícuota de estas disoluciones (250 μL) se mezcló con buffer de fosfatos (1,0 mL - 0,2 M - $\text{pH} 7,0$) y emulsión de ácido linoleico con tween 20 (1,25 mL - 0,02 M) en un frasco ámbar. Se prepararon 3 blancos control (mezcla de reacción, en ausencia de compuestos a evaluar). Estas mezclas se incubaron a $37,0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ y a las 24, 48 y 72 horas, se tomó una alícuota (100 μL) de estas y se le adicionó 4,7 mL de **EtOH** al 75 %, 100 μL de tiocianato de amonio (30,0 % p/v) y 100 μL de cloruro ferroso (1,0 % p/v en HCl, 3,5 % p/v) para medir su absorbancia a los 30 min.

Con los valores de absorbancia se calcularon los porcentajes de inhibición de peroxidación del ácido linoleico (% IPL) de acuerdo con la Ecuación 6-9.

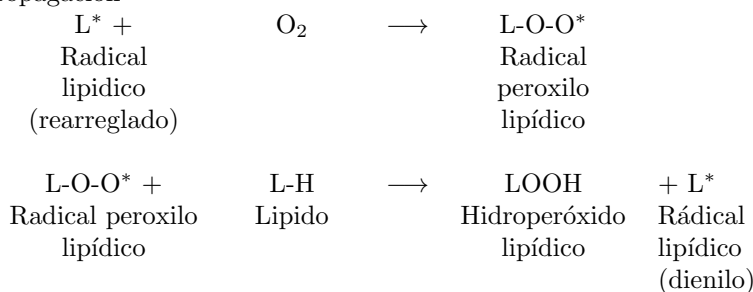
$$\% \text{ IPL} = 1 - \left(\frac{A_m}{A_b} \times 100 \right) \tag{6-9}$$

Donde: A_m es la absorbancia de la muestra ensayada.

A_b es la absorbancia del blanco.



2. Etapas de propagación



3. Detección de los hidroperóxidos formados

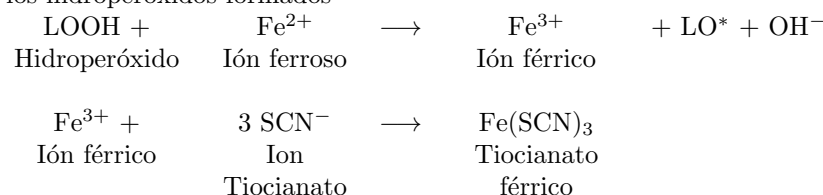


Figura 6-3: Etapas de la formación de hidroperóxidos lipídicos y su cuantificación. Adaptado de *Gutteridge & Halliwell* [1990], *Halliwell & Chirico* [1993] & *Moore & Roberts* [1998]

El porcentaje de inhibición de la peroxidación se reportó como el promedio de las determinaciones realizadas. Valores más cercanos al 100 % son indicativos de una mayor inhibición de la peroxidación y, por ende una mejor capacidad de protección del extracto o la sustancia evaluada.

6.3.3 Determinación de la actividad fotoprotectora

Lugar de realización y equipos Para las mediciones espectrofotométricas en **UV** y visible se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu Pharmaspec UV-1700 (Shimadzu, Kyoto, Japan) del laboratorio 126 del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá DC. Mientras que la toma de los espectros infrarrojos cercanos (**NIR**) se realizó en el laboratorio de microscopía electrónica y espectroscopía infrarroja cercana **NIR** del Departamento de Física de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá DC con el espectrofotómetro Cary 5000 (Santa Clara, California, EE.UU).

Actividad fotoprotectora frente a la radiación UV-B

Factor de Protección Solar (FPS) - in vitro La **FDA** define el factor de protección solar como la relación numérica entre la mínima dosis que causa eritema (**MDE**) en una piel protegida con un filtro o una pantalla

solar aplicada a una densidad de 2 mg / cm² y la mínima dosis que causa eritema en una piel desprotegida, este es el método más aceptado para medir la efectividad de las sustancias fotoprotectoras [Nash *et al.* 2006; Schalka & Silva dos Reis. 2011] (Ecuación 6-10). Según el **FPS** los fotoprotectores se clasifican en 4 categorías: Máximo **FPS** ≥ 50, alto si 30 < **FPS** < 50, moderado 15 < **FPS** < 30 y bajo si **FPS** ≤ 15 [Schalka & Silva dos Reis. 2011].

$$FPS = \frac{MDE_{\text{protegida}}}{MDE_{\text{desprotegida}}} \quad (6-10)$$

De otra parte, Manzur *et al.* [1986] propuso una ecuación (Ecuación 6-11) que permite hacer estudios *in vitro* mediante técnicas de espectrofotometría UV - visible y con ellos determinar el factor de protección solar *in vitro* [Dutra *et al.* 2004; Millot *et al.* 2012].

$$FPS_{\text{espectrofotométrico}} = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (6-11)$$

Donde Abs (λ) es la absorbancia a esa longitud de onda del compuesto al que se le pretende analizar la actividad fotoprotectora, $EE \times I$ es un factor que es constante, fue determinado por Sayre *et al.* (1979) y se muestra en la Tabla 6-6 [Dutra *et al.* 2004]. La principal limitación de este método espectrométrico es que el valor máximo de **FPS** que se puede obtener es 40, esto sucede cuando se alcanza valores de absorbancia de 4 para cada una de las longitudes de onda antes relacionadas.

Tabla 6-6: Factores normalizados necesarios en el calculo del FPS por métodos espectrofotométricos. Tomado de Dutra *et al.* [2004]

Longitud de onda (λ - 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	1,0000

EE: Espectro de efecto eritema; I: Espectro de intensidad solar

La medición espectrofotométrica se realizó por triplicado a disoluciones etanólicas a 10, 50, 100 y 200 μg/mL del extracto, los compuestos obtenidos y los controles (**BMT**, **BP-3**, **OMC- EHMC** y **AVO**), se midió la absorbancia entre 290 y 320 nm a intervalos de medición de 5 nm en celdas de cuarzo de 1 cm, empleando etanol como blanco. Con los datos de absorbancia obtenidos se aplica la Ecuación 6-11 para el cálculo de **FPS** [Dutra *et al.* 2004; Millot *et al.* 2012].

Actividad fotoprotectora frente a la radiación UV-A

Longitud de Onda crítica (λ_{crit}) La longitud de onda crítica (λ_{crit}) evalúa la amplitud espectral del efecto fotoprotector de una sustancia, particularmente en la región UV-A. [Diffey. 1994; Garoli *et al.* 2008] Se define como la longitud de onda por debajo de la cual un filtro solar absorbe el 90 % de la radiación solar en el rango UV (290 nm a 400 nm) para lo cual se siguió la metodología de Millot *et al.* [2012], empleando como controles los siguientes compuestos **BMT**, **BP-3**, **OMC- EHMC** y **AVO**.

Se prepararon disoluciones de las muestras a evaluar a 10, 50, 100 y 200 μg/mL en etanol, se determinó su

absorbancia en la región **UV** con intervalos de 1 nm entre 290 y 400 nm, utilizando celdas de cuarzo de 1 cm y **EtOH** como blanco. Con estos datos y empleando la Ecuación 6-12, se calculó el área bajo la curva en dicho intervalo y se obtuvo la λ_{crit} . Este parámetro se presenta como el resultado del promedio de tres réplicas independientes.

$$\int_{290 \text{ nm}}^{\lambda_{\text{crit}}} Abs(\lambda) d\lambda = 0,9 \times \int_{290 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} Abs(\lambda) d\lambda \quad (6-12)$$

La longitud de onda crítica se utiliza como uno de los criterios de clasificación de los protectores solares, para definir el grado de protección en el UV-A. *Diffey* [1994] & *Federal Drug Administration* [2019] separa los protectores solares en 5 categorías según la λ_{crit} : 0 si $\lambda_{\text{crit}} < 325$ nm; 1 si $325 \leq \lambda_{\text{crit}} < 335$ nm; 2 si $335 \leq \lambda_{\text{crit}} < 350$ nm; 3 si $350 \leq \lambda_{\text{crit}} < 370$ nm; 4 si $\lambda_{\text{crit}} \geq 370$ nm. A mayor valor de longitud de onda crítica, mayor la capacidad fotoprotectora de la sustancia frente a la radiación UV-A.

Relación UV-A/UV-B (UV- r^*) La relación UV-A/UV-B (UV- r^*) también es un parámetro de amplitud espectral y permite establecer la capacidad fotoprotectora de una sustancia frente a radiación UV-A [*Garoli et al.* 2008; *Millot et al.* 2012]. Para su determinación se emplean las mismas soluciones y metodología que se usaron para determinar la longitud de onda crítica y se siguió la metodología de *Springsteen et al.* [1999]. Para calcular UV- r^* se recurrió a la Ecuación 6-13, que requiere evaluar las áreas bajo la curva de los espectros de absorbancia previamente obtenidos en el ensayo anterior con respecto a la longitud de onda (λ) entre 320 nm a 400 nm (σ UV-A) y entre 290 nm a 320 nm (ρ UV-B). Los resultados son el promedio de tres determinaciones realizadas de manera independiente.

$$UV - r^* = \frac{\int_{320 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} Abs(\lambda) d(\lambda)}{\int_{290 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} Abs(\lambda) d(\lambda)} = \frac{\sigma \text{ UV-A}}{\rho \text{ UV-B}} \quad \frac{\sigma \text{ UV-A}}{\rho \text{ UV-B}} = \frac{\int_{320 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} Abs(\lambda) d(\lambda)}{\int_{290 \text{ nm}}^{400 \text{ nm}} Abs(\lambda) d(\lambda)} \quad (6-13)$$

De acuerdo con el valor UV- r^* el grado de fotoprotección de las sustancias frente a la radiación UV-A es: $0,0 < 0,2$ “no protege”; $0,2 < 0,4$ “moderada”; $0,4 < 0,6$ “buena”; $0,6 < 0,8$ “superior” y $UV - r^* \geq 0,8$ “máximo” [*Springsteen et al.* 1999].

Relación UV-A1/UV La **FDA** define que para el cálculo de la relación UVA-1/UV se requiere el área espectral obtenida entre 340 nm y 400 nm (UVA-1) y el área total de las regiones UV-A y UV-B, que va entre 290 y 400 nm, como se muestra en la Ecuación 6-14 [*Baby et al.* 2009; *Hojerová et al.* 2011; *Federal Drug Administration.* 2019].

$$\frac{a\text{UVA-1}}{\lambda} = \frac{5}{3} \left[\frac{Abs_{290 \text{ nm}} + Abs_{400 \text{ nm}} + (4 \times \sum_{\lambda=295}^{\lambda=395} Abs_{\lambda}) + (2 \times \sum_{\lambda=300}^{\lambda=390} Abs_{\lambda})}{60} \right]$$

$$\frac{a\text{UV}}{\lambda} = \frac{5}{3} \left[\frac{Abs_{290 \text{ nm}} + Abs_{400 \text{ nm}} + (4 \times \sum_{\lambda=295}^{\lambda=395} Abs_{\lambda}) + (2 \times \sum_{\lambda=300}^{\lambda=390} Abs_{\lambda})}{110} \right] \quad (6-14)$$

$$\text{Relación} \left(\frac{\text{UVA-1}}{\text{UV}} \right) = \frac{\frac{a\text{UVA-1}}{\lambda}}{\frac{a\text{UV}}{\lambda}}$$

Según los criterios de la **FDA** [*Federal Drug Administration*. 2019, pp. 6207] la relación UVA-1/UV debe ser mayor de 0,7 o superior para que un filtro solar sea considerado como de amplio espectro, junto con una $\lambda_{\text{crítica}} \geq 370$ nm y un FPS ≥ 15 (Tabla 6-7).

Tabla 6-7: Efectividad de los filtros solares ante la radiación UV-A. [*Baby et al.*. 2009; *Hojerová et al.*. 2011]

	Bajo	Medio	Alto	Muy alto
Relación UVA-1/UV	0,20 - 0,39	0,40 - 0,69	0,70 - 0,95	$\geq 0,95$
λ_{crit} (nm)	325 - 335	335 - 350	350 - 370	≥ 370
Clasificación UVA	0,20 - 0,39	0,40 - 0,69	0,70 - 0,95	$\geq 0,95$

Fotoprotección en el Infrarrojo cercano - NIR

Desde la década de los 2010 los protectores solares comenzaron a incluir la declaración (*claim*) de absorción en esta región del espectro electromagnético [*Grether-Beck et al.*. 2014]. Aún no se han desarrollado filtros solares en el **IR** y los filtros **UV** disponibles no ofrecen adecuada fotoprotección en el **NIR** [*Horton et al.*. 2023; *Kaufman et al.*. 2023]. De hecho, un aspecto que agrava la situación es que hasta el momento la protección ante la luz **IR** solo se basa en la actividad antioxidante de los compuestos, pero no en el filtrado o absorción de esta radiación electromagnética. Solamente las pantallas solares o filtros inorgánicos a base de óxidos de hierro y titanio son capaces de filtrar la luz **IR**, pero su aceptabilidad en cosméticos es limitada debido a su apariencia opaca [*Horton et al.*. 2023].

La radiación **IR-A** (760 - 1 400) nm causa el eritema *ab igne*, aumenta la expresión de MMPs, promueve la generación de especies reactivas que aumentan el estrés oxidativo y está relacionada con la fotocarcinogénesis provocada por la radiación **UV**, ya que disminuye la apoptosis de las células dañadas. Por otro lado, el **NIR** es principalmente responsable de los efectos de fotoenvejecimiento de la piel [*Schroeder et al.*. 2008a; *Sondenheimer & Krutmann*. 2018; *Horton et al.*. 2023]. Esta región del espectro también constituye un factor de riesgo para ciertos tipos de **CPTNM**, como el cáncer de células escamosas y el carcinoma de células de Merkel [*Horton et al.*. 2023].

Los espectros se midieron en el espectrofotómetro Cary 5000 que permite medir hasta longitudes de onda de 2 500 nm. En el caso de los compuestos sólidos (Compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* y los controles **BMT**, **BP-3** y **AVO**), se tomó una muestra de aproximadamente 10 mg de la sustancia que fueron impregnados con una pequeña cantidad de solvente volátil (Cloroformo) en 100 mg de cristales de bromuro de potasio (KBr) seco, luego se dejó secar en estufa a 40 °C por una hora y se almacenaron en desecador. Para las sustancias líquidas (**OMC - EHMC**), el espectro se tomó directamente a partir de una alícuota de la sustancia en una celda espectrofotométrica de cuarzo de 1 cm.

Se emplea este procedimiento debido a que en los espectros **NIR** (780 nm - 2 500 nm o $12\ 820\ \text{cm}^{-1}$ - $4\ 000\ \text{cm}^{-1}$) se observan bandas de absorción asociadas a los sobretonos y bandas de combinación de las vibraciones de cualquier enlace que involucre átomos de hidrógeno, como es el caso de los enlaces C-H, O-H, N-H. De igual forma, los grupos carbonilo (C=O) presentan intensas absorciones en esta región del espectro (Tabla 6-8) [*Siesler et al.*. 2001; *Davies & Grant*. 1987; *Workman & Shenk*. 2004]. Por lo tanto, la mayoría de los disolventes orgánicos comunes presentan intensas absorciones en esta región del espectro, que

interfieren con la absorción de los compuestos de la muestra.

Tabla 6-8: Asignaciones tentativas en el Infrarrojo Cercano (**NIR**). Adaptado de *Davies & Grant* [1987]

λ (nm)	Constituyente	Asignación	λ (nm)	Constituyente	Asignación
1 200	Porción Alifática	C-H	1 980	Proteínas	N-H
1 440	Agua, carbohidratos, alcoholes	O-H	2 080	Carbohidratos, Alcoholes	O-H
1 730	Porción Alifática	C-H	2 180	Carbonilos	C=O
1 780	Porción Alifática	C-H	2 320	Porción Alifática	C-H
1 940	Agua, alcoholes	O-H	2 350	Porción Alifática	C-H

6.3.4 Análisis estadístico

Los ensayos antes descritos se realizaron con 2 o 3 réplicas, según el caso y se reportaron los promedios obtenidos \pm la desviación estándar (**SD**). Para descartar datos, se aplicó el criterio de Z-Score ($Z = 1$) en donde fuese requerido. Para la comparación de grupos se utilizó un análisis de varianza (**ANOVA**) a una vía, previa verificación de los supuestos estadísticos pertinentes. La normalidad se evaluó con la prueba de Shapiro-Wilk (p -valor $> 0,05$) y la homocedasticidad con el test de Bartlett o de Levene (p -valor $> 0,05$). En aquellos casos donde los supuestos no se cumplían, se aplicó la transformación Box-Cox previo al **ANOVA**, si los datos transformados continuaron con problemas de homocedasticidad se aplicó un **ANOVA** de Welch. Los resultados del **ANOVA** fueron complementados con la prueba de Tukey para identificar los grupos que presentaron diferencias estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$). Las pruebas estadísticas y los gráficos (Apéndice E) se realizaron en el Programa R-Studio versión 2023.06.1 Compilado 524 y R versión 4.3.0.

6.3.5 Lipofilicidad y permeabilidad dérmica

La porción más externa de la piel o estrato córneo se compone principalmente una matriz de lípidos que rodea componentes celulares inertes, conocidos como corneocitos o escamas [Norlén. 2003; Baran & Maibach. 2010]. Esto puede asemejarse a una pared de ladrillos, donde los ladrillos son impermeables y corresponden a los corneocitos. Mientras que el cemento es la matriz lipídica que los rodea (Figura 6-4). Por esta razón, los compuestos deben tener un adecuado balance que les permita solubilizarse en esa matriz lipídica y a la vez ser lo suficientemente solubles en agua para poder ser empleados en productos cosméticos.

El coeficiente de reparto permite determinar la lipofilicidad de las sustancias mediante la cuantificación del reparto entre una fase acuosa y una hidrofóbica. Este se define como la relación de las concentraciones en equilibrio de un soluto disuelto en un sistema bifásico de dos solventes inmiscibles, usualmente *n*-octanol y agua (Ecuación 6-15).

$$P = \frac{[Soluta]_{octanol}}{[Soluta]_{agua}} \quad (6-15)$$

Experimentalmente se realiza mediante la disolución de la sustancia en el sistema bifásico, luego se determina la cantidad del soluto que está en cada una de las fases. Sin embargo, actualmente es posible obtenerlo

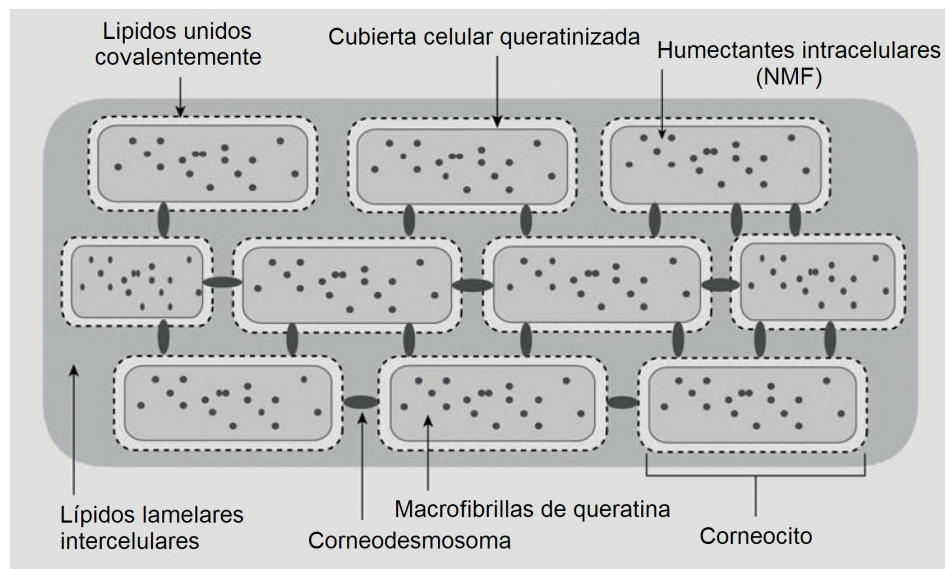


Figura 6-4: Modelo bloques y cemento (*Bricks and mortar*) que explica la estructura del estrato córneo. Adaptado de *Baran & Maibach* [2010]

mediante cálculos *in silico*. En el presente trabajo los valores de coeficiente de reparto de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* se calcularon usando el programa ACD log P versión 1994 - 2002 y los motores ChemSpider, e-Molecules y PubChem suministrados por el software ChemSketch (ACD Labs).

Una vez calculado el coeficiente de reparto, es posible obtener la favorabilidad energética que tienen los compuestos para pasar de una fase acuosa a una fase orgánica en condiciones de equilibrio a temperatura constante. A esto se le denomina energía libre de Gibbs de transferencia ($\Delta_t \bar{G}_{O \rightarrow W}^\theta$ - Ecuación 6-16).

$$\Delta_t \bar{G}_{O \rightarrow W}^\theta = -RT \ln P$$

Donde:

$$\begin{aligned} \Delta_t \bar{G}_{O \rightarrow W}^\theta & \text{ Energía libre de Gibbs de transferencia (kJ mol}^{-1}\text{)} \\ R & \text{ Constante de los gases ideales (J mol}^{-1}\text{ K}^{-1}\text{)} \\ T & \text{ Temperatura absoluta del sistema (K)} \\ P & \text{ Coeficiente de Reparto} \end{aligned} \quad (6-16)$$

En este caso, valores negativos de $\Delta_t \bar{G}_{O \rightarrow W}^\theta$ indican que es posible que los compuestos presenten permeabilidad por difusión pasiva a través de las capas de la piel.

6.3.6 Determinación *in silico* del potencial de bioacumulación y la potencial toxicidad acuática de los compuestos aislados.

La mayoría de las sustancias fotoprotectoras actuales, como el **OMC - EHMC**, **BP-3**, **AVO**, derivados del alcanfor, entre otras; generan preocupación ambiental al terminar en las aguas superficiales después de su uso en **PPCPs**. Estos compuestos afectan ecosistemas riparios y marinos debido a su elevada residualidad, grado

de bioacumulación y efectos disruptores endocrinos en diversos organismos acuáticos [Voutchkova-Kostal et al. 2012; Wang et al. 2016; Kar et al. 2020; Huang et al. 2021]. En la actualidad, se puede abordar la ecotoxicidad con un menor gasto de tiempo, recursos y experimentación animal [Zhou et al. 2021]; esto mediante el uso del coeficiente de reparto ($\log P$) en cálculos *in silico* para evaluar la potencial toxicidad sobre organismos acuáticos, relaciones estructura-toxicidad y el potencial de bioacumulación en estos.

La agencia para la protección ambiental de los EE. UU (US - Environmental Protection Agency) ha desarrollado una herramienta (ECOSAR) que permite, a partir del coeficiente de reparto, predecir la potencial peligrosidad y toxicidad de una sustancia. En este trabajo, se determinó la toxicidad para varias clases de organismos acuáticos usando ECOSAR Application v2.2 (2021) [Mayo-Bean et al. 2012]. Las estructuras de los filtros comerciales y de los compuestos liquénicos aislados se ingresaron al programa ya sea por dibujo, o mediante notación SMILES. Una vez introducidos, el programa calculó la toxicidad expresada como concentraciones efectivas medias (CE_{50}) o como dosis letales (LD_{50}) para diversos tipos de organismos acuáticos.

Además, se analizó el potencial de bioacumulación de los fotoprotectores comercialmente disponibles y las sustancias liquénicas aisladas. La bioacumulación suele estar relacionada de forma directa y lineal con el coeficiente de reparto ($K_{ow} - \log P$). A partir de esta relación, se define el Factor de Bioacumulación o **BCF** como: La tasa de concentración de una sustancia en un organismo con respecto a la concentración de la sustancia en agua en equilibrio termodinámico. Este factor se puede calcular mediante modelos bilineales a partir del coeficiente de reparto con aceptable precisión (Ecuación 6-17) [Bintein et al. 1993; Wen et al. 2012]. El Parlamento Europeo [2001] considera como sustancias peligrosas aquellas que no sean inherentemente biodegradables, con valores de $\log BCF \geq 4$ y toxicidad aguda < 1 mg/L. Para calcular el **BCF**, el valor de coeficiente de reparto y su desviación estándar calculado en la Sección 6.3.5 se introduce en la Ecuación 6-17.

$$\log BCF = a \log P - b \log(\beta P + 1) + c$$

$$\log BCF = 0,910 \log P - 1,975 \log(6,8 \times 10^{-7} P + 1) - 0,786 \quad (6-17)$$

Donde a , b y c son términos lineales y

β es la relación de volumen entre las fases acuosas y lipídicas

Se espera que las sustancias novedosas encontradas en *Lobariella sipmanii* tengan el potencial de ser consideradas como candidatos ya sea a fármacos o a activos cosméticos. Ello implica no solo mostrar una mejor actividad fotoprotectora, sino también ser menos peligrosas para el medio ambiente y poseer menor potencial de bioacumulación en los organismos vivos en comparación con las sustancias comerciales actualmente disponibles.

7 Resultados y discusión

7.1 Selección de *Lobariella sipmanii* como especie objeto de estudio

Lobariella sipmanii fue seleccionada para su estudio a partir de los resultados del tamizaje llevado a cabo sobre varios extractos acetónicos de **HL** del páramo de Sumapaz. Inicialmente, se realizaron las reacciones de coloración descriptivas para **HL**, estas reacciones dan indicios de los posibles compuestos mayoritarios (Tabla 7-1). *Masuch* [1993] señala que la formación de una reacción amarilla con p-fenilendiamina (Reactivo P) indica la posible presencia de sustancias liquénicas con grupos carbonilo unidos al anillo aromático. Esta coloración se observó en los talos de *Lobariella sipmanii*, *Cladonia didyma* y *Peltigera*. Además, los talos de *Lobariella sipmanii*, *Thamnolia vermicularis* y *Everniastrum* sp tuvieron coloración amarilla en presencia del reactivo K, posiblemente indicando la presencia de dépsidos y depsidonas [*Masuch*. 1993].

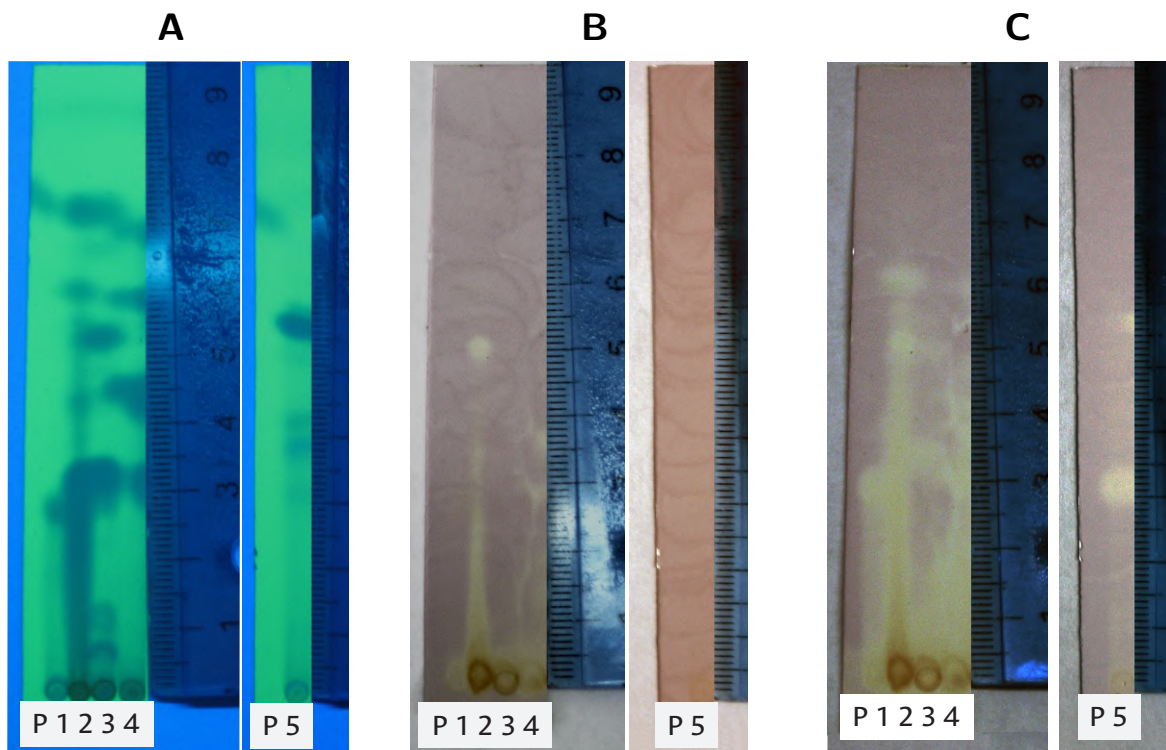
Tabla 7-1: Coloraciones obtenidas con los reactivos P, K; C & KC para *Lobariella sipmanii* proveniente del páramo de Sumapaz

Especie	Reactivos				Posibles compuestos presentes según <i>Masuch</i> [1993]
	P	K	C	KC	
<i>Lobariella sipmanii</i>	+	+	-	+	Atranorina & ácido lobárico

En contraste, *Thamnolia* presentó una coloración anaranjada con este reactivo y reacción negativa con el hipoclorito de sodio (Reactivo C), lo que sugiere la posible presencia de ácido thamnólico. La mayoría de los extractos dieron reacción amarilla o sin cambio con el reactivo C, excepto *Peltigera neopolydactyla*. Esta reacción junto con la reacción positiva con el reactivo KC podría indicar la presencia de ácido úsnico en esa especie [*Masuch*. 1993]. Por su parte, la coloración rojiza de los talos de *Cladonia didyma* en respuesta al reactivo KC sugiere la posible presencia de ácido lobárico. Además, esta especie presentó coloración rojiza con hidróxido de potasio (Reactivo K). Estas observaciones combinadas a la ya descrita con el Reactivo P podría indicar la presencia de ácido salazínico o norestictico.

Posteriormente, el método bioautográfico en **CCD** de los extractos (Sección 6.1.3) permitió establecer en las placas testigo que los compuestos presentes en los extractos presentan absorción de la radiación **UV** a 254 nm (Figura 7-1 A). Esto se asocia con la presencia de grupos cromóforos en los compuestos de los extractos y sugiere un indicio de posible actividad fotoprotectora y en consecuencia de su potencial como filtro solar. Adicionalmente, en los perfiles **CCD** se notaron diferencias en la cantidad de compuestos presentes, siendo

mayor en la especie *L. sipmanii*. Asimismo, la placa cromatográfica revelada con **DPPH** (Figura 7-1 B). mostró que los extractos de *Lobariella sipmanii* y *Peltigera neopolydactyla* reaccionan de forma inmediata, mientras que *Thamnolia vermicularis*, *Everniastrum cirrhatum* & *Cladonia didyma* reaccionan luego de 20 min (Figura 7-1 C).



Fotografías: David Torres V.

Figura 7-1: Placas cromatográficas del estudio bioautográfico. **A)** Revelado UV a 254 nm. **B)** Revelado **DPPH** inmediato. **C)** Revelado **DPPH** a los 20 min. **Muestras:** **P** - Patrón atranorina, **1** - *Thamnolia vermicularis*, **2** - *Lobariella sipmanii*, **3** - *Everniastrum* sp, **4** - *Peltigera neopolydactyla*, **5** - *Cladonia didyma*.

Por otro lado, los extractos con mayor poder captador de radicales libres de acuerdo con los resultados de concentración efectiva media (CE_{50}) fueron *Cladonia didyma*, *Thamnolia vermicularis* y *Lobariella sipmanii* (Tabla 7-2 & Figura E-1, Anexo). Sin embargo todos fueron menos activos que el patrón antioxidante utilizado (**BHT**). Todos los extractos presentaron diferencias estadísticamente significativas con el **BHT** (p -valor < 0,05 - Tabla E-2, Anexo) y entre sí, excepto *Everniastrum cirrhatum* con *Peltigera neopolydactyla* y *Cladonia didyma* con *Thamnolia vermicularis* (p -valor > 0,05 - Tabla E-2 & Figura E-2, Anexo).

Tabla 7-2: Actividad captadora de radicales libres de extractos acetónicos de algunos **HL** del páramo de Sumapaz.

Extracto	CE_{50} (mg Ext / mg DPPH)	Actividad Captadora a 200 $\mu\text{g/mL}$
BHT	0,1362 (0,0004)	92% (20 $\mu\text{g/mL}$)
<i>Lobariella sipmanii</i>	3,129 (0,133)	85%
<i>Thamnolia vermicularis</i>	1,882 (0,060)	94%
<i>Everniastrum</i> sp	5,921 (0,514)	70%
<i>Peltigera neopolydactyla</i>	5,819 (0,397)	75%
<i>Cladonia didyma</i>	1,813 (0,003)	91%

Con respecto al poder reductor férrico, el **BHT** presentó diferencias estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$ - Figura **E-4**, Anexo) comparado con todos los extractos de **HL** ensayados. Estos últimos mostraron baja actividad reductora férrica a bajas concentraciones y no presentan diferencias significativas (p -valor $> 0,05$) entre sí en concentraciones menores a $100 \mu\text{g/mL}$. A concentraciones de $(200 \text{ y } 500) \mu\text{g/mL}$, los extractos con mayor poder reductor férrico (p -valor $< 0,05$) fueron *C. didyma* y *T. vermicularis*. En segundo lugar, está el extracto de *P. neopolydactyla* que a $500 \mu\text{g/mL}$ presentó diferencias estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$) con *L. sipmanii* y *E. cirrhatum*, ambos con una actividad moderada (Tabla **7-3** - Figuras **E-3** & **E-4**, Anexo). La actividad antioxidante de estos extractos podría atribuirse a la naturaleza fenólica de muchas de las sustancias encontradas en los **HL** [Kosanić *et al.* 2011].

Tabla 7-3: Poder reductor férrico de los extractos acetónicos de algunos **HL** del páramo de Sumapaz.

Muestra \ Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia 700 nm (Desviación Estándar)				
	10	50	100	200	500
BHT	0,3029 (0,0006)	0,8463 (0,0179)	1,1888 (0,0876)	1,6249 (0,0159)	2,4281 (0,0423)
<i>Lobariella sipmanii</i>	0,1687 (0,0121)	0,1763 (0,0101)	0,2057 (0,0096)	0,2496 (0,0130)	0,3899 (0,0149)
<i>Thamnolia vermicularis</i>	0,1744 (0,0121)	0,2312 (0,0298)	0,3518 (0,0198)	0,3712 (0,0202)	0,5694 (0,0148)
<i>Everniastrum sp</i>	0,1682 (0,0107)	0,1771 (0,0038)	0,2106 (0,0108)	0,2297 (0,0086)	0,3496 (0,0177)
<i>Peltigera neopolydactyla</i>	0,1720 (0,0041)	0,1872 (0,0044)	0,2236 (0,0197)	0,2603 (0,0134)	0,4196 (0,0005)
<i>Cladonia didyma</i>	0,1745 (0,0027)	0,2175 (0,0116)	0,2692 (0,0089)	0,3650 (0,0188)	0,6638 (0,0138)

En la evaluación de la actividad fotoprotectora *in vitro*, los filtros solares comerciales utilizados como patrones (**BMT**, **BP3** y **OMC - EHMC**) obtuvieron valores de **FPS** superiores a 30 a una concentración de $50 \mu\text{g/mL}$ y de 40 a $200 \mu\text{g/mL}$, mientras que los extractos de **HL** mostraron un comportamiento dependiente de la concentración (Figura **D-1** & Tabla **D-1**, Anexo). A $200 \mu\text{g/mL}$ los extractos de *Everniastrum cirrhatum*, *Lobariella sipmanii* y *Thamnolia vermicularis* fueron los que obtuvieron los valores más altos de **FPS**: 31,74, 29,25 y 21,19 respectivamente. Seguidos de *Cladonia didyma* ($\text{FPS} = 19,43$) y *Peltigera nepolydactyla* ($\text{FPS} = 8,71$). Resultan promisorios aquellos extractos de **HL** con valores de **FPS** superiores a 15, debido a que esto significa la reducción del eritema causado por la radiación **UV** de un 90%. Mientras que valores superiores a 30 implican en una reducción del eritema de más del 95% [Nash *et al.* 2006] (Figura **7-2 A**).

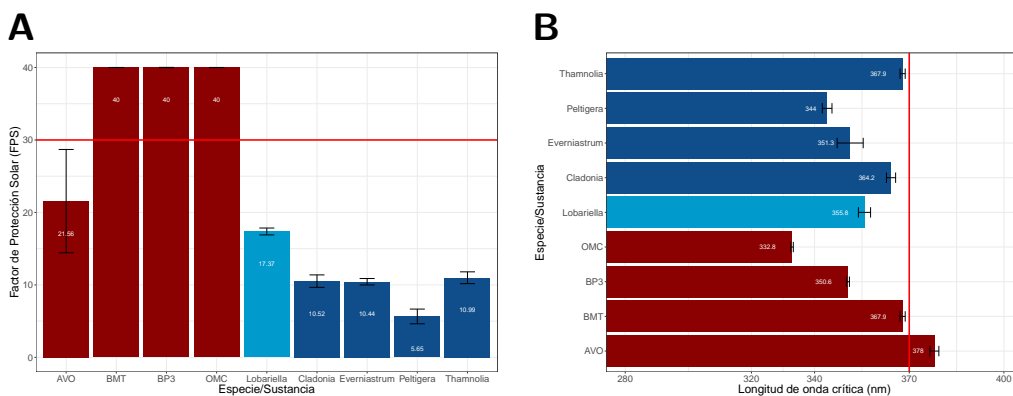


Figura 7-2: Resultados de los parámetros de fotoprotección a $100 \mu\text{g/mL}$ de algunos extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz y los patrones **AVO**, **BMT**, **BP3** & **OMC - EHMC**. **A.** Factor de protección solar (**FPS**) **B.** Longitud de onda crítica (λ_{crit}). En azul celeste se resalta *Lobariella sipmanii*.

Otro criterio crucial en fotoprotección es la amplitud espectral, lo que resulta especialmente relevante al considerar que el 95% de la radiación **UV** incidente es UV-A [Cockell & Knowland. 1999; Diffey. 1994;

Mishra et al., 2011]. El extracto de *Everniastrum cirrhatum* exhibe un grado moderado de protección en el UV-A, mientras que los extractos de *T. vermicularis*, *C. didyma* y *L. sipmanii* presentan una protección UV-A buena (con valores de UV- r^* entre 0,6 y 1,0), con una cobertura entre moderada a buena en el UV-A (R UVA-I entre 0,344 y 0,538) y λ_{crit} entre 348 nm y 367 nm (Figuras **7-2 B**, **D-1**, Anexo & Tabla **D-1**, Anexo).

El ANOVA a una vía sobre los parámetros de fotoprotección se llevó a cabo a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ya que a esta concentración aun se pueden emplear los datos de fotoprotección obtenidos de los espectros UV de los compuestos patrón (**AVO**, **BMT**, **BP3** y **OMC - EHMC**). A partir de los resultados del ANOVA se encontró para el **FPS** que los extractos de *Everniastrum* y *Cladonia* no presentaron diferencias estadísticamente significativas con el extracto de *Thamnia* (p-valor > 0,05 - Figura **E-6 B**, Anexo) Mientras que los demás extractos si presentaron diferencias entre sí y con el filtro solar de amplio espectro **BMT**. En relación con los parámetros de amplitud espectral, *Thamnia* y *Cladonia* no presentaron diferencias en su λ_{crit} (p-valor > 0,05 - Figura **E-6 A**, Anexo). Además, se observa que estas últimas dos especies están muy cerca del límite de 370 nm establecido por la **FDA** para fotoprotectores de amplio espectro. Aunque si difieren de *Lobariella*, cuyo λ_{crit} es de 360 nm. Para la relación UV-A/UV-B y para la relación UV- r^* *Lobariella*, *Everniastrum* y *Cladonia* no presentaron diferencias entre sí (p-valor > 0,05 - Figura **E-6 C**, Anexo). Mientras que para la relación UVA-1/UV, *Lobariella* con *Everniastrum* y *Thamnia* con el **BMT** no presentaron diferencias estadísticamente significativas (p-valor > 0,05 - Figura **E-6 D**, Anexo). Considerando los resultados previos de actividad antioxidante y fotoprotectora, así como el hecho de que las especies *C. didyma* y *T. vermicularis* ya han sido objeto de estudio, se decidió seleccionar a *Lobariella sipmanii* para el presente trabajo.

7.2 Estudio químico de *Lobariella sipmanii*

7.2.1 Obtención de compuestos

El talo seco y pulverizado de *L. sipmanii* se extrajo con **Me₂CO** por maceración estática y dinámica (3 ciclos cada una) hasta agotamiento del material, dando lugar al extracto seco que posteriormente fue sometido a partición líquido-líquido con disolventes de diferente polaridad (éter (E), butanol (B) y agua (A)) conduciendo a 3 fracciones primarias (FE, FB y FA).

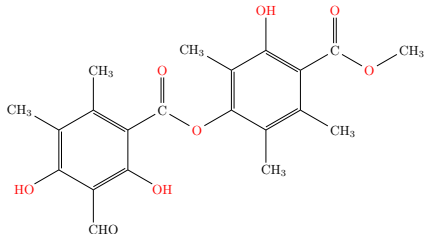
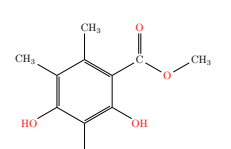
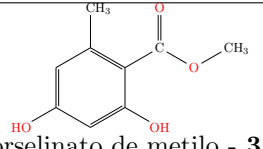
Durante la partición con éter, precipitó un sólido (FSB) que se sometió a **CC-A** (Sección 6.2.5) originando 9 fracciones combinadas (FSB-1 a FSB-9). A partir de la fracción FS-2 se obtuvo a la Pseudociferelina A (**1**) mediante lavado con acetona y recristalización con mezcla **Me₂CO:MeOH** (1:1).

Asimismo, la fracción primaria FE fue sometida a **CC-A** dando lugar a 6 fracciones combinadas (FE-1 a FE-6). A partir de la fracción FE-4 se purificó al 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) por lavado con mezcla **CHCl₃:MeOH** (1:1) y de la FE-5 y la FSB-7 se purificó al orselinato de metilo (**3**) mediante recristalización de **CHCl₃:AcOEt** (9:1).

Las sustancias obtenidas en este estudio son reportadas por primera vez para esta especie. Sin embargo,

el 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) y el orselinato de metilo (**3**) ya han sido reportados para otras especies de *Lobariella* [Perico Franco *et al.* 2015ab; Angulo Castro. 2020]. El compuesto **3** es el metabolito mayoritario en este estudio (Tabla 7-4) .

Tabla 7-4: Compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*

Compuesto	Peso (mg)	% Rendimiento	Fracción de origen
 <p>pseudociferelina A - 1</p>	68,0	2,4	FSB-2
 <p>2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo - 2</p>	52,3	1,8	FE-4
 <p>orselinato de metilo - 3</p>	140,0	4,9	FE-5 y FSB-7

7.2.2 Caracterización estructural de compuestos

Pseudociferelina A - **1**

En el espectro IR (Figura B-1, Anexo) se observan varias bandas de absorción ensanchadas y acopladas en $3\ 377\ \text{cm}^{-1}$ que se extienden hasta cerca de $2\ 500\ \text{cm}^{-1}$ y corresponden a los estiramientos O-H de los múltiples grupos hidroxilo fenólicos. Esto ha sido observado en otras sustancias fenólicas; como, por ejemplo, flavonoides en forma de agliconas como la naringenina y la hesperetina [Krysa *et al.* 2022]. También se aprecian dos señales solapadas a los O-H fenólicos en $2\ 953\ \text{cm}^{-1}$ y $2\ 932\ \text{cm}^{-1}$ que corresponden a los estiramientos C-H simétricos de los grupos metilo. Se observa una banda en $1\ 647\ \text{cm}^{-1}$ correspondiente al estiramiento del enlace C=O de los 2 carbonilos presentes en la molécula. Y las distintas bandas entre $1\ 000$ y $1\ 350\ \text{cm}^{-1}$ corresponden a las flexiones de los distintos enlaces C-O.

Con respecto al espectro de RMN ^1H (Tabla 7-5 - Figura B-2, Anexo) se observaron en total 10 señales, de las cuales seis señales simples corresponden a cinco metilos y a un metoxilo. Dos de estos metilos ($\delta = 2,21\ \text{H-9}$ y $2,73\ \text{H-10}$) se encuentran en el anillo aromático A. Mientras que tres grupos metilo y el grupo metoxilo están en el anillo B ($\delta = 2,11\ \text{H-8}'$; $2,09\ \text{H-9}'$; $2,50\ \text{H-10}'$ y $4,01\ \text{C7}'\text{-COOCH}_3$). Adicionalmente, se observa una señal del átomo de hidrógeno del grupo formilo del anillo A ($\delta = 10,40\ \text{C3-CHO}$), 2 señales de

hidroxilos fenólicos en el anillo A ($\delta = 12,41$ OH-2 y $13,10$ OH-4) y otra señal de hidroxilo en el anillo B ($\delta = 11,14$ OH-2') (Figura B-2).

El espectro de RMN ^{13}C (Tabla 7-5 - Figura B-3, Anexo) estableció la presencia de 21 carbonos diferentes. Los desplazamientos químicos confirmaron la presencia de 5 grupos metilo sobre los anillos aromáticos, en el anillo A encontramos los grupos metilo C9 (δ_C/δ_H 10,8/2,21) y C10 (δ_C/δ_H 20,5/2,73), mientras que en el anillo B están los grupos metilo C8' (δ_C/δ_H 9,8/2,11), C9' (δ_C/δ_H 13,3/2,09) y C10' (δ_C/δ_H 18,9/2,50), así como el grupo metoxilo del éster del anillo B (δ_C/δ_H 52,3/4,01) (Figura B-4, Anexo).

Doce señales están asociadas a los carbonos de los anillos aromáticos (δ_C 102,8 a 166,9). De ellas 4 corresponden a carbonos aromáticos unidos a átomos de oxígeno según su valor de desplazamiento químico (δ_C 151,5 (C4'), δ_C 166,1 (C4), δ_C 166,9 (C2) y δ_C 158,9 (C2')), la primera de estas señales (δ_C 151,5) corresponde al carbono que se une al puente éster entre el anillo A y el B (C4') y las 3 restantes a las posiciones sustituidas con grupos hidroxilo. Existen 3 átomos de carbono aromáticos que están unidos a carbonos carbonílicos (δ_C 102,8 (C1), δ_C 107,9 (C3) y δ_C 111,9 (C1')). Adicionalmente, hay dos carbonos carbonílicos correspondientes a grupos éster (δ_C 169,8 (C7) y δ_C 172,1 (C7')) y un carbono carbonílico de grupo aldehído del anillo A (δ_C 194,0 (C8)).

A través de las correlaciones H \rightarrow C encontradas en el espectro bidimensional HMBC (Tabla 7-5 - Figura B-6, Anexo). **a)** OH-2 (δ 12,41) con C-1 (δ 102,8), C-3 (δ 107,9) y C-2 (δ 166,9); **b)** OH-4 (δ 13,10) con C-3 (δ 107,9), C-5 (δ 118,2) y C-4 (δ 166,1); **c)** H-8 (δ 10,40) con C-3 (δ 107,9) y C-4 (δ 166,1); **d)** H-9 (δ 2,21) con C-4 (δ 166,1), C-5 (δ 118,2) y C-6 (δ 150,1); **e)** H-10 (δ 2,73) con C-1 (δ 102,8), C-5 (δ 118,2), C-6 (δ 150,1); **f)** OH-2' (δ 11,14) con C-2' (δ 158,9), C-3' (δ 116,2) y C-1' (δ 111,9); **g)** H-8' (δ 2,11) con C-3' (δ 116,2) y C-2' (δ 158,9); **h)** H-9' (δ 2,09) con C-5' (δ 120,5), C-6' (δ 137,6) y C-4' (δ 151,4); **i)** H-10' (δ 2,50) con C-1' (δ 111,9), C-5' (δ 120,5) y C-6' (δ 137,6); se estableció el patrón de β -orcinol pentasustituído en los anillos A y B de **1** [Hüneck. 1999]. Asimismo, a partir de las correlaciones observadas entre los hidrógenos del metilo H-9' (δ 2,09) con el carbono cuaternario aromático unido a oxígeno (δ 151,4) se corroboró que es la señal corresponde al carbono C-4' del anillo B y no la señal de 150,1 como estaba previamente reportado [Hüneck & Yoshimura. 1996]. El análisis descrito permitió establecer que el compuesto **1** es la pseudociferelina A.

De igual forma, la comparación de los espectros con los reportados por Hüneck [1984] permitió encontrar algunas diferencias principalmente en la asignación de los carbonos de los grupos metilo. Los experimentos bidimensionales de correlación carbono-hidrógeno permitieron reasignar dos átomos de carbono, correspondientes a carbonos alifáticos de los grupos metilo unidos al anillo B ($\delta = 111,9$ C1' y $\delta = 116,2$ C3'), como se puede observar en la Tabla 7-5.

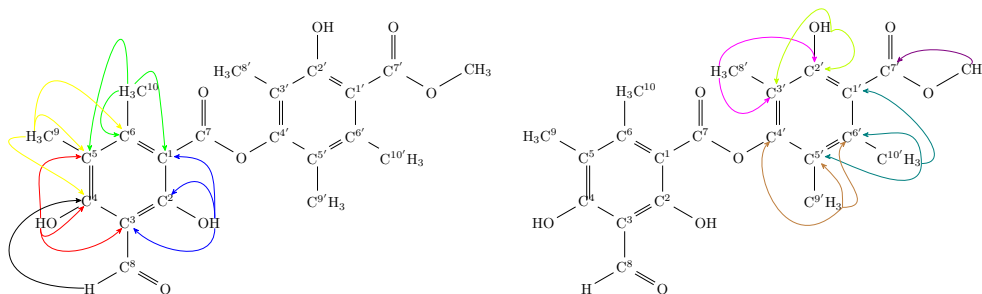


Figura 7-3: Resumen de las correlaciones HMBC Anillo A y Anillo B para la pseudociferelina A (**1**).

Tabla 7-5: Datos de resonancia magnética nuclear de la pseudociferelina A (1).

Posición	δ_C (ppm)		δ_H (ppm)		Correlaciones H \rightarrow C HMBC 400 MHz 1H - 100 MHz ^{13}C (CDCl ₃)
	Experimental 100 MHz (CDCl ₃)	Reportado ^{a,c} 50 MHz (CDCl ₃)	Experimental 400 MHz (CDCl ₃)	Reportado 270 MHz (DMSO-d6)	
C1	102,8	102,9 (C1)	-	-	-
C2	166,9	167,0 (C2)	12,41 (s, 1H, OH)	-	C-1, C-2, C-3
C3	107,9	108,0 (C3)	-	-	-
C4	166,1	166,1 (C4)	13,10 (s, 1H, OH)	-	C-3, C-4, C-5
C5	118,2	118,2 (C5)	-	-	-
C6	150,1	151,5 (C6)	-	-	-
C7	169,8	169,7 (C7)	-	-	-
C8	194,0	194,0 (CHO)	10,41 (s, 1H, CHO)	10,25 (s, 1H) ^{b,c}	C-4
C9	10,8	10,7	2,21 (s, 3H)	2,38 (s, 3H) ^{b,c}	C-4, C-5, C-6
C10	20,5	18,8	2,73 (s, 3H)	2,08 (s, 3H) ^{b,c}	C-1, C-5, C-6
C1'	111,9	116,2 (C1')	-	-	-
C2'	158,9	159,0 (C2')	11,14 (s, 1H, OH)	-	C-2', C-3'
C3'	116,2	111,9 (C3')	-	-	-
C4'	151,5	150,1 (C4')	-	-	-
C5'	120,5	120,5 (C5')	-	-	-
C6'	137,6	137,6 (C6')	-	-	-
C7'	172,1	172,1 (C7')	-	-	-
C8'	18,9	20,4	2,11 (s, 3H)	2,45 ^b ; 2,05 (s, 6H, Me-8' Me-10') ^c	C-2', C-3'
C9'	13,3	13,2	2,09 (s, 3H)	2,70 ^b ; 2,13 (s, 3H) ^c	C-4', C-5', C-6'
C10'	9,8	9,7	2,50 (s, 3H)	2,15 ^b ; 2,05 (s, 6H, Me-8' Me-10') ^c	C-1', C-5', C-6'
C7'COOMe	52,3	52,3 (OMe)	4,01 (s, 3H, OMe)	3,82 (s, 3H, 7'-COOMe) ^{b,c}	C-7'

Referencias: ^aHüneck [1984], ^bJakupovic & Hüneck [1989], ^cHüneck & Yoshimura [1996]

2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo - 2

El espectro de **RMN** 1H del ácido 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo presenta 5 señales (Figura **B-9**, Anexo). 3 de ellas corresponden a los protones de los grupos metilo unidos al anillo aromático ($\delta = 2,13$ H-8; 2,14 H-9; 2,43 H-10). Una señal en $\delta = 3,92$ corresponde a un grupo metilo de metoxilo (C7-COOCH₃) y otra a un protón de un grupo hidroxilo fenólico en $\delta = 11,46$ (OH-2). Esta señal presenta un elevado desplazamiento químico, debido a la formación de puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo, que hace que este átomo de hidrógeno este inusualmente desprotegido.

Por su parte, el espectro de **RMN** ^{13}C (Tabla 7-6 - Figura **B-10**, Anexo) estableció la presencia de 11 átomos de carbono diferentes. Los desplazamientos químicos confirmaron la presencia de 3 grupos metilo sobre el anillo aromático, metilo C8 (δ_C/δ_H 8,1/2,13), C9 (δ_C/δ_H 12,0/2,14) y C10 (δ_C/δ_H 18,9/2,43) Así como el grupo metilo perteneciente al metoxilo (δ_C/δ_H 52,0/3,92) (Figuras **B-11** & **B-12** Anexo).

Tabla 7-6: Datos de resonancia magnética nuclear del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetil benzoato de metilo (2).

Posición	δ_C (ppm)		δ_H (ppm)		Correlación H \rightarrow C HMBC 400 MHz 1H - 100 MHz ^{13}C (CDCl ₃)
	Experimental 100 MHz (CDCl ₃)	Reportado ^b 15 MHz (CCl ₄)	Experimental 400 MHz (CDCl ₃)	Reportado 60 MHz (CCl ₄) ^a - 400 MHz (CHCl ₃) ^b	
C1	106,3	-	-	-	-
C2	159,7	156,7 (C2)	11,46 (s, 1H, OH)	11,48 (s, 1H) ^a ; 11,38 (s, 1H) ^b	C-2, C-3
C3	107,4	-	-	-	-
C4	156,8	159,6 (C4)	-	-	-
C5	115,0	-	-	-	-
C6	137,7	-	-	-	-
C7	172,9	172,7 (C7)	-	-	-
C8	8,1	20,4 (C8)	2,13 (ds, 6H)	2,45 (s, 3H Me-8) ^a ; 2,05 (s, 6H, X2 Me) ^b	C-3, C-2, C-4
C9	12,0	8,0 (C9)	2,14 (ds, 6H)	2,16 (s, 3H Me-9) ^a	C-5, C-6, C-4
C10	18,9	11,8 (C10)	2,43 (s, 3H, Me)	2,16 (s, 3H, Me-10) ^a ; 2,33 (s, 3H, Me-8) ^b	C-1, C-5, C-6
C7-COOMe	52,0	51,8 (C7'-COOMe)	3,92 (s, 3H, COOMe)	3,87 (s, 3H, COOMe) ^a ; 3,95 (s, 3H, COOMe) ^b	C-7

^aHüneck & Yoshimura [1996], ^bAngulo Castro [2020].

Adicionalmente, existen 6 señales asociadas a los carbonos de los anillos aromáticos (δ_C 106,2 a 159,4). De ellas 2 corresponden a carbonos aromáticos unidos a átomos de oxígeno según su valor de desplazamiento químico (δ_C 156,8 (C4) y δ_C 159,4 (C2)). Los demás átomos de carbono de anillo aromático fueron asignados según sus correlaciones H \rightarrow C (Figura **B-13**, **B-14** & **B-15**, Anexo). **a)** OH-2 (δ 11,46) con C-2 (δ 159,7) y

C-3 (δ 107,4); **b**) H-8 (δ 2,13) con C-3 (δ 107,4), C-2 (δ 159,7) y C-4 (δ 156,8); **c**) H-9 (δ 2,14) con C-5 (δ 115,0), C-6 (δ 137,7) y C-4 (δ 156,8); **d**) H-10 (δ 2,45) con C-1 (δ 106,3), C-5 (δ 115,0) y C-6 (δ 137,7).

La señal de $\delta = 172,9$ corresponde al átomo de carbono carbonílico del éster (C7) y esto se puede confirmar con la correlación H \rightarrow C entre los protones del metoxilo (δ 3,92) con C-7 (Figuras **7-4** & **B-13**, Anexo). Las correlaciones antes descritas permiten resolver las asignaciones que no pudieron ser realizadas en estudios previos de esta sustancia para la especie *Lobariella pallida* [Angulo Castro. 2020].

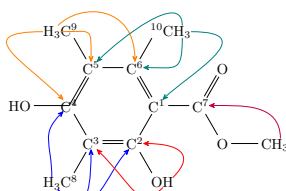


Figura 7-4: Resumen de las correlaciones H \rightarrow C HMBC del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**).

Orselinato de metilo - 3

El espectro de ^1H RMN (Tabla **7-7** - Figura **B-16**, Anexo) muestra 6 señales en total. La primera corresponde al grupo metilo unido al anillo aromático ($\delta = 2,47$ H-8). Seguidamente se observan 2 señales de protones unidos a anillo aromático ($\delta = 6,25$ H-3; $6,30$ H-5). La señal $\delta = 3,93$ corresponde al grupo metilo del metoxilo (C7-COOCH₃). Y las señales de grupos hidroxilo fenólicos corresponden a $\delta = 9,12$ (OH-4) y $\delta = 11,64$ (OH-2). Al igual que en los compuestos **1** y **2** se puede distinguir el protón OH-2 del OH-4 debido a la posible formación de puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo (éster), interacción intramolecular que explica su elevado desplazamiento químico [Lopes et al.. 2008].

Tabla 7-7: Datos de resonancia magnética nuclear del orselinato de metilo (**3**).

Posición	δ_C (ppm)		δ_H (ppm)		Correlación H \rightarrow C HMBC 400 MHz ^1H - 100 MHz ^{13}C (Acetona-d6)
	Experimental 100 MHz (Acetona-d6)	Reportado ^a 15 MHz (CDCl ₃)	Experimental 400 MHz (Acetona-d6)	Reportado ^a 60 MHz (DMSO-d6)	
C1	105,4	107,0 (C1)	-	-	-
C2	166,2	161,2 (C2)	11,64 (s, 1H, OH)	11,77 (s, 1H, OH)	C-2, C-3
C3	101,3	100,4 (C3)	6,25 (s, 1H, CH Arom)	6,31 (s, 2H, CH Arom)	C-1, C-2, C-4, C-5
C4	163,4	161,5 (C4)	9,12 (s, 1H, OH)	-	-
C5	112,3	110,3 (C5)	6,30 (s, 1H, CH Arom)	-	C-1, C-3, C-4
C6	144,3	141,1 (C6)	-	-	-
C7	173,1	170,3 (C7)	-	-	-
C8	24,0	22,2 (C8)	2,47 (s, 3H, Me)	2,49 (s, 3H, Me)	C-1, C-5, C-6
OMe	52,0	51,6 (OMe)	3,43 (s, 3H, COOMe)	3,92 (s, 3H, COOMe)	C-7

^a Hüneck & Yoshimura [1996]

El espectro de ^{13}C RMN (Figura **B-17**, Anexo) evidenció la presencia de 8 átomos de carbono diferentes. Los desplazamientos químicos muestran 2 grupos metilo, uno unido al anillo aromático (C8 δ_C/δ_H 24,0/2,47). Mientras que el otro grupo metilo hace parte del metoxilo (δ_C/δ_H 52,0/3,93) (Figura **B-18**, Anexo). Existen 6 señales que corresponden a los átomos de carbono del anillo aromático (δ_C 101,3 a 166,2). De estas señales, la correlación H \rightarrow C HMQC (Figura **B-19**, Anexo) permitió determinar la unión de los hidrógenos a los átomos de carbono aromáticos C3 (δ_C/δ_H 101,3/6,25) y C5 (δ_C/δ_H 112,3/6,30). En la Tabla **7-7** se puede observar que las asignaciones son casi completamente idénticas a las reportadas por Hüneck & Yoshimura [1996], con la excepción de las posiciones C2 y C4 de anillo aromático.

La correlación H → C nos permite ubicar el orden de los átomos de carbono en el anillo aromático (Figura **B-20**, Anexo). **a)** OH-2 (δ 11,64) con C-3 (δ 101,3), C-1 (δ 105,4) y C-2 (δ 166,4); **b)** H-8 (δ 2,47) con C-1 (δ 105,4), C-5 (δ 112,3) y C-6 (δ 144,3); **c)** H-3 (δ 6,25) con C-2 (δ 166,2), C-5 (δ 112,3) y C-1 (δ 105,4). **d)** H-5 (δ 6,30) con C-3 (δ 101,3) y C-4 (δ 163,4); Por último **e)** OMe (δ 3,93) con C7 (δ 173,1) que corresponden a los protones del metoxilo con el átomo de carbono carbonílico (Figuras **B-20**, **B-21**, **B-22**, **B-23**, **B-24** Anexo & **7-5**).

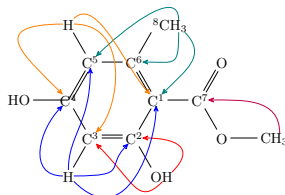


Figura 7-5: Resumen de las correlaciones H → C HMBC del orselinato de metilo (**3**).

7.3 Actividad biológica de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii*

7.3.1 Actividad Antioxidante

Muchos problemas de la piel ocasionados por exposición excesiva o crónica a la radiación solar se deben a la generación de todo un conjunto de especies reactivas (**EROs** y **ERNs**) que actúan sobre diversas dianas biológicas celulares y en consecuencia afectan el material genético, los lípidos de membrana, las proteínas y en última instancia alteran el correcto funcionamiento celular y la estructura de la matriz extracelular (tejido conectivo - dermis).

De allí la importancia de evaluar la actividad antioxidante, tanto de los extractos de **HL** como de los compuestos obtenidos de ellos. En la Sección 5.2.1 se detallaron 2 tipos de mecanismos de acción de los compuestos antioxidantes, los mecanismos de transferencia de electrones (**MATe**) y los mecanismos de transferencia protónica (**MATH**) [Huang *et al.*. 2005; Apak. 2019]. Para los compuestos fenólicos como aquellos presentes en *Lobariella sipmanii* la actividad captadora de radicales frecuentemente se lleva a cabo mediante mecanismo **MATH** o **TEAP** [Amorati *et al.*. 2016].

En el ensayo de poder reductor férrico (**FRAP**) sobre los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*, el mecanismo que se evalúa es el **MATe**, dado que muchas **EROs** se originan a nivel mitocondrial debido a la irradiación **UV** e **IR** sobre citocromos y otros elementos de la cadena de transporte de electrones o a partir de la reacción de Fenton [Schieke *et al.*. 2003; Schroeder *et al.*. 2008a]. La actividad antioxidante mediante **MATH** y **MATe** (**TEAP**) se evalúa en los ensayos de inhibición de la peroxidación lipídica (**IPL**) que da cuenta de los hidroperóxidos lipídicos, que son un tipo especies reactivas secundarias y en la actividad captadora de radicales mediante el modelo 2,2-difenil-1-picrilhidracilo o **DPPH** [Carocho & Ferreira. 2013; Kosanić & Ranković. 2015; Amorati *et al.*. 2016; Apak. 2019].

Los compuestos fenólicos son los metabolitos secundarios más relevantes de los **HL**. La presencia de uno o más grupos hidroxilo causa que estas sustancias sean capaces de ceder protones (**MATH**), quelar iones metálicos, estabilizar electrones desapareados (**MATe**) o modulan mecanismos endógenos de actividad antioxidante [Fernández-Moriano *et al.* 2016]. Como predomina el mecanismo **MATH**, la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos aumenta en función del número de grupos hidroxilo o cualquier grupo electrodonor que estos tengan en su estructura [Kosanić & Ranković. 2015]. Mientras que la presencia de grupos electroattractores en el anillo, como es el caso del carbonilo (éster), reduce la actividad antioxidante de compuestos fenólicos [Lopes *et al.* 2008].

Actividad captadora de radicales libres en el modelo DPPH

Concentración efectiva media (CE₅₀) De los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii* el más activo ante radicales libres fue el 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (Compuesto **2**) con una concentración efectiva media de 13,04 mg/mg DPPH (72,03 µg/mL) y con un porcentaje de captación del 45,1 % a 200 µg/mL (Tabla 7-8). El siguiente compuesto más activo en captar radicales fue la pseudociferelina A (**1** - CE₅₀ = 15,50 mg/mg DPPH - 85,6 µg/mL) y un porcentaje de captación ligeramente superior (59,1 %) al del compuesto **2**. Esto coincide con lo expuesto por Kosanić & Ranković [2015] quien menciona que a mayor número de grupos hidroxilo, mejor actividad captadora de radicales libres.

Tabla 7-8: Concentración efectiva media para la captación de radicales libres de los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*

Compuesto	Replica	Poder captador - CE ₅₀				Actividad Captadora a 200 µg/mL
		Relación [AH]/[DPPH]	mg AH / mg DPPH	µM	µg/mL	
BHT	1	7,037	3,932	98,56	21,72	83,0%
	2	8,081	4,516	110,9	24,94	75,2%
	Promedio (SD)	7,591 (0,738)	4,242 (0,413)	106,3 (10,3)	23,43 (2,28)	79,1 (5,5)
AG	1	0,0895	0,0386	1,254	0,2133	93,9%
	2	0,0820	0,0354	1,149	0,1955	90,1%
	Promedio (SD)	0,0859 (0,0053)	0,0370 (0,0002)	1,203 (0,074)	0,2046 (0,013)	92,0 (2,7)
Pseudociferelina A (1)	1	17,78	17,78	249,0	98,2	52,3%
	2	13,41	13,41	187,8	74,1	65,9%
	Promedio (SD)	15,50 (3,09)	15,50 (3,09)	217,1 (43,3)	85,6 (17,1)	59,1 (9,6)
2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetil benzoato de metilo (2)	1	26,70	14,23	373,9	78,61	41,1%
	2	22,42	11,95	314,1	66,02	49,1%
	Promedio (SD)	24,46 (3,02)	13,04 (1,61)	342,6 (42,3)	72,03 (8,90)	45,1 (5,6)
Orselinato de metilo (3)	1	> 40	-	-	-	9,7%
	2	> 40	-	-	-	17,6%
	Promedio (SD)	> 40	ND	ND	ND	13,6 (5,6)

ND: No determinado

Si se comparan los resultados obtenidos para el extracto de *Lobariella sipmanii* (Sección 7.1 - Tabla 7-2). La concentración efectiva media del extracto fue de 3,129 mg Extracto / mg DPPH (85 % captación a 200 µg/mL), aproximadamente 25 veces menos activo como antioxidante con respecto al **BHT** (0,1362 mg BHT/mg DPPH - 92 % captación a 20 µg/mL). Mientras que para los compuestos aislados, la CE₅₀ de los compuestos **1** y **2** fueron cerca de tres veces más altas respecto a la del **BHT**, tanto en mg Compuesto / mg DPPH como en µg/mL (Tabla 7-8), por lo que son menos activos como antioxidantes. Además, la actividad captadora de los compuestos fue menor a la del extracto y estuvo entre el 45,1 % y el 59,1 %, por lo que los compuestos **1** y **2** explican al menos parcialmente la actividad captadora de radicales que presentó el extracto.

Aunque el **BHT** tiene una concentración efectiva media menor (4,242 mg/mg DPPH) y por tanto es más activo con respecto a los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*, al comparar los valores de CE₅₀ de los

compuestos **1** y **2** no se encontraron diferencias significativas entre sí (p-valor > 0,05 - Figura **E-8**, Anexo). Esto sin duda resulta prometedor para el uso de estos dos compuestos como antioxidantes. De otro lado, no fue posible calcular si hay diferencias estadísticas entre el **BHT** y el compuesto **3**, dado que al no superar el 50 % de captación en el intervalo de concentraciones ensayado, no es posible calcular con certidumbre la CE_{50} . Por otra parte, al realizar el **ANOVA** se encontró que las concentraciones efectivas medias de los compuestos **1**, **2** no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí (p-valor > 0,05).

El ácido gálico (**AG**) fue el compuesto más activo y su reacción con el **DPPH** fue la más rápida de todos los compuestos evaluados. Además, su CE_{50} presentó diferencias significativas con respecto al resto de los compuestos (p-valor < 0,05 - Tabla **E-8**, Anexo) pero no con respecto al **BHT** (p-valor > 0,05). Este compuesto durante el estudio cinético presentó porcentajes de captación de radicales libres superiores al 50 % a partir de relaciones de concentración muy bajas (0,1:1 - $[AG]_0 = 1,212 \mu M$). Mientras que el **BHT** y los compuestos **1** y **2** presentaron este nivel de actividad captadora de radicales en las relaciones de concentración superiores a 5:1 ($[BHT]_0 = 69,4 \mu M$) y 9:1 ($[1]_0 = 277,9 \mu M$ - $[2]_0 = 272,9 \mu M$) respectivamente.

Por el contrario, el orselinato de metilo (Compuesto **3**) no fue activo para captar radicales libres. Esto puede observarse en su porcentaje de captación promedio de solo el 13,6 % a una concentración de 200 $\mu g/mL$ (Relación 40:1). *Thadhani et al.* [2011] & *Lopes et al.* [2008] describen baja actividad captadora en el sistema **DPPH** del compuesto **3** respecto al orcinol y al ácido orselínico producto de efectos electrónicos del grupo carbonilo sobre el anillo aromático y a que el compuesto **3** al ser un éster, es incapaz tanto de donar protones a través del grupo carboxilo (**MATH**), como de formar el anión carboxilato como sí ocurre en el ácido orselínico. Además, contrario a los grupos carbonilo en funciones aldehído, cetona o éster que son grupos electroattractores, el anión carboxilato unido a anillos aromáticos actúa como activador del anillo aromático por efecto inductivo [*Amorati et al.* 2016]. Esto ha sido reportado por *Lopes et al.* [2008], quien obtuvo actividades captadoras para **3** de 2,4 % (IC_{50} : 167,2 mM), 49 % (IC_{50} : 2,93 mM) para el orcinol y 39 % (IC_{50} : 5,01 mM) para el ácido orselínico. Y también coincide con los resultados obtenidos por *Perico Franco et al.* [2015a] para esta sustancia aislada de *Lobariella pallida* la cual fue inactiva como captador de radicales libres.

Otro factor estructural que podría explicar la baja actividad del compuesto **3** respecto de los compuestos **1** y **2** es la presencia de los grupos metilo en estos dos últimos. Los anillos derivados del ácido 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoico, como lo son el compuesto **2**, el anillo A del compuesto **1** y la lobarielina que es el anillo B del pépsido pseudociferelina A (**1**) al tener esos grupos metilo electrodonores por efecto inductivo presentan mejor actividad antioxidante (Figura **7-6**). Por ejemplo, *Perico Franco et al.* [2015a] reporta a la lobarielina como el mejor captador de radicales de los compuestos obtenidos de **HL** del páramo de Sumapaz con una CE_{50} comparable al ácido ascórbico y aproximadamente el doble de la del **BHT**.

Esto coincide y reitera resultados previos, donde se comparan sustancias liquénicas que presentan el anillo de tipo orcinol, que tienen un solo grupo metilo sustituyente, con respecto a los compuestos con anillo tipo β -orcinol que tienen dos grupos metilo. Los anillos tipo orcinol tienen menor actividad captadora de radicales comparados con los anillos tipo β -orcinol [*Perico Franco et al.* 2015a]. En consecuencia, la presencia de anillos de tipo orcinol resulta ser un indicador estructural de baja actividad captadora de radicales libres en las sustancias liquénicas.

Como se evidenció previamente, este factor estructural no solo afectó la concentración efectiva media, también

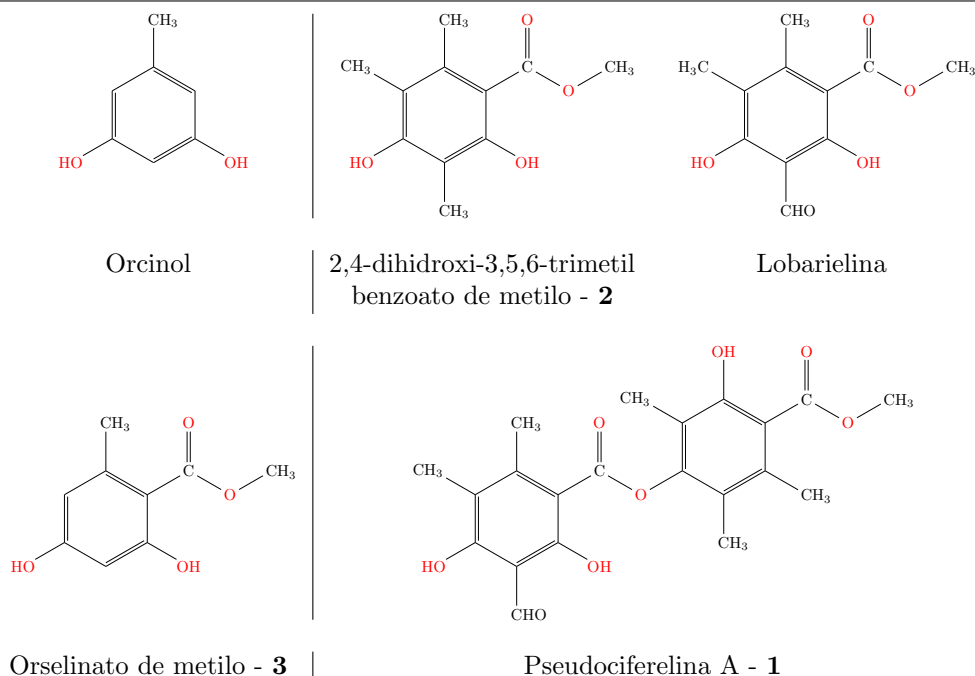


Figura 7-6: Tipos estructurales de los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*. En el lado izquierdo se aprecia el tipo orcinol con un solo grupo metilo sustituyente y al lado derecho el tipo 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato con tres grupos metilo

tuvo efecto sobre la reactividad ante radicales. El porcentaje de actividad captadora es un indicador de la eficiencia de la sustancia como antioxidante y es equivalente a la **capacidad antioxidante** que tiene relación con la constante de equilibrio de la reacción [Apak. 2019]. La reacción para una sustancia antioxidante efectiva debe realizarse lo más cercano posible al 100%. En nuestro caso, se observa que los compuestos **1** y **2** por su actividad captadora del 59,1% y el 45,1% son moderados captadores de radicales libres, con actividad menor aunque comparables en este sentido a antioxidantes comerciales como el **BHT** (79,1%) y con actividad captadora mucho menor al **AG** (92,0%).

Reactividad ante radicales libres En este ensayo se determinó la constante de velocidad de segundo orden, que es indicativo de la velocidad de reacción de los compuestos estudiados, aquellos que tienen mayores constantes, son más reactivos y alcanzan más rápidamente al estado estacionario. El compuesto más reactivo con los radicales libres de los obtenidos de *Lobariella sipmanii* fue el 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetil benzoato de metilo (**2** - $K_2 = 0,2486 \pm 0,0893 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), seguido de la pseudociferelina A (**1** - $K_2 = 0,0534 \pm 0,0309 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) cuyo valor de la constante K_2 es aproximadamente la quinta parte del valor obtenido por el compuesto **2**. (Tabla 7-9) El valor de la constante de velocidad de segundo orden del compuesto **2** es 10 veces menor a la del **BHT** ($K_2 = 2,030 \pm 0,268 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y 30 veces menor a la del **AG** ($7,798 \pm 4,876 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Por lo que el compuesto **2** resulta prometedor como compuesto captador de radicales libres.

De los antioxidantes ensayados, el **AG** fue el más reactivo, seguido del **BHT**. Los valores de reactividad del **AG** obtenidos para la relación 10:1 son cercanos al valor de poder antiradical reportado por *Brand-Williams et al.* [1995], mientras que el del **BHT** es aproximadamente la mitad (Tabla 7-9). El análisis de varianza (**ANOVA**) a una vía de las constantes de segundo orden (K_2) obtenidas estableció diferencias estadísticamente significativas del **AG** con respecto al **BHT** (p-valor < 0,05) y con respecto a los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii* (p-valor < 0,05 - Figura E-10, Anexo). Mientras que el compuesto **2** presentó

7. Resultados y discusión 7.3. Actividad biológica de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii*

diferencias estadísticamente significativas (p-valor < 0,05) con los demás compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* y con los patrones **AG** y **BHT**. Por otro lado, los compuestos **2** y **3** no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí (p-valor > 0,05 - Figura E-10, Anexo).

Tabla 7-9: Reactividad de los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii* como agentes captadores (*scavenging*) de radicales libres

Compuesto	Relación AH/DPPH*	[AH] ₀ μM	Replica 1			Replica 2			K ₂ Promedio (M ⁻¹ s ⁻¹)
			k _{obs}	K ₂	p-valor	k _{obs}	K ₂	p-valor	
BHT	5:1	69,43	1,43 × 10 ⁻⁴	2,054	0,02793	1,42 × 10 ⁻⁴	2,045	0,01433	2,049 (0,006)
	10:1	138,87	1,83 × 10 ⁻⁴	1,321*	0,00366	2,84 × 10 ⁻⁴	2,046	0,00009	1,683 (0,513)
	20:1	277,74	6,73 × 10 ⁻⁴	2,423	0,00003	7,74 × 10 ⁻⁴	2,788*	0,00540	2,606 (0,258)
	40:1	552,59	1,12 × 10 ⁻³	2,031	0,04780	8,72 × 10 ⁻⁴	1,578	0,02139	1,805 (0,321)
	Promedio Global (SD)								2,030 (0,268)
AG	10:1	121,24	0,00125	10,310	0,00022	0,00158	13,069	0,04700	11,689 (1,950)
	20:1	246,15	0,00140	5,773	0,01155	0,00050	2,041	0,00865	3,907 (2,639)
	Promedio Global (SD)								7,798 (4,876)
Pseudociferelina A (1)	5:1	69,74	1,02 × 10 ⁻⁵	0,1458*	2,52 × 10 ⁻¹²	8,03 × 10 ⁻⁶	0,1151	1,11 × 10 ⁻¹⁴	0,1305 (0,0217)
	10:1	139,48	6,29 × 10 ⁻⁶	0,0451	2,84 × 10 ⁻⁶	5,04 × 10 ⁻⁶	0,0361	1,88 × 10 ⁻¹¹	0,0406 (0,0064)
	20:1	277,38	9,44 × 10 ⁻⁶	0,0340	4,46 × 10 ⁻¹¹	5,82 × 10 ⁻⁶	0,0210	7,48 × 10 ⁻⁸	0,0275 (0,0092)
	40:1	553,17	3,23 × 10 ⁻⁵	0,0584	5,39 × 10 ⁻¹⁴	3,53 × 10 ⁻⁵	0,0638	8,12 × 10 ⁻⁸	0,0611 (0,0038)
	Promedio Global (SD)								0,0534 (0,0309)
2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetil benzoato de metilo (2)	5:1	69,75	3,22 × 10 ⁻⁵	0,461	0,04196	3,76 × 10 ⁻⁵	0,540	0,01589	0,5004 (0,0554)
	10:1	136,46	2,69 × 10 ⁻⁵	0,197	0,00049	4,20 × 10 ⁻⁵	0,307	0,04279	0,2523 (0,0781)
	20:1	272,92	1,02 × 10 ⁻⁴	0,374	0,00339	5,12 × 10 ⁻⁵	0,188	0,00148	0,2808 (0,1319)
	40:1	542,80	1,57 × 10 ⁻⁴	0,289	0,00245	7,39 × 10 ⁻⁵	0,136	0,03250	0,2127 (0,1082)
	Promedio Global (SD)								0,2486 (0,0893)
Orselinato de metilo (3)	10:1	130,92	4,07 × 10 ⁻⁶	0,0311	1,50 × 10 ⁻⁶	3,72 × 10 ⁻⁶	0,0284	2,46 × 10 ⁻⁶	0,0298 (0,0019)
	20:1	243,66	1,48 × 10 ⁻⁵	0,0607	4,97 × 10 ⁻¹²	3,36 × 10 ⁻⁵	0,1377*	6,51 × 10 ⁻¹⁰	0,0992 (0,0544)
	40:1	516,41	2,51 × 10 ⁻⁶	0,0049	1,54 × 10 ⁻⁵	1,11 × 10 ⁻⁵	0,0214	6,38 × 10 ⁻¹⁰	0,0131 (0,0117)
	Promedio Global (SD)								0,0293 (0,0203)

Se acepta la significancia de la regresión lineal cuando el p-valor < 0,05 * Dato descartado del promedio y la SD por estadística descriptiva

Las diferencias en reactividad se pudieron observar durante el estudio cinético, mientras que los patrones presentaron los cambios de coloración en el transcurso de las primeras horas para las relaciones empleadas, tanto el compuesto **1**, como el compuesto **2** requirieron entre 24 y 48 horas para observar los cambios en las 2 relaciones de concentración más altas. Por otro lado, el compuesto **3** obtuvo baja reactividad, aún después de 48 horas presentó cambios mínimos en las relaciones de concentración más altas, esto es consistente con lo reportado por *Perico Franco et al.* [2015a] y con la inactividad en la captación de radicales libres mencionada en la sección previa.

Las diferencias en reactividad pueden ser atribuidas a dos características estructurales de los compuestos **1** y **2** con respecto al compuesto **3**. En primer lugar, los compuestos **1** y **2** tienen al menos 2 grupos hidroxilo en su estructura lo que los hace más proclives a reaccionar con radicales mediante **MATH**, este aspecto es compartido con el ácido gálico que posee tres grupos hidroxilo fenólicos y es el compuesto que experimentalmente presentó el mayor valor en su constante de velocidad de segundo orden (K₂). Adicionalmente, ambos compuestos presentan alto grado de sustitución por grupos alifáticos en el anillo aromático, aspecto estructural que es similar al que se observa en antioxidantes comerciales como el **BHT**. Esto coincide con lo encontrado el estudio de actividad captadora de radicales, que evidenció que la presencia de sustituyentes alifáticos electrodonores por efecto inductivo en el anillo mejora la actividad antioxidante [*Perico Franco et al.* 2015a; *Kosanić & Ranković.* 2015].

A pesar de que la concentración efectiva media de los compuestos **1** y **2** es comparable a la del **BHT**, se observó durante el estudio cinético que tanto el compuesto **1**, como el compuesto **2** reaccionaron por completo entre las 24 y las 48 horas de iniciada la reacción, mientras que el **BHT** alcanzaba el estado estacionario en algunas horas. Un factor que puede afectar la actividad antioxidante de los compuestos aislados de *Lobariella*

sipmanii es la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares entre el OH-2 y el grupo carbonilo (C-7), lo que puede reducir la disponibilidad del protón y por ende disminuir la reactividad [Lopes *et al.* 2008]. Este factor es común a los tres compuestos obtenidos y puede explicar porque su CE₅₀ es más alta y su reactividad (K_2) es menor comparados con el **BHT**. A pesar de esto, la cinética lenta puede hacer que sean adecuados como antioxidantes de larga duración en productos cosméticos.

Poder reductor férrico - FRAP

Los iones metálicos redox como el hierro (II) y cobre (I) son oxidados por acción del peróxido de hidrógeno que se convierte en radical hidroxilo (*OH) [Björn. 2008; Masaki. 2010; Carochó & Ferreira. 2013]. Una vez en su estado oxidado pueden quitar electrones en gran variedad de sustratos y este proceso de reducción agota los mecanismos antioxidantes endógenos, como los que se basan en moléculas reductoras como la vitamina C, los tioles (Glutatió), o la vitamina E [Sayre *et al.* 2008].

Además, en el caso de los iones hierro, estos no solo pueden participar en la reacción de Fenton con el peróxido de hidrógeno [Halliwell & Gutteridge. 1990; Carochó & Ferreira. 2013; Pisoschi & Pop. 2015; Apak. 2019]. También son capaces de generar reacciones sucesivas de producción de iones hidroxilo y otras **EROs** [Halliwell & Gutteridge. 1990]. El ensayo de poder reductor férrico (**FRAP**) es un ensayo de **MATe**, donde el ion hierro (III) es la especie oxidante que reacciona con las sustancias antioxidantes, reduciéndose a hierro (II) que luego es quelado por un ligando cromogénico, en nuestro caso el ferricianuro (Sección 6.3.2) [Berker *et al.* 2007]. Este ensayo representa un indicio del potencial de una sustancia para mantener las condiciones redox de los tejidos y evitar las reacciones nocivas causadas por iones metálicos libres.

El ensayo **FRAP** por el método del ferricianuro sin incubación como el realizado para los compuestos liquénicos de *Lobariella sipmanii* presenta dos ventajas respecto a otros métodos, como aquellos que emplean fenantrolinas o 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina. La primera ventaja es la fácil extrapolación de los resultados a las condiciones de pH fisiológicas de las células, debido a que se realiza la incubación de la reacción en solución amortiguadora de fosfatos pH = 6,6. Y la segunda es que al realizar la incubación a temperatura ambiente emula mejor la temperatura superficie de la piel, pero más importante se evitan potenciales procesos de auto-oxidación de las sustancias que se pretenden ensayar [Berker *et al.* 2007; Işıl Berker *et al.* 2010; Apak. 2019]. También bajo estas condiciones algunos compuestos fenólicos presentan un mejor comportamiento ya que pueden presentar cierto grado de ionización como aniones fenóxido [Apak. 2019].

Los patrones **AG** seguido del **BHT** fueron los compuestos más activos para el ensayo de poder reductor férrico (Figuras 7-7 A & E-11, Anexo - Tabla C-2). Por otro lado, de los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*, el 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) seguido de la pseudociferelina A (**1**) fueron los más activos en poder reductor férrico, estas dos sustancias presentan un comportamiento dependiente de la concentración. Por el contrario, el orselinato de metilo (**3**) tuvo baja actividad reductora férrica y esta fue prácticamente constante en función de la concentración (Figura 7-7 B), lo cual concuerda con reportes previos [Perico Franco *et al.* 2015a].

Para los compuestos control (**AG** y **BHT**) se observa que el poder reductor férrico aumenta en función del aumento de la concentración, aunque el **BHT** presenta valores menores de absorbancia comparados con el

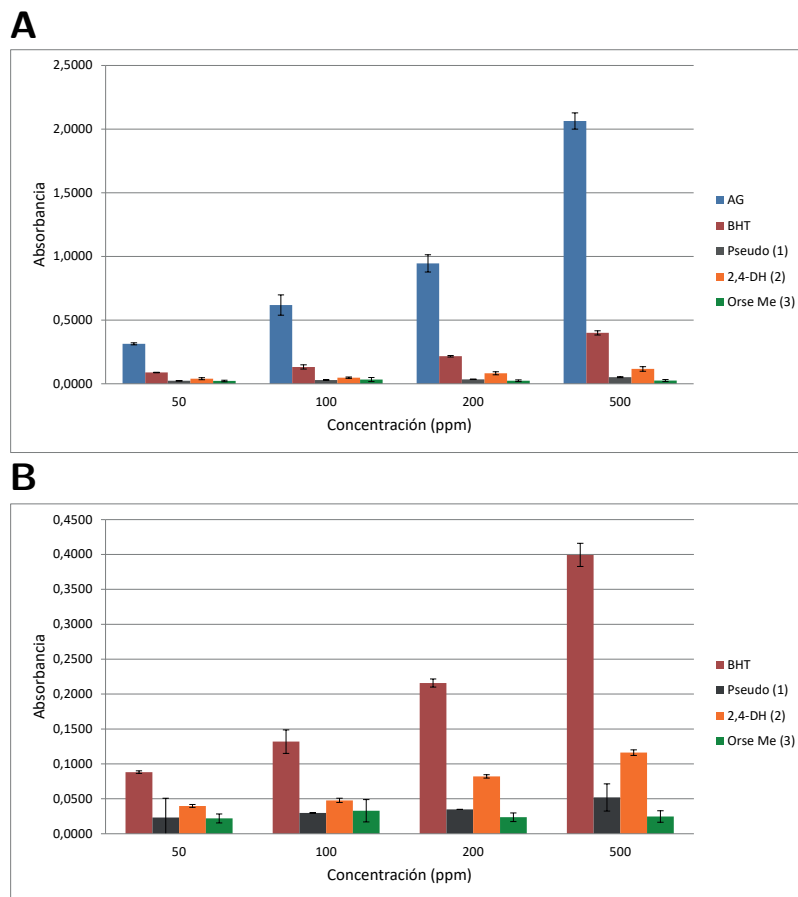


Figura 7-7: Poder reductor férrico de los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*. **A.** Absorbancias incluyendo el **AG** y **BHT**. **B.** Absorbancias sin el **AG**

AG. Ambos controles presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí y con los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii* a partir de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p -valor $< 0,05$ - Figura E-12 A-D, Anexo).

El compuesto más activo, el 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) presentó diferencias significativas con los compuestos **1** y **3** a 50, 200 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p -valor $< 0,05$ - Figura E-12 A, C y D, Anexo). Mientras que el compuesto **1** comparado con el compuesto **3** solo presentó diferencias estadísticamente significativas (p -valor $< 0,05$ - Figura E-12 D, Anexo) en su poder reductor férrico a alta concentración (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Es conocido que los compuestos fenólicos son capaces de donar protones a los radicales libres y detener la reacción en cadena radicalarias (**MATH**), debido a la presencia de los grupos hidroxilo [Kosanić *et al.* 2011]. De igual manera, la cantidad de grupos hidroxilo afecta la actividad antioxidante de las sustancias por **MATe**, en este caso por cada grupo hidroxilo adicional aumenta la posibilidad de dar dos electrones al hierro (III) [Berker *et al.* 2007]. En cierta medida se podría considerar al compuesto **2** como antioxidante secundario a altas concentraciones. Por tanto, sería una opción en la prevención de la reacción de Fenton [Apak. 2019].

Finalmente, es prudente mencionar que los iones metálicos redox al producir **EROs** como el radical hidroxilo y favorecer la descomposición de otras especies reactivas, tales como los hidroperóxidos lipídicos, también

intervienen en los procesos de peroxidación lipídica y acentúan los efectos nocivos de esta última [Gutteridge & Halliwell. 1990; Moore & Roberts. 1998]. De allí que la actividad reductora férrica de las sustancias líquénicas revista de una doble importancia.

Inhibición de la peroxidación lipídica

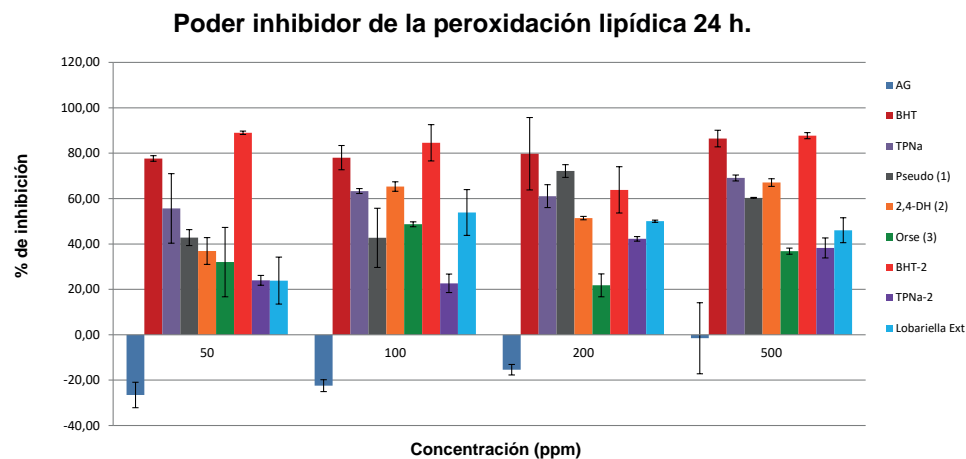
La irradiación de alta energía en medios ricos en agua produce radicales hidroxilo (*OH) que pueden dar lugar a las reacciones de iniciación (Figura 6-3) de la peroxidación lipídica a nivel celular [Sayre et al. 2008]. Las consecuencias de la peroxidación de los lípidos de la membrana incluyen disminución de la fluidez, inactivación de receptores y aumento de la permeabilidad celular no específica [Gutteridge & Halliwell. 1990]. Las posibilidades de propagación *in vivo* de los procesos de peroxidación lipídica dependen de varios factores, como la composición proteica y lipídica de las membranas. A mayor cantidad de proteínas, menor peroxidación, mientras que a mayor cantidad de lípidos mono y poli-insaturados mayor grado posible de peroxidación. También depende de la cantidad de oxígeno presente y la presencia de moléculas antioxidantes [Gutteridge & Halliwell. 1990; Halliwell & Chirico. 1993].

Los hidroperóxidos lipídicos al descomponerse generan varios productos nocivos: Los isoprostanos que resultan de la endociclación del radical peroxilo lipídico y su reacción con el dioxígeno. Y los aldehídos α, β -insaturados reactivos mono y bifuncionales; como, por ejemplo, el 4-hidroxi-2-nonenal o el 4-oxo-2-nonenal. Estos aldehídos son potentes electrófilos capaces de dar reacciones de tipo Michael reaccionan con nucleófilos abundantes en los aminoácidos de las proteínas y las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y son citotóxicos [Moore & Roberts. 1998; Sayre et al. 2008].

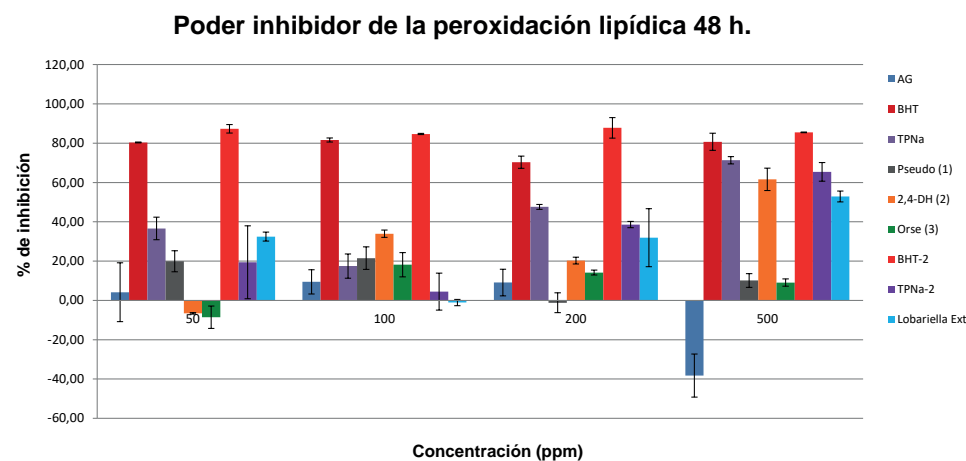
La formación del hidroperóxido implica la oxidación de una nueva molécula de ácido graso que propaga la reacción radicalaria (Figura 6-3) [Moore & Roberts. 1998]. Al participar de las reacciones de propagación radicalarias, estas sustancias son responsables de uno de los principales efectos del estrés oxidativo, que es el daño sobre las membranas celulares [Halliwell & Chirico. 1993]. Adicionalmente, se ha evidenciado que el daño por peroxidación sobre las membranas hace parte de la fisiopatología de diversas enfermedades, tales como la aterosclerosis, también puede desencadenar la respuesta inmune en los tejidos, iniciando procesos de fibrosis o inflamación [Gutteridge & Halliwell. 1990; Moore & Roberts. 1998].

De las sustancias ensayadas, los patrones **BHT** y **TPNa** (Tocoferol fosfato de sodio) resultaron activos en todas las concentraciones durante las 72 horas del ensayo para inhibir la formación de hidroperóxidos lipídicos (Figura 7-8) y no presentaron diferencias significativas entre sí (p-valor > 0,05 - Figuras **E-16**, **E-17** & **E-18**, Anexo) excepto a las 72 horas a alta concentración (p-valor < 0,05 - Figura **E-18**, Anexo). De ellos, el tocoferol (Vitamina E) es el principal antioxidante liposoluble presente en la piel [Thiele et al. 2001], que previene la peroxidación a donar su protón fenólico a los radicales peroxilo y alcoxilo para formar los radicales tocoferilo, que son muy estables y por ende poco reactivos [Baran & Maibach. 2010; Carocho & Ferreira. 2013]. Tanto el **TPNa**, como el **BHT** por su estructura tienen un carácter relativamente lipófilo, por lo que uno de los posibles mecanismos de actividad es su acción como interruptores de la cadena en reacciones de peroxidación de lípidos, mediante la reacción con los radicales peroxilo [Halliwell. 1995; De Gálvez. 2010].

A



B



C

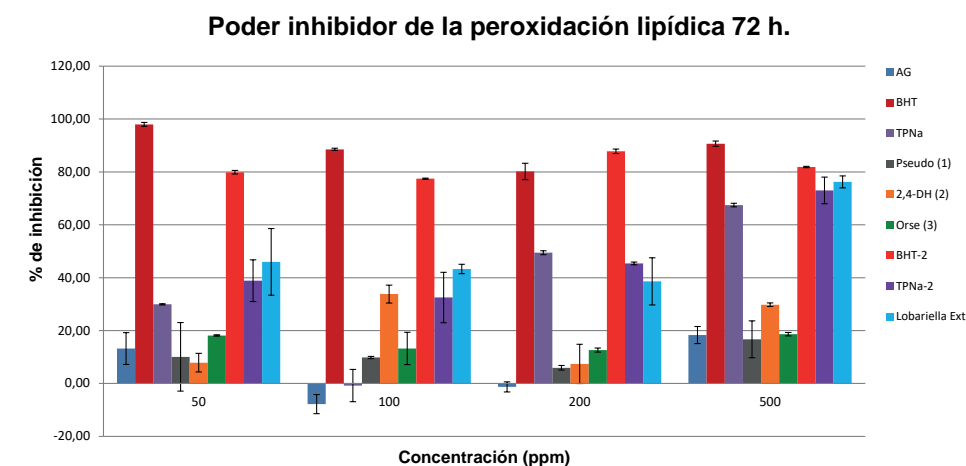


Figura 7-8: Inhibición de la peroxidación lipídica (IPL) de los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*. A. 24 horas B. 48 horas C. 72 horas.

Por el contrario, el **AG** presentó actividad pro-oxidante, con valores negativos de inhibición de la peroxidación lipídica a 24 h y baja actividad inhibidora entre 48 y 72 h presentando diferencias significativas con los patrones **BHT** y **TPNa** en la mayoría de los casos así como con las sustancias aisladas de *Lobariella sipmanii* (p-valor < 0,05 - Figuras **7-8**, **E-16**, **E-17** & **E-18**, Anexo - Tabla **C-3**, Anexo). Al respecto *Halliwell* [1995] y *Apak* [2019] mencionan que bajo ciertas condiciones los compuestos antioxidantes pueden comportarse como pro-oxidantes. Por ejemplo, el galato de propilo acelera la formación de radicales hidroxilo en condiciones de baja solubilidad. En este caso, si la molécula de estudio es muy hidrofílica es posible que haya menos actividad en el ensayo de **IPL** o que incluso se observe un comportamiento pro-oxidante. De hecho *Nomelin-Ballen* [2020] considera el bajo carácter lipofílico del **AG** como la explicación a su menor actividad **IPL**.

Por su parte, las sustancias aisladas de *Lobariella sipmanii* presentaron actividad inhibidora de la peroxidación lipídica sin diferencias estadísticamente significativas (p-valor > 0,05 - Figuras **E-16**, **E-17** & **E-18**, Anexo) con el patrón **TPNa**. El compuesto **2** no presentó diferencias estadísticamente significativas con los patrones **BHT** y **TPNa** a concentraciones de 100, 200 y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y el compuesto **1** no tuvo diferencias a partir de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el ensayo a 24 h. De igual manera, las sustancias obtenidas no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí en el corte de las 24 horas (p-valor > 0,05 - Figuras **E-16 A**, Anexo). En general, los compuestos **1**, **2** y **3** presentan un comportamiento que depende de la concentración hasta las 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de ahí en adelante el porcentaje de inhibición se hace constante. Los tres compuestos poseen grupos hidroxilo fenólicos que son susceptibles de reaccionar por mecanismo **MATH** o **TEAP**, en el que se transfieren protones de los grupos hidroxilo fenólicos a los radicales alquilperoxilo [*Amorati et al.* 2016].

Los compuestos **1** y **2** tienen porcentajes de inhibición próximos e incluso superiores al 60 % a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 horas (Figura **7-8 A**). El compuesto **2** es una de las partes constituyentes del péptido pseudociferelina A (**1**) y ambos presentaron porcentajes **IPL** sin diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los ensayos (p > 0,05 - Figuras **E-16**, **E-17** & **E-18**, Anexo). De igual forma, en estudios previos se observa que la lobarielina, el otro compuesto monoaromático que constituye a la pseudociferelina A fue activo en peroxidación lipídica (69% **IPL**) [*Perico Franco et al.* 2015a]. Por estas similitudes estructurales se puede explicar la actividad **IPL** que presentó el compuesto **1**.

Mientras que el compuesto **3** fue el menos activo como inhibidor de la peroxidación lipídica, con porcentajes de inhibición de entre (20 y 30) % a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y cercanos al 40 % entre (100 y 500) $\mu\text{g}/\text{mL}$. Resultados consistentes con lo reportado en este mismo ensayo para el compuesto **3** en la especie *Lobariella pallida*, donde el porcentaje de **IPL** fue del 19 % a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y del 26 % a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. [*Perico Franco et al.* 2015a] De igual forma, sucede con el compuesto **3** aislado de *Parmotrema stuppeum* en un sistema donde se evaluó la oxidación de β -caroteno, esta sustancia también resultó ser inactiva (18 % de actividad a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 40 % a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [*Jayaprakasha & Jagannmohan Rao.* 2000]. Según *Amorati et al.* [2016], los compuestos fenólicos deficientes en electrones reaccionan por **MATe**, mientras que aquellos con sustituyentes electrodonores pueden llevar a cabo **MATe** en varios puntos de sus estructura o **TEAP** separada, donde el solvente prótico interviene en la reacción, esto podría explicar las diferencias entre el compuesto **3**, cuyo anillo es más deficiente con respecto a los compuestos **1** y **2**, que si fueron activos.

De otra parte, el extracto acetónico de *Lobariella sipmanii* presenta valores similares a los del orselinato de metilo (**3**) a las 24 horas, comparables a los del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) a las 48

horas para (100 y 500) $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p-valor $> 0,05$ - Figura **E-17**, Anexo) y a los del **TPNa** a las 72 h (p-valor $> 0,05$ - Figura **E-18**, Anexo). Los valores de inhibición de la peroxidación a 24 h del extracto no presentaron diferencias estadísticamente significativas con los compuestos obtenidos, lo que podría significar la ausencia de efectos sinérgicos o antagonicos. Sin embargo, el extracto presenta diferencias significativas con el **BHT** a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p-valor $< 0,05$ - Figura **E-16**, Anexo) y 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p-valor $< 0,05$ - Figura **E-16**, Anexo).

Al realizar el ensayo a (48 y 72) horas se observa una marcada disminución en el porcentaje de inhibición para los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii*. El compuesto **1** disminuye a valores próximos al 20% y presenta diferencias significativas (p-valor $< 0,05$) con el **BHT** en todas las concentraciones y con el **TPNa** a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p-valor $< 0,05$ - Figura **E-17**). Un comportamiento similar presenta el compuesto **3** a partir de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; no obstante, su actividad inhibitoria se hace negativa a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por el contrario, el compuesto **2** es el que mejor actividad presenta a las (48 y 72) horas, presentando un comportamiento dependiente de la concentración entre (100 y 500) $\mu\text{g}/\text{mL}$, con diferencias significativas con el compuesto **3** a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (p-valor $< 0,05$) y sin presentar diferencias significativas (p-valor $> 0,05$) con los patrones **BHT** y **TPNa** a 48 h. A las 72 horas todos los compuestos aislados presentan diferencias significativas a con el **BHT** y con el **TPNa** (p-valor $< 0,05$ - Figura **E-18**).

Una posible explicación a la disminución de la inhibición de la peroxidación lipídica a (48 y 72) h, en especial a bajas concentraciones para todos los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii* es descrita por *Halliwell* [1995] y *Apak* [2019], que mencionan que los compuestos que presentan **MATH** actúan en el ensayo de peroxidación lipídica como terminadores de la cadena y por tanto se consumen al reaccionar de forma directa ya sea con el radical peroxilo, como con el lipoperóxido. Mientras que otros antioxidantes que tienen **MATe** presentan una mayor variedad de mecanismos y de reacciones, e incluso podrían regenerarse en el medio. Este mecanismo de interrupción de las reacciones en cadena responsables de la oxidación de lípidos ha sido sugerido para las sustancias que poseen en su estructura hidroxilos fenólicos, donde el compuesto al transferir un protón forma un radical fenoxilo menos reactivo [*Fernández-Moriano et al.* 2016; *Kosanić & Ranković*. 2015].

Carocho & Ferreira [2013], *Björn* [2008] & *Masaki* [2010] mencionan que los radicales hidroxilo formados por la reacción de Fenton producto de la interacción del peróxido de hidrógeno y los iones metálicos son primordiales en los procesos de peroxidación lipídica. Adicionalmente, *Gutteridge & Halliwell* [1990] señala que los hidroperóxidos lipídicos se descomponen en presencia de metales redox como hierro o cobre, lo que significa que los iones metálicos libres pueden acelerar los procesos de peroxidación de lípidos aunque no participen de forma directa en las reacciones de iniciación. Esto reviste importancia ya que el 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) tiene actividad **IPL** y moderada actividad reductora férrica, esta última contrarresta de forma directa la reacción de Fenton, por lo que el compuesto **2** podría impedir la peroxidación lipídica a través de dos mecanismos diferentes.

La oxidación de la fase lipídica del estrato córneo genera fallos en la función de barrera de la piel y también altera las proteínas presentes lo que puede desencadenar procesos inflamatorios en la piel [*Masaki*. 2010]. Por lo que la aplicación tópica de compuestos fenólicos y antioxidantes no solo evita la formación de peróxido de hidrógeno y la peroxidación lipídica inducida por la radiación **UV**, también previene el eritema y los daños genéticos que inducen la fotocarcinogénesis [*Baran & Maibach*. 2010, pp 120] [*Matsui et al.* 2009]. Además, en el estrato córneo la inhibición de la peroxidación lipídica reviste de gran importancia, debido a la ausencia

de componentes celulares vivos y a que los mecanismos antioxidantes están representados mayormente por mecanismos no enzimáticos, principalmente la presencia de α y γ -tocoferol, el primero de los cuales es más activo como antioxidante, seguidos en una mínima proporción por ubiquinoles y ácido ascórbico [Thiele *et al.* 2001; Baran & Maibach. 2010].

7.3.2 Actividad fotoprotectora

En la Figura E-19 y la Tabla 7-10 se muestran los datos de actividad fotoprotectora del extracto y los compuestos de *Lobariella sipmanii* junto a los de cuatro filtros solares orgánicos disponibles en productos cosméticos. La **AVO** es un filtro UV-A, la **BP3** es un filtro UV-A2 y UV-B, el **OMC - EHMC** es UV-B y el **BMT** es un filtro de amplio espectro (UV-B y UV-A). Los patrones **BMT**, **BP3** y **OMC-EHMC** poseen el valor máximo posible del ensayo de **FPS** *in vitro* a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que proporciona una alta protección en el UV-B y los diferencia de **AVO**, un filtro solar UV-A, cuyo valor de **FPS** a esa misma concentración es la mitad. Respecto a la λ_{crit} , tanto **AVO** como **BMT** presentan los valores más altos, siendo iguales o superiores a 370 nm. Por otro lado, **BP3**, un filtro UV-B y UVA-2 tiene un valor de longitud de onda crítica es de 350,6 nm a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que el **OMC - EHMC**, un filtro de amplio uso en productos cosméticos es un filtro UV-B ($\lambda_{\text{crit}} = 332,8$ nm a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Tabla 7-10: Datos promedio de actividad fotoprotectora de los compuestos obtenidos a partir de *Lobariella sipmanii*

Extracto / Sustancia	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Longitud de onda crítica	Amplitud espectral			Factor de Protección Solar
			UV-r*	R UVA/UVB	R UVA-I	
AVO	10	373,4 (0,9)	0,718 (0,151)	0,269 (0,057)	1,216 (0,075)	3,981 (0,176)
	50	377,0 (0,2)	4,458 (1,006)	1,672 (0,377)	1,024 (0,041)	21,56 (7,13)
	100	378,0 (1,4)	2,907 (0,118)	1,090 (0,044)	0,954 (0,008)	21,56 (7,13)
BMT	10	362,7 (0,1)	1,263 (0,049)	0,474 (0,018)	0,601 (0,010)	9,809 (0,844)
	50	364,1 (0,2)	1,744 (0,022)	0,654 (0,008)	0,720 (0,009)	40,01 (0,00)
	100	367,5 (0,0)	1,957 (0,010)	0,734 (0,004)	0,800 (0,003)	40,01 (0,00)
	200	374,2 (0,1)	2,108 (0,010)	0,790 (0,004)	0,850 (0,003)	40,01 (0,00)
BP-3	10	347,7 (0,6)	0,728 (0,133)	0,273 (0,050)	0,324 (0,067)	7,188 (1,052)
	50	350,7 (0,6)	0,866 (0,013)	0,325 (0,005)	0,371 (0,027)	20,90 (1,92)
	100	350,6 (0,5)	1,232 (0,029)	0,462 (0,011)	0,464 (0,018)	40,01 (0,00)
	200	355,7 (1,0)	1,425 (0,053)	0,534 (0,020)	0,573 (0,027)	40,01 (0,00)
OMC - EHMC	10	330,9 (3,0)	0,352 (0,048)	0,131 (0,022)	0,072 (0,045)	8,237 (0,321)
	50	329,6 (0,7)	0,360 (0,012)	0,135 (0,009)	0,042 (0,012)	34,54 (0,82)
	100	332,8 (0,4)	0,571 (0,010)	0,216 (0,003)	0,059 (0,009)	40,01 (0,00)
Extracto <i>Lobariella sipmanii</i>	10	351,0 (3,7)	0,487 (0,041)	0,183 (0,015)	0,283 (0,033)	4,539 (0,162)
	50	349,0 (1,0)	0,442 (0,011)	0,166 (0,004)	0,259 (0,008)	10,73 (0,27)
	100	348,0 (0,3)	0,418 (0,002)	0,157 (0,001)	0,248 (0,002)	17,57 (0,35)
	200	348,3 (0,6)	0,417 (0,012)	0,156 (0,005)	0,248 (0,005)	34,26 (2,59)
1	10	349,3 (3,4)	0,469 (0,032)	0,176 (0,012)	0,269 (0,028)	3,394 (0,041)
	50	357,9 (2,7)	0,511 (0,025)	0,192 (0,009)	0,317 (0,020)	5,128 (0,056)
	100	367,1 (0,7)	0,604 (0,010)	0,226 (0,004)	0,388 (0,007)	7,512 (0,223)
	200	365,8 (1,3)	0,700 (0,023)	0,262 (0,009)	0,428 (0,007)	9,822 (0,584)
2	10	339,5 (0,4)	0,417 (0,003)	0,157 (0,001)	0,178 (0,003)	4,117 (0,127)
	50	335,9 (0,2)	0,457 (0,001)	0,171 (0,001)	0,135 (0,003)	8,190 (0,125)
	100	334,7 (0,01)	0,466 (0,001)	0,175 (0,001)	0,117 (0,001)	12,35 (0,11)
	200	333,9 (0,0)	0,476 (0,002)	0,178 (0,001)	0,104 (0,001)	21,86 (0,09)
3	10	332,8 (0,2)	0,250 (0,001)	0,094 (0,001)	0,126 (0,002)	5,920 (0,026)
	50	322,0 (0,3)	0,136 (0,004)	0,051 (0,014)	0,063 (0,004)	17,04 (0,58)
	100	319,0 (0,1)	0,098 (0,002)	0,037 (0,001)	0,034 (0,001)	29,23 (1,37)
	200	319,5 (0,1)	0,103 (0,002)	0,038 (0,001)	0,025 (0,001)	38,41 (0,26)

La desviación estándar se presenta dentro de los paréntesis (**SD**)

En lo que concierne a los demás parámetros de amplitud espectral, los filtros **AVO**, **BMT** y **BP3** exhiben valores de relación UV-r* superiores a 0,8, lo que indica que estos compuestos ofrecen máxima protección en

el UV-A. En contraste, **OMC - EHMC** ofrece protección moderada. En la relación UVA-I la **AVO** tiene el valor más alto (0,954 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) seguido del filtro solar de amplio espectro **BMT** (0,800 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de la **BP3** (0,573 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En comparación, **OMC - EHMC** prácticamente no ofrece protección en el UVA-I (0,059 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Solo **AVO** y **BMT** superan el umbral de $R_{\text{UVA-I}} \geq 0,7$ que implica una buena fotoprotección entre 340 y 400 nm.

El extracto de *Lobariella sipmanii* presentó un **FPS** de 34,36 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En cuanto a la amplitud espectral, se puede clasificar al extracto como protector UV-B debido a que la $UV-r^*$ oscila entre 0,156 y 0,183, lo que es menor de 0,2. Por otro lado, la relación UVA-I es menor a 0,39 (entre 0,248 y 0,283), lo que significa una baja protección ante la radiación UVA-I. Por su parte, las sustancias liquénicas aisladas se distinguen de los filtros solares comerciales, principalmente en su **FPS**, la λ_{crit} y su relación UVA-I (p-valor < 0,05 - Figura **E-20 A, B y D**, Anexo). No obstante, no muestran diferencias estadísticamente significativas con los filtros **BMT**, **BP3** y **OMC - EHMC** en su relación UVA-UVB y en $UV-r^*$ (p-valor > 0,05 - Figura **E-20 C**, Anexo). Posiblemente, la aditividad espectral de los compuestos monoaromáticos **2** y **3** sean responsables de los altos valores de **FPS** *in vitro* que presentó el extracto de *Lobariella sipmanii*. De hecho, los compuestos **2** y **3** no presentaron diferencias estadísticamente significativas (p-valor > 0,05 - Figura **E-20 C y D**, Anexo) en los parámetros de amplitud espectral con respecto al **OMC-EHMC**, solo se distinguen en términos de **FPS** y λ_{crit} (p-valor < 0,05 - Figura **E-20 A y B**, Anexo), ya que los valores de las sustancias liquénicas aisladas son inferiores a los de los compuestos fotoprotectores comerciales.

Los compuestos monoaromáticos (**2** y **3**), debido a su menor grado de conjugación, presentan absorción en la región UV-B o en la UV-A 2, tal y como se observa en la longitud de onda crítica (λ_{crit}) que está entre 320 y 340 nm. Esto resulta relevante para prevenir el eritema y las quemaduras solares, así como la inmunosupresión causada por la radiación entre 250 nm y 320 nm [Walker & Young. 1997]. Los procesos de inmunosupresión impiden la destrucción de las células dañadas que pueden generar tumores y desencadenar **CP**. Walker & Young [1997] elucidó una relación lineal entre la inflamación cutánea (eritema) inducida por la radiación UV-B y la inmunosupresión. Sin embargo, la dosis de radiación umbral que da lugar a la inmunosupresión es más baja que la necesaria para dar lugar a la inflamación. En consecuencia, los fotoprotectores ofrecen una protección completa contra la inflamación; pero parcial ante la inmunosupresión, lo que reitera la necesidad de fotoprotectores que tengan valores de **FPS** más altos [Walker & Young. 1997]. En nuestro caso, los compuestos **2** y **3** ofrecen valores de **FPS** entre 21 y 38 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, por lo que podrían resultar prometedores no solo ante el eritema, sino también ante la inmunosupresión (Tabla **7-10**).

La exposición a la radiación UV-A, visible e **NIR** también genera efectos de inmunosupresión e inmunomodulación [Walker & Young. 1997; Zastrow et al. 2009]. Krutmann [1997] menciona que la radiación UV-A tiene efectos importantes en la inmunomodulación en la piel, regulando la expresión de interleucinas proinflamatorias IL-1 α , IL-6, IL-8 y el TNF- α , lo cual está relacionado con el balance redox (GSSG-GSH) de la células irradiadas. Adicionalmente, existe mayor relación entre la disminución de la respuesta inmune con el espectro de la radiación que con respecto al valor del **FPS**, por lo que se espera que los fotoprotectores de amplio espectro o con relaciones UV-A / UV-B mayores ofrezcan mejor protección ante la inmunosupresión [Walker & Young. 1997]. Además, la radiación UV-A puede inducir reacciones fototóxicas y fotoalérgicas con fármacos, ingredientes cosméticos y filtros solares [Grether-Beck & Krutmann. 2009]. Por esta razón, también sería ideal que los compuestos tuvieran mayor amplitud espectral y absorción en el **NIR**.

En este sentido, la pseudociferelina A (**1**) destaca por sus valores de amplitud espectral más altos comparados con los compuestos monoaromáticos obtenidos de *Lobariella sipmanii*. A pesar de que sus valores de la relación UVA-1 oscilan entre bajo a moderado (0,26 a 0,42), sus valores de R UVA/UVB aunque por debajo de 1,5 son superiores a los presentados por el extracto acetónico, mientras que su longitud de onda crítica osciló entre 349 nm y 365 nm, situándolo cerca del límite establecido por la FDA para los protectores solares de amplio espectro (370 nm), por esto esta sustancia podría proponerse como un eventual filtro solar UV-A. Este compuesto (**1**) mostró diferencias significativas en la relación UV-A I (p-valor < 0,05) con el **OMC-EHMC** y con el orselinato de metilo (**3**), así como en su λ_{crit} con el **OMC-EHMC** y los compuestos **1** y **2** (p-valor < 0,05 - Figura **E-20 A**, Anexo). De hecho, el compuesto **1** presenta parámetros de amplitud espectral similares a la benzofenona-3 (p-valor > 0,05 Figura **E-20 C**, Anexo), compuesto que es fotoprotector UV-B / UV-A 2, excepto para la R UVA-I (p-valor < 0,05 - Figura **E-19**, **E-20 D**, Anexo). Con respecto a la inmunosupresión, para el dépsido atranorina (**A**) se ha obtenido que esta no interfiere con los efectos apoptóticos luego de la irradiación con luz UV-B, lo que puede ayudar a la prevención del **CP** [Varol *et al.* 2015]. Debido a la similitud estructural entre el compuesto **1** y **A** podría sugerirse una actividad biológica similar, aunque esta hipótesis requiere de comprobación experimental.

A pesar de esta ventaja, el compuesto **1** ofrece una fotoprotección mínima en el UV-B (**FPS** = 9,82 a 200 $\mu\text{g/mL}$), ya que el mínimo valor de **FPS** requerido para etiquetarlo como fotoprotector UV-B es 15, según los criterios de la *Federal Drug Administration* [2019]. La disminución en el valor del **FPS** concuerda con la observación de *Nomelin-Ballen* [2020], quien afirma que el cambio en los sustituyentes puede llevar a una disminución en el grado de fotoprotección de los compuestos. Esto se sustenta al comparar los valores de los parámetros de fotoprotección de **A** obtenida de *Everniastrum cirrhatum* con la pseudociferelina A (**1**), también al comparar los compuestos monoaromáticos obtenidos en este trabajo, se observa que la sustitución de varios hidrógenos sobre el anillo aromático por grupos metilo hacen que haya un efecto batocrómico en la λ_{crit} (320 nm a 335 nm), además de un marcado efecto hipocrómico en la región UV-B, como se observa en la disminución de los valores de **FPS in vitro** del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetil benzoato de metilo (**2**) comparado con el orselinato de metilo (**3**).

El mecanismo por el cual los compuestos fenólicos de *Lobariella sipmanii* llevan a cabo su actividad fotoprotectora probablemente es mediante la absorción de la radiación **UV** y la disipación la energía mediante dispersión radiativa o relajación vibracional (**NIR**) [Varol *et al.* 2015]. Esto ha sido observado para dépsidos como **A** y se asocia a la presencia de grupos carbonilo sobre anillos aromáticos en la estructura [Siesler *et al.* 2001; *Nomelin-Ballen*. 2020; Varol *et al.* 2015]. Sin embargo, estos métodos de disipación pueden aumentar la temperatura y originar **EROs** en la piel, lo que podría causar daños como el eritema *ab igne* [Varol *et al.* 2015; Cho *et al.* 2009; Sklar *et al.* 2013]. De hecho, exposición de la piel a la luz solar puede elevar su temperatura hasta más de 40 °C, producto de la relajación vibracional [Cho *et al.* 2009]. Aunque los efectos térmicos pueden ser contrarrestados al menos en parte producto de la actividad antioxidante de los compuestos **1** y **2**.

Aunque es un aspecto deseable en los productos cosméticos fotoprotectores, la protección ante la radiación infrarroja y la luz **NIR** se ha manejado principalmente a través de las pantallas solares o filtros solares inorgánicos (físicos) [Diffey & Cadars. 2016]. Por otra parte, Krutmann *et al.* [2021] & Grether-Beck *et al.* [2014] señalan que otra estrategia además de la dispersión física de la radiación **IR** es el uso tópico de sustancias antioxidantes. Para los filtros solares orgánicos (químicos) comercialmente disponibles la protección

en el **NIR** ha sido poco explorada y menos aún para las sustancias de origen natural que se proponen como alternativas a los filtros solares sintéticos. En la Sección 5 se detallaron varios efectos sobre las mitocondrias y el metabolismo energético de las células, como la formación de **EROs** o la degradación de la matriz extracelular, entre otros [Schieke *et al.* 2002; Kim *et al.* 2006; Karu. 2008; Schroeder *et al.* 2008ab; Cho *et al.* 2009; Krutmann *et al.* 2021].

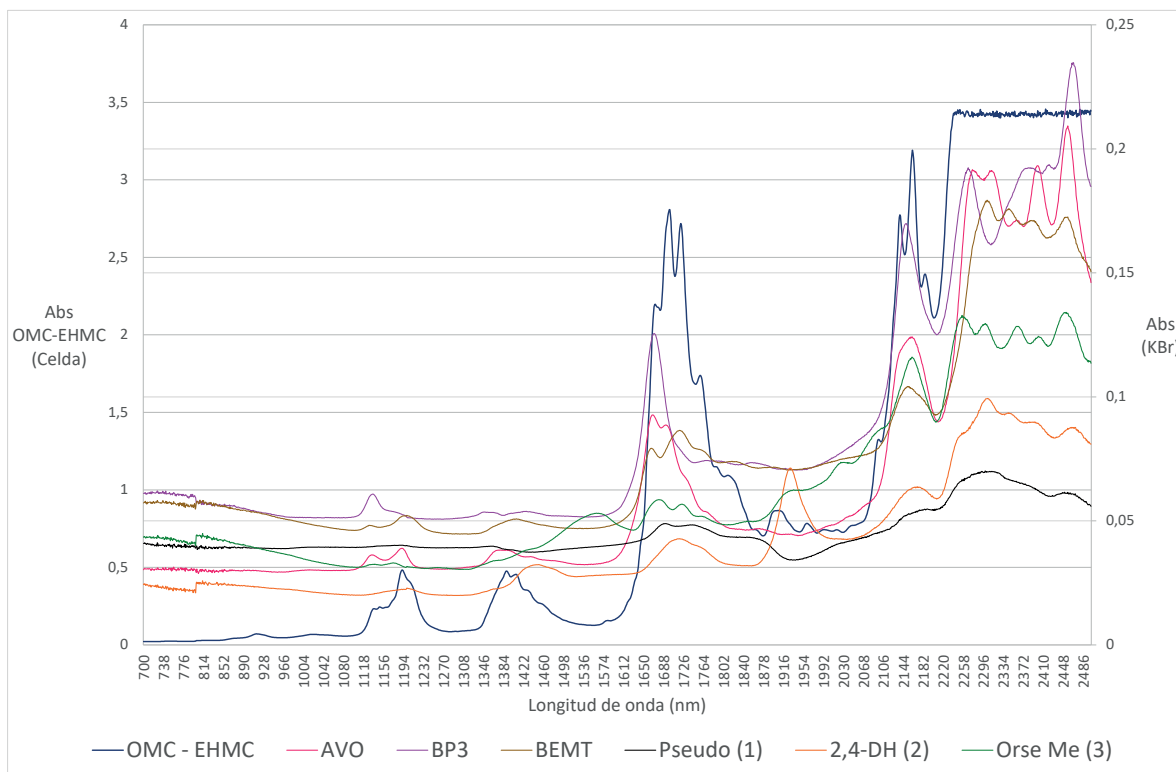


Figura 7-9: Espectros de Infrarrojo Cercano **NIR** (700 - 2 500) nm de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* y de los filtros solares comerciales usados como controles. El **OMC - EHMC** se tomó líquido en celda de cuarzo y su escala corresponde a la del lado izquierdo. Los demás compuestos se tomaron dispersos en KBr y emplean la escala del lado derecho

Se observa que tanto los fotoprotectores comercialmente disponibles, como los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii* no presentan absorción entre (700 y 1 100) nm (Figura 7-9). No obstante, los filtros comerciales y los compuestos monoaromáticos (**2** y **3**) presentan pequeñas absorciones entre (1 100 y 1 200) nm, atribuibles a los sobretonos de los estiramientos de la porción alifática (C-H). La absorción en esta zona y en las regiones de sobretonos la porción alifática entre (1 650 y 1 800) nm y por encima de 2 200 nm fue menor en aquellos compuestos con mayor grado de sustitución (**1** y **2**) sobre los anillos aromáticos en comparación con compuestos cuyos anillos aromáticos presentan un menor grado de sustitución (**3**). Por lo que en la región **NIR** también es evidente el efecto hipocrómico que fue observado en el UV-B. En las demás regiones del **NIR**, los compuestos monoaromáticos (**2** y **3**) obtenidos de *Lobariella sipmanii* presentan espectros similares a los de algunos filtros solares disponibles comercialmente como el **OMC-EHMC** o el **BMT**, por lo que resultan prometedores para esta región del espectro.

Desde una perspectiva de relación estructura-actividad, para que los compuestos fotoprotectores presenten

un buen grado de absorción en el UV-B y en el **NIR**, deben tener porciones aromáticas preferiblemente con grupos sustituyentes que donen electrones al anillo por efecto inductivo o por efecto mesomérico (resonancia), como es el caso de los aniones carboxilato ($-\text{COO}^-$), o los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$) respectivamente [Amorati *et al.* 2016]. Aunque algunos grupos electroattractores como el grupo carbonilo también podrían estar presentes para potenciar la fotoprotección, como sucede en la atranorina (**A**) [Varol *et al.* 2015]. De igual forma, la porción aromática debe presentar bajo grado de sustitución por parte de grupos alifáticos como grupos metilo o cadenas hidrocarbonadas. Compuestos como el ácido evérnico (dépsido) poseen grado intermedio de sustitución sobre anillos aromáticos y tres grupos electrodonores en uno de los anillos (hidroxilo, metoxilo y metilo) o como el β -orcinol carboxilato de metilo, son sustancias que presentan absorción en el **UV** y obtengan altos valores de **FPS** [Lohezic-Le Devehat *et al.* 2013]. Por otro lado, la extensión del grado de conjugación hace que los compuestos presenten mayor amplitud espectral y mejor absorción en la región UV-A, tal y como sucede con **BMT**, **BP3** y **1**.

Otro aspecto relevante es la fotoestabilidad de los compuestos. La radiación **UV** tiene la energía suficiente para inducir reacciones químicas que generen fototoxicidad y fotoalergenicidad o incluso inmunosupresión al actuar sobre moléculas endógenas [Krutmann. 1997; Grether-Beck & Krutmann. 2009]. Al respecto, Huong *et al.* [2007] la considera uno de los parámetros de efectividad más importantes a ser evaluados, debido a que la pérdida de capacidad fotoprotectora durante la exposición de un filtro a la luz solar representa un riesgo de daños para el usuario y puede causar más perjuicios que la protección que brinda. En este punto es preciso destacar que ninguno de los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii* experimentan reacciones de fotoisomerización, como las que presenta el filtro solar UV-B **OMC - EHMC**, ni sufren fotodegradación como el caso de la **AVO**. De hecho, Lohezic-Le Devehat *et al.* [2013] reporta que las sustancias líquénicas son fotoestables. Sin embargo, este aspecto no pudo ser evaluado para los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*.

7.3.3 Lipofilicidad y permeabilidad dérmica

Gorouhi & Maibach [2009] afirman que el estrato córneo, de naturaleza lipofílica, constituye la principal barrera para el ingreso de sustancias a través de la piel. Según el modelo de “bloques y cemento” (*brick and mortar*) del estrato córneo, existen dos posibles rutas que puede tomar una sustancia: La primera es el tránsito alternado entre las fases lipídica (cemento) y proteica (bloques), mientras que la segunda es la difusión pasiva a través de la fase lipídica exclusivamente [Norlén. 2003].

La permeabilidad cutánea de una sustancia se relaciona con varios factores, como sus propiedades fisicoquímicas, tamaño y peso molecular, afinidad de unión, solubilidad en agua y coeficiente de reparto [Gorouhi & Maibach. 2009; Pecoraro *et al.* 2019]. De todas estas propiedades, la lipofilicidad determinada por el coeficiente de reparto, brinda una estimación preliminar de la capacidad de las sustancias de ser absorbidas por el estrato córneo de la piel [Norlén. 2003]. Sin embargo, la permeabilidad de cualquier sustancia en la piel también depende de factores fisiológicos, como el estado físico y metabólico de la piel (grosor, componentes, sitio de aplicación, estado de hidratación), así como de la escala temporal del proceso [Gorouhi & Maibach. 2009].

7. Resultados y discusión 7.3. Actividad biológica de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii*

En el caso de los compuestos obtenidos de **HL**, resulta deseable que no solo sean entregados, sino que también permeen el estrato córneo, dado que deben ejercer su actividad dual antioxidante y fotoprotectora sobre la zona vital de la epidermis. Al respecto, *Abla & Banga* [2013] mencionan que un buen candidato a antioxidante para uso cosmético de aplicación tópica debe cumplir 2 condiciones.

1. Permear al estrato córneo desde la formulación
2. Alcanzar las capas profundas de la piel sin ser absorbido por el torrente sanguíneo

Existen ciertos criterios que proporcionan una aproximación para determinar la capacidad de una sustancia de permear a través la piel [*Guy & Hadgraft*. 2002; *Gorouhi & Maibach*. 2009; *Abla & Banga*. 2013].

1. Peso molecular menor a 500 Da.
2. Logaritmo del coeficiente de reparto moderado entre 1 y 3 ($1 \leq \text{Log } P \leq 3$).
3. Punto de fusión menor a 200 °C, por sus efectos en la solubilidad de la sustancia.
4. Solubilidad en agua cercana a 1 mg mL⁻¹.
5. Con ningún o con pocos centros polares (cargas).

A partir de los valores de *Log P* se puede afirmar que los compuestos que tienen moderado carácter hidrofílico y lipofílico en forma simultánea son los que más altas tasas de difusión presentan a través de la piel [*Norlén*. 2003].

Con el propósito de determinar la lipofilidad y la potencial permeabilidad dérmica de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* y de algunos fotoprotectores disponibles comercialmente se calcularon los valores de coeficiente de reparto y energía libre de Gibbs de transferencia. Se observa que los compuestos liquénicos obtenidos (Tabla 7-11) tienen coeficientes de reparto (*Log P*) entre 2,38 y 7,06. Los valores más bajos se obtienen para los 2 compuestos monoaromáticos (**2** y **3**) y el más alto para el dépsido **1**, esto es consistente con el hecho de que este último compuesto tiene un mayor peso molecular. Por su parte, los fotoprotectores disponibles comercialmente presentan valores de *Log P* entre 3,64 y 9,14 lo que significa que son menos polares y más lipofílicos que los compuestos liquénicos obtenidos.

Tabla 7-11: Valores de coeficiente de reparto (*Log P*) y de energía libre de Gibbs de transferencia

Compuesto	ACD Log P	SD	$\Delta_t \bar{G}_{O \rightarrow W}^\theta$ (kJ mol ⁻¹)	SD
AVO	4,81	0,17	-27,45	0,97
BMT	9,14	0,75	-52,17	4,28
BP-3	3,64	0,37	-20,78	2,11
OMC - EHMC	5,66	0,25	-32,31	1,43
(1)	7,06	0,49	-40,30	2,80
(2)	2,98	0,26	-17,01	1,48
(3)	2,38	0,26	-13,58	1,48

Además, al analizar la estructura de los compuestos liquénicos obtenidos con respecto a los criterios ya mencionados, se observa que en condiciones fisiológicas normales ninguno de los compuestos posee grupos

cargados. Además, los compuestos liquénicos monoaromáticos (**2** y **3**) obtenidos de *Lobariella sipmanii* cumplen con los criterios previamente descritos, mientras que la pseudociferelina A (**1**) solo excede los valores de $\text{Log } P$ ($\text{Log } P = 7,06$), lo que implica que probablemente podría ser retenido en la porción lipídica del estrato córneo.

Otros criterios que deben considerarse en la estructura y que definen la difusividad de las moléculas a través del estrato córneo incluyen el tamaño molecular y el número de puentes de hidrógeno que puede formar la molécula [Gorouhi & Maibach. 2009]. La difusión pasiva es máxima para moléculas pequeñas que no forman puentes de hidrógeno y mínima cuando la molécula puede formar alrededor de 4 puentes. A primera vista, los compuestos fenólicos por la presencia de grupos hidroxilo que son donores y aceptores de puente de hidrógeno tienden a quedar retenidos en el estrato córneo [Abla & Banga. 2013]. Sin embargo, Pecoraro et al. [2019] sugiere que las limitaciones en la difusión y permeabilidad cutánea tienen más relación con la capacidad de la molécula para aceptar puentes de hidrógeno.

En consecuencia, es posible que los compuestos monoaromáticos (**1** y **2**) obtenidos de *Lobariella sipmanii*, pese a su valor menos negativo de energía libre de transferencia, presenten una mayor permeabilidad cutánea debido a su menor peso molecular, coeficiente de reparto moderado, y menor número de sitios aceptores y donores de puente de hidrógeno. Cada uno de estos compuestos puede aceptar 3 puentes de hidrógeno: dos a través de los grupos hidroxilo y uno por el grupo carbonilo. En este sentido, el compuesto **1** podría estar en desventaja en comparación con los compuestos monoaromáticos aislados, ya que posee tres sitios donores (hidroxilos fenólicos) y 6 aceptores (hidroxilos y 3 grupos carbonilo), lo que sumado a su mayor $\text{Log } P$ podría afectar su potencial permeabilidad.

Además, si consideramos los valores negativos de energía libre de transferencia ($\Delta_t \bar{G}_{O \rightarrow W}^\theta$ - Tabla 7-11), todos los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* tienen la posibilidad pasar a la porción lipídica y permear el estrato córneo. No obstante, el compuesto **1** exhibe el valor más negativo de $\Delta_t \bar{G}_{O \rightarrow W}^\theta$, lo que podría indicar una mayor afinidad de la sustancia por la porción lipídica y, por ende, una mayor favorabilidad a la difusión pasiva. Esto también podría aplicarse a los filtros solares evaluados, ya que presentan valores de $\text{Log } P$ y de $\Delta_t \bar{G}_{O \rightarrow W}^\theta$ similares a los del compuesto **1**. Adicionalmente, existe respaldo experimental para esta afirmación sobre moléculas lipofílicas, como el retinol, que puede difundirse mediante la disrupción de la capa lipídica del estrato córneo, lo que facilita su permeación hacia las capas subyacentes de la piel [Abla & Banga. 2013].

En contraste, los compuestos monoaromáticos (**2** y **3**) más hidrofílicos podrían permear la piel por tránsito alternado entre las fases acuosa y lipídica, lo que según Abla & Banga [2013], genera diferencias en la distribución de los compuestos a lo largo de las capas de la piel. Sin embargo, será necesario llevar a cabo estudios adicionales sobre las sustancias liquénicas de *Lobariella sipmanii* para confirmar esta hipótesis.

7.3.4 Relación estructura - riesgos para la salud y el medio ambiente

Relación estructura - potencial alergénico

En términos generales, la piel es un entorno nucleofílico debido a la abundancia de sustancias con grupos ricos en electrones, como las proteínas. En contraste, los compuestos sensibilizadores poseen grupos electrófilos con enlaces polarizados por átomos o grupos altamente electronegativos [Divkovic *et al.* 2005; Aptula *et al.* 2005; Karlberg *et al.* 2008; Chittiboyina *et al.* 2015]. Estos compuestos se suelen denominar **alérgenos**, son sustancias de bajo peso molecular con carácter electrofílico, que reaccionan con proteínas para formar haptenos, los cuales inducen la respuesta inmune y causan la sensibilización de la piel [Chittiboyina *et al.* 2015; Abbas *et al.* 2017]. Algunos de los alérgenos más comunes incluyen a los filtros solares orgánicos de origen sintético [Lodén *et al.* 2011; Gilbert *et al.* 2013], lo que resulta en la necesidad de garantizar que cualquier alternativa de origen natural que se proponga sea mucho más segura y carezca de aquellas características estructurales que las hacen propensas de reaccionar con proteínas y generar haptenos.

Aquellos grupos que son capaces de inducir alergias son: los grupos carbonilo en función aldehído, cetona o éster cíclico lactona; sistemas de dobles enlaces conjugados, insaturaciones α, β a carbonilos o aceptores tipo Michael, anillos aromáticos π -deficientes susceptibles a sustitución nucleofílica aromática y aquellas sustancias con grupos salientes susceptibles a acilación [Aptula *et al.* 2005; Karlberg *et al.* 2008; Chittiboyina *et al.* 2015]. El proceso de haptización generalmente implica la unión entre la proteína y el hapteno a través de enlaces covalentes, aunque también puede llevarse a cabo producto de la alteración no covalente de la estructura terciaria de la proteína, lo que genera su reconocimiento como ajena por parte del sistema inmune [Divkovic *et al.* 2005].

Existen tres principales mecanismos para la unión covalente con proteínas. En primer lugar, la sustitución nucleofílica sobre un centro saturado; en segundo lugar, la sustitución sobre un centro insaturado; y finalmente, la adición nucleofílica. No obstante, estos procesos pueden encontrar mecanismos alternativos; por ejemplo, a través de la generación de radicales libres favorecidos por condiciones de alta irradiación, estrés oxidativo o la liberación de metales redox al medio extracelular. De tal forma que un compuesto inicialmente no electrofílico podría convertirse en uno, si sufre procesos de oxidación o metabolismo en la superficie de la piel [Divkovic *et al.* 2005; Aptula *et al.* 2005; Karlberg *et al.* 2008]. Posibles ejemplos son las reacciones de auto-oxidación, en donde un compuesto orgánico mediante una reacción radicalaria inserta una molécula de oxígeno en un enlace C-H para formar hidroperóxidos. Estas sustancias son potentes sensibilizadores y alérgenos, además, pueden formar otras especies radicalarias al romperse el enlace entre los dos átomos de oxígeno [Karlberg *et al.* 2008].

En consecuencia, aquellas sustancias que evitan el estrés oxidativo mediante la captación de radicales o la reducción de iones metálicos redox pueden prevenir la reacción de los alérgenos con las proteínas o la generación de estas sustancias por reacciones de auto-oxidación. De los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*, dos destacan por su prometedora actividad captadora de radicales libres: el compuesto **2** (CE₅₀ = 13,04 mg/mg DPPH - Actividad Captadora 45,1 %) y el compuesto **1** (CE₅₀ = 15,50 mg/mg DPPH - Actividad Captadora 59,1 %). El compuesto **2** presentó moderada actividad reductora férrica y mostró el mejor desempeño en inhibición de la peroxidación lipídica (65 %) a las 24 h, con valores similares al **BHT** y

al **TPNa**. En contraste, el compuesto **3** no exhibe actividad captadora de radicales libres, ni poder reductor férrico, tampoco inhibe la peroxidación lipídica. Por lo que no se puede proponer como opción viable para ser empleado en la prevención de eventuales alergenicidades.

En relación con los grupos electrofílicos presentes en los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*, la pseudociferelina A (**1**) es el único compuesto aislado que contiene un grupo aldehído, característica que puede propiciar la generación de haptenos. Los anillos aromáticos próximos a grupos carbonilo retiran densidad electrónica al grupo aumentando su potencial electrofílico [Aptula et al.. 2005]. Por lo tanto, este grupo aldehído tiene el potencial de reaccionar con grupos amino libres, formando bases de Schiff. Los grupos amino libres son frecuentes en las cadenas laterales de aminoácidos básicos, tales como Lisina, Arginina e Histidina [Divkovic et al.. 2005; Chittiboyina et al.. 2015].

La lipofilidad también afecta el potencial alergénico de los compuestos, principalmente por el reparto que tienen estas sustancias en la porción lipídica del estrato córneo [Aptula et al.. 2005]. Los compuestos que no se difunden con facilidad en los lípidos del estrato córneo o que no generan disrupción de esta fase generalmente no causan alergias, ya que no alcanzan las capas subyacentes de la piel. De los compuestos obtenidos, solo la pseudociferelina A (**1**) tiene un valor alto de $\text{Log } P$ y el valor más negativo de energía libre de transferencia ($\Delta_t \bar{G}_{O \rightarrow W}^\theta$), por lo que podría difundirse fácilmente en la porción lipídica del estrato córneo. Sin embargo, debido a que puede aceptar múltiples puentes de hidrógeno (6), esta sustancia podría permanecer retenida en el estrato córneo, evitando así reactividad del grupo aldehído con proteínas de la piel.

En comparación con los compuestos aislados, los filtros solares comerciales tienen mayor potencial de alergenicidad. Los cinamatos como el **OMC - EHMC** y el cinoxato son aceptores de tipo Michael, conformado por un sistema conjugado entre el anillo aromático y el grupo carbonilo del éster. Compuestos como el octocrileno y los derivados del alcanfor presentan sistemas α, β -insaturados (Tabla 5-2). Mientras que las triazinas como el Uvinul T150 (Etil hexil triazona) tienen un anillo aromático central π -deficiente que puede dar reacciones de sustitución nucleofílica aromática y con ello desencadenar alergias de contacto [Lodén et al.. 2011]. Por su parte, la **AVO** es una dicetona que puede originar bases de Schiff con grupos amino presentes en las proteínas. Además, cuando se expone a la luz **UV**, genera radicales benzilo y arilglioxales, que son potentes agentes sensibilizadores de la piel [Gilbert et al.. 2013; Afonso et al.. 2014].

Por el contrario, las estructuras de los compuestos **1**, **2** y **3** presentan grupos éster, que son estables y poco susceptibles a la sustitución nucleofílica al acilo, debido a que el grupo alcóxido no es buen grupo saliente [Aptula et al.. 2005]. Además, los compuestos **1** y **2** al tener tres sustituyentes metilo no pueden sufrir activación de tipo Michael, a pesar de ser compuestos aromáticos dihidroxilados. Del mismo modo, tanto estos compuestos, como el compuesto **3** al tener sus dos grupos hidroxilo en patrón de sustitución *meta*, no pueden formar quinonas, que son aceptores tipo Michael capaces de causar sensibilización [Aptula et al.. 2005; Divkovic et al.. 2005; Karlberg et al.. 2008]. Debido a estas características estructurales, los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii* pueden considerarse como alternativas fotoprotectoras con un mejor perfil de seguridad comparadas con los filtros actualmente disponibles.

Potencial toxicidad ambiental y bioacumulación

Existe una creciente preocupación acerca de la seguridad y los efectos de la exposición a sustancias químicas sintéticas. Como ya se indicó, muchos protectores solares orgánicos impactan de manera negativa el medio ambiente, particularmente los ecosistemas acuáticos, debido a los efectos hormonales que pueden ejercer estas sustancias sobre los organismos [MacManus-Spencer *et al.* 2011; Blüthgen *et al.* 2012; Juliano *et al.* 2017; Lorigo *et al.* 2018; Kar *et al.* 2020]. Al considerar que los filtros solares orgánicos constituyen hasta el (15 o 20) % del peso total de las formulaciones comerciales fotoprotectoras en **PPCP** [Carve *et al.* 2021; Juliano *et al.* 2017], resulta conveniente establecer el potencial ecotoxicológico de aquellos compuestos propuestos como alternativas, dentro de sus estrategias de diseño, descubrimiento y uso racional [Voutchkova-Kostal *et al.* 2012; Corrales *et al.* 2017]. Aunque por su origen natural se presume que las sustancias liquénicas son menos nocivas para el medio ambiente con respecto a los compuestos existentes, resulta crucial corroborar esta hipótesis con el fin de lograr la eventual sustitución de los filtros solares orgánicos existentes con compuestos presentes en **HL** y lograr la bioprospección de la especie que los produce.

A partir de los coeficientes de reparto (Tabla **7-11**) es posible calcular el factor de bioacumulación en peces (**BCF**) con el método de Bintein *et al.* [1993], y también evaluar la posible toxicidad para varios tipos de organismos usando la herramienta US-EPA-ECOSAR [Mayo-Bean *et al.* 2012]. Tanto los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii*, como los filtros solares comerciales usados como control hacen parte de las Clases ECOSAR I y II, que son respectivamente compuestos orgánicos neutros y compuestos orgánicos con mecanismos de toxicidad específica [Mayo-Bean *et al.* 2012]. En la Clase II se incluyen los compuestos que posean algún grupo funcional reactivo de naturaleza electrofílica, por esta razón, los criterios empleados en estos métodos son similares a los analizados en la sección anterior. Los resultados de los cálculos realizados se muestran en la Tabla **7-12**.

En la anterior tabla es posible observar que los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* tienen un perfil de seguridad más favorable comparados con los filtros comercialmente disponibles, con excepción de la pseudociferelina A (**1**). Esta sustancia presenta un valor de *Log P* de 7,06 y un grupo carbonilo en función aldehído, a pesar de estas características, al ser un dépsido presenta una unión de tipo éster entre los anillos A y B que es susceptible de ruptura enzimática por parte de esterasas. Ello generaría los dos compuestos monoaromáticos constituyentes reduciendo de este modo su potencial de bioacumulación y su posible toxicidad. Por el contrario, los filtros solares comerciales ensayados tienen enlaces de tipo éter, los cuales no son fácilmente biodegradables (Tabla **5-2**).

De igual forma, a pesar de su tamaño molecular el compuesto **1** posee seis sitios aceptores de puentes de hidrógeno y tres sitios donores, que corresponden a los hidroxilos fenólicos. Según Wen *et al.* [2012], la bioconcentración aumenta de forma linealmente proporcional al coeficiente de reparto (*Log P*), también se incrementa con el tamaño molecular, mientras que disminuye al aumentar la basicidad de los compuestos hidrofóbicos y/o al aumentar los sitios capaces de formar puentes de hidrógeno con el agua. De otra parte, los compuestos monoaromáticos aislados (**2** y **3**) tienen menor potencial de bioacumulación por sus valores de *LogBCF* menores a 4, la presencia de tres sitios aceptores y dos donores de puente de hidrógeno, además de su bajo peso molecular. Este potencial es mucho más bajo con respecto a los filtros solares empleados como control, que comúnmente se encuentran en formulaciones cosméticas, lo que hace de estos compuestos

Tabla 7-12: Valores calculados de toxicidad y bioacumulación en algunos organismos acuáticos

Compuesto	ACD Log P	SD	Log BCF ⁺	SD	ECOSAR (mg/L)
AVO	4,81	0,17	3,59	-0,63	Peces LC ₅₀ : 1,43 (96 h) <i>Daphnia</i> LC ₅₀ : 1,03 (48 h) Algas Verdes CE ₅₀ : 1,99 (96 h) Crustáceos LC ₅₀ : 0,250 (96 h)
BMT	9,14	0,75	7,53	-0,10	Peces LC ₅₀ : $1,46 \times 10^{-4}$ (96 h) <i>Daphnia</i> LC ₅₀ : $1,63 \times 10^{-4}$ (48 h) Algas verdes LC ₅₀ : $1,96 \times 10^{-3}$ (96 h) Crustáceos LC ₅₀ : $1,03 \times 10^{-6}$ (96 h)
BP-3	3,64	0,37	2,53	-0,45	Peces LC ₅₀ : 8,01 (96 h) <i>Daphnia</i> LC ₅₀ : 5,24 (96 h) Algas verdes CE ₅₀ : 6,98 (96 h) Crustáceos LC ₅₀ : 2,69 (96 h)
OMC - EHMC	5,66	0,25	4,36	-0,56	Peces LC ₅₀ : $9,18 \times 10^{-2}$ (96 h) <i>Daphnia</i> LC ₅₀ : $7,48 \times 10^{-2}$ (48 h) Algas verdes CE ₅₀ : $7,68 \times 10^{-2}$ (96 h) Crustáceos LC ₅₀ : $6,69 \times 10^{-3}$ (96 h)
1	7,06	0,49	5,64	-0,34	Peces LC ₅₀ : $3,50 \times 10^{-2}$ (96 h) <i>Daphnia</i> LC ₅₀ : $1,80 \times 10^{-2}$ (48 h) Algas verdes CE ₅₀ : $2,06 \times 10^{-2}$ (96 h) Crustáceos LC ₅₀ : $4,25 \times 10^{-3}$ (96 h)
2	2,98	0,26	1,93	-0,55	Peces LC ₅₀ : 43,1 (96 h) <i>Daphnia</i> LC ₅₀ : 254 (48 h) Algas verdes CE ₅₀ : 24,8 (96 h) Crustáceos LC ₅₀ : 255 (96 h)
3	2,38	0,26	1,38	-0,55	Peces LC ₅₀ : 3,89 (96 h) <i>Daphnia</i> LC ₅₀ : 23,3 (48 h) Algas verdes CE ₅₀ : 2,26 (96 h) Crustáceos LC ₅₀ : 22,3 (96 h)

⁺ Modelo tomado de: *Bintein et al.* [1993].

CE₅₀: Concentración efectiva media para efectos de toxicidad aguda. LC₅₀: Concentración letal media.

monoaromáticos potenciales alternativas en la sustitución de los filtros solares usados en la actualidad.

En contraste, los filtros solares comerciales ensayados tienen un *Log P* más alto, lo que implica baja solubilidad en agua y, a primera vista, menor biodisponibilidad. Sin embargo, pueden presentar problemas debido a que las sustancias más hidrofóbicas tienden a asociarse con la materia orgánica o el sedimento (bentos), que es fuente de alimento de algunos organismos acuáticos [*Juliano et al.* 2017; *Kar et al.* 2020]. Esto conlleva la eventual absorción de estas sustancias a través del tracto digestivo, lo que resulta en su acumulación en los tejidos y su posterior paso a los eslabones superiores de las cadenas tróficas [*Wen et al.* 2012; *Kaiser et al.* 2012; *Huang et al.* 2021; *Carve et al.* 2021]. Lo que puede desencadenar procesos de biomagnificación y/o causar otros efectos adversos como la disrupción endocrina, que ya se han reportado para muchos organismos [*Schlumpf et al.* 2004; *Axelstad et al.* 2011; *Lorigo et al.* 2018; *Huang et al.* 2021]. Además, los metabolitos de transformación en el ambiente de muchas sustancias presentes en **PPCP** suelen ser más persistentes, bioacumulativos y/o tóxicos que las moléculas originales [*Watanabe et al.* 2018; *Kar et al.* 2020].

La potencial bioacumulación en organismos es definida en gran medida por la concentración de lípidos presente en los tejidos de estos; no obstante, existen factores adicionales que pueden afectar el grado de bioacumulación de un compuesto individual en un determinado organismo [*Wen et al.* 2012]. Un factor es el coeficiente de reparto. Aunque la mayoría de los compuestos orgánicos poseen coeficientes de reparto (*Log P*) que oscilan entre 0,5 y 6, aquellos compuestos no iónicos de carácter hidrofílico tienen bajo potencial de bioconcentración debido a que su principal reservorio *in vivo* no son los lípidos ni las membranas, sino el citosol, el plasma y otras fases acuosas dentro de ellos [*Wen et al.* 2012]. En contraste, los compuestos altamente hidrofóbicos (*Log P* > 7) o de gran tamaño molecular presentan una disminución en su *LogBCF* a

medida que aumenta la hidrofobicidad, debido a la falta de biodisponibilidad producto de su baja solubilidad en agua y/o su asociación a la materia orgánica [Wen *et al.* 2012]. Se observa en la Tabla 7-11 que los filtros solares orgánicos presentan mayores valores de coeficiente de reparto ($\log P$) lo que significa alta lipofilia, debido a la necesidad de ser solubles en la porción lipídica del estrato córneo. Esto en consecuencia implica un mayor potencial de bioacumulación [Carve *et al.* 2021; Huang *et al.* 2021].

Adicionalmente, la permeabilidad cutánea constituye un factor crítico para la evaluación de posibles riesgos, ya que no solo se considera para evaluar la posible alergenicidad, sino también para examinar posibles efectos nocivos o tóxicos en el medio ambiente y sobre otros organismos [Pecoraro *et al.* 2019]. En la Tabla 7-11 se observa que los filtros solares evaluados tienen valores de energía libre de Gibbs de transferencia inferiores a -20 kJ mol^{-1} , lo que hace favorable su difusión pasiva a través de la piel. Esto resulta relevante, dado que en los organismos acuáticos la vía de ingreso al organismo es a través de la piel o los epitelios de órganos respiratorios y/o digestivos [Voutchkova-Kostal *et al.* 2012; Melnikov *et al.* 2016]. Esto no solo va a influir en la bioacumulación, sino también en la toxicidad, dado que esta también está relacionada con el reparto del compuesto hacia fases lipídicas ($\log P$).

Para la mayoría de los compuestos orgánicos, tales como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, cetonas, aldehídos, entre otros, los efectos tóxicos en peces y otros organismos acuáticos ocurren mediante mecanismos no específicos y reversibles, lo que se denomina **narcosis** [Melnikov *et al.* 2016]. Sin embargo, el coeficiente de reparto por sí solo resulta insuficiente como predictor de la toxicidad, por lo que resulta necesario para tener una mejor aproximación, considerar en la comparación las características de reactividad y los grupos funcionales de las moléculas en relación con mecanismos de toxicidad específicos asociados a la posibilidad de generar modificaciones nucleofílicas o electrofílicas sobre el ADN, enzimas, receptores, entre otros [Voutchkova-Kostal *et al.* 2012; Melnikov *et al.* 2016]. Esta afirmación puede apreciarse en los valores de toxicidad obtenidos *in silico* para los filtros **BP-3** y **AVO** (0,25 mg/kg - 8 mg/kg) que son de magnitud similar a aquellos de los compuestos fenólicos monoaromáticos aislados de *Lobariella sipmanii*, particularmente el compuesto **3** (2,26 mg/kg - 23 mg/kg).

Los valores más altos de toxicidad, inferiores a 0,1 mg/kg, se encontraron en los filtros solares **BMT** y **OMC - EHMC**. En el caso del **BMT** el valor es elevado debido a su tamaño molecular y elevado valor de $\log P$, mientras que en el **OMC - EHMC**, la explicación del valor obtenido radica tanto en su valor de $\log P$, como en la presencia de grupos funcionales reactivos. Compuestos como la **AVO** y el **OMC - EHMC**, presentan respectivamente potentes grupos electrofílicos como los sistemas α, β -insaturado aceptor tipo Michael y el grupo 1,3-dicetona (β -dicetona), que los hacen más tóxicos para los organismos acuáticos comparados con compuestos de $\log P$ similar [Voutchkova-Kostal *et al.* 2012]. Mientras que en filtros solares como el **BMT** y la **BP-3** la presencia de grupos hidroxilos fenólicos o de sistemas α, β -insaturados pueden explicar la toxicidad específica reportada de estos compuestos para diversos organismos acuáticos [Ozáez *et al.* 2014; Wang *et al.* 2016; Juliano *et al.* 2017; Carve *et al.* 2021].

Por el contrario, los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii*, en particular los monoaromáticos, 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo - **2** y orselinato de metilo - **3**, presentaron valores de toxicidad aguda superiores a 1 mg/L (Tabla 7-12), los cuales son indicadores de baja toxicidad según los criterios del Parlamento Europeo [2001] y que junto a su actividad fotoprotectora (UV-B) los hace promisorios en su empleo como filtros solares orgánicos alternativos.

8 Conclusiones

- A partir de las reacciones de coloración descriptivas específicas para **HL**, los resultados de los ensayos bioautográfico y la determinación cuantitativa de la actividad antioxidante y fotoprotectora de los extractos de **HL**, se seleccionó a la especie *Lobariella sipmanii* (Moncada, Betancourt & Lücking) como objeto de estudio del presente trabajo.
- El estudio químico del extracto permitió obtener y caracterizar por primera vez para esta especie de **HL** los siguientes 3 compuestos. Pseudociferelina A (**1**), 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) y orselinato de metilo (**3**).
- La pseudociferelina A (**1**) y el 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) fueron compuestos que presentaron actividad captadora de radicales libres, poder reductor férrico e inhibición de la peroxidación lipídica. De igual manera estas dos sustancias resultaron ser las más reactivas ante radicales con constantes de velocidad de segundo orden (K_2) entre 10 y 40 veces menores a la obtenida por el **BHT**. Dicha actividad se puede atribuir a la presencia de un motivo β -orcinol en la estructura, así como al mayor grado de sustitución del anillo aromático con grupos metilo electrodonores por efecto inductivo. Por su parte, el compuesto **1** ve aumentada su actividad antioxidante gracias a la presencia de un mayor número de grupos hidroxilo fenólicos.
- El orselinato de metilo (**3**) presentó baja actividad captadora y poca reactividad ante radicales libres, bajo poder reductor férrico y baja inhibición de la peroxidación lipídica, debido a su patrón de sustitución de tipo orcinol, que en estudios previos fue indicativo de baja actividad antioxidante. Por tal razón, el compuesto **3** a pesar de su buen desempeño como filtro solar UV-B no ofrece la actividad antioxidante como ventaja adicional respecto a los filtros solares comercialmente disponibles.
- La pseudociferelina A (**1**) presenta absorción en el UV-A y valores moderados de amplitud espectral, debido a su mayor grado de conjugación con respecto de los compuestos monoaromáticos obtenidos de *Lobariella sipmanii*. Por otra parte, el 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) y el orselinato de metilo (**3**) presentaron valores aceptables de fotoprotección en el UV-B y en el infrarrojo cercano (**NIR**). Al comparar su estructura se observó que el patrón de sustitución afecta la capacidad de absorber la radiación electromagnética, los compuestos con mayor número de sustituyentes en el anillo aromático (**1** y **2**) presentaron efecto hipocrómico en el UV-B y el **NIR** con respecto al orselinato de metilo (**3**) que tiene menor cantidad de sustituyentes. Estos hallazgos permiten corroborar algunos resultados de estudios previos realizados en el grupo de investigación y postular a los compuestos **1** y **2** como posibles fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora.

8. Conclusiones

- Los compuestos monoaromáticos **2** y **3** se pueden considerar como permeables a través de la piel y solubles en la fracción lipídica del estrato córneo debido a sus valores calculados de $\text{Log } P$ entre 1 y 3, bajo peso molecular, $\text{pF} < 200$ °C, valores negativos de energía libre de transferencia ($\Delta_t \bar{G}_{O \rightarrow W}^\theta$) y número de grupos aceptores de puentes de hidrógeno menor a 4. Por otro lado, la pseudociferelina A (**1**) aunque tiene el valor más negativo de $\Delta_t \bar{G}_{O \rightarrow W}^\theta$, solo cumple con algunas de las características necesarias para la permeabilidad cutánea, presenta un número de aceptores de puentes de hidrógeno mayor a 4 y un valor de $\text{Log } P$ elevado, similar al de los filtros solares comerciales, lo que podría sugerir una fácil disolución en la fracción lipídica del estrato córneo, pero la posible retención del compuesto en las capas más superficiales de la piel.
- Los compuestos **1** y **2** aislados de *Lobariella sipmanii* producto de su actividad antioxidante podrían ser menos susceptibles de generar alergias en la piel o reacciones de fotosensibilización, aunque esto debe ser confirmado por estudios *in chemico*. Además, los compuestos **2** y **3** presentaron menor toxicidad hacia organismos acuáticos y menor potencial de bioacumulación *in silico* comparados con los filtros solares comerciales usados como control.
- Debido a que dos de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* (Moncada, Betancourt & Lüking) presentaron actividad dual antioxidante y fotoprotectora, valores negativos de energía libre de Gibbs de transferencia y valores de coeficiente de reparto que sugieren una buena permeabilidad dérmica, así como menor potencial de bioacumulación y menor toxicidad para los organismos acuáticos con respecto a los filtros solares comercialmente disponibles, resulta posible proponer a esta especie de **HL** del páramo de Sumapaz como una potencial fuente de compuestos naturales con actividad dual, antioxidante y fotoprotectora. Lo cual constituye un avance no solo en el conocimiento de la química de los líquenes colombianos, sino también en la bioprospección de la biodiversidad del país.

9 Recomendaciones y Perspectivas

- Se sugiere hacer la determinación de los espectros de infrarrojo cercano (**NIR**) de otras sustancias líquénicas con potencial fotoprotector y de otros filtros solares comerciales, con el fin de enriquecer la escasa e incipiente información de fotoprotección disponible en esta región del espectro electromagnético, más aún cuando se exige a los productos cosméticos que protegen de la radiación solar, la declaración de protección en el **IR**.
- Continuar con ensayos de citotoxicidad de los 3 compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* para evaluar la seguridad de su uso en formulaciones cosméticas.
- De igual manera, resulta conveniente determinar el factor de bioacumulación en peces (**BCF**) y la toxicidad *in silico* e *in vitro* para otros metabolitos secundarios que puedan ser obtenidos de *Lobariella sipmanii* y de otras especies de **HL**, con el fin de evaluar la viabilidad y sostenibilidad ambiental de su uso en productos cosméticos.
- Es recomendable incluir en los ensayos estudios *in chemico* que permitan determinar la alergenicidad de los compuestos aislados de **HL**.
- Se sugiere realizar los estudios de formulación de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* con el fin de desarrollar activos cosméticos fotoprotectores, en estos estudios resulta esencial evaluar la estabilidad de las sustancias aisladas ante la radiación **UV**.
- Continuar el estudio químico de la especie *Lobariella sipmanii* y de otras especies de **HL** para obtener compuestos con actividades biológicas deseables.

A Glosario

- **Activo cosmético:** Sustancia química presente en un producto cosmético, a parte del vehículo, que le confiere una funcionalidad o un efecto biológico específico deseado.
- **Apotecio:** Estructura reproductiva sexual presente en los **HL**, generalmente tienen forma circular similar a una taza y los ascos están expuestos directamente al exterior [*Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002*].
- **Corticícola:** Hace referencia a los líquenes que crecen sobre las cortezas y tallos de una planta, a ésta se le denomina **forófito** [*Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002*].
- **Disipación radiativa:** Procesos llevados a cabo por moléculas en estados energéticos excitados donde se emiten radiaciones electromagnéticas de mayor longitud de onda respecto a aquella que causó la excitación del compuesto, puede llevarse a cabo por procesos de fluorescencia o de fosforescencia [*Nguyen et al.. 2013*].
- **Disipación no radiativa:** Son procesos donde la energía de los estados excitados es disipada a través de la relajación vibracional o de la transferencia a otras moléculas (fotosensibilización), ello sin la emisión de radiación electromagnética [*Nguyen et al.. 2013*].
- **Edáfico:** Que hace referencia a los suelos.
- **Efecto batocrómico:** Es el desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) de una sustancia hacia longitudes de onda más largas y de menor energía, producto de cambios en sus sustituyentes.
- **Efecto hipsocrómico:** Es el desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) de una sustancia hacia longitudes de onda más cortas y de mayor energía, producto de cambios en sus sustituyentes.
- **Epífito:** Ver **Corticícola/Folícola**.
- **Epilito:** Ver **Saxícola**.
- **Fármaco:** Cualquier sustancia que no sea alimento, y que se use para prevenir, diagnosticar, tratar o aliviar los síntomas de una enfermedad o afección [*National Cancer Institute. 2024*].

- **Fluorescencia:** Es el fenómeno de emisión de radiación que se presenta luego de alguna sustancia ha absorbido radiación, en este caso se emite radiación de mayor longitud de onda cuando se regresa al estado basal y no hay cambio en los espines de los electrones de los átomos. Es decir que tanto el estado basal, como el estado excitado son singletes (espines apareados). [Bernath. 2005; Bonda. 2005]
- **Folícola:** Hongo liquenizado que crece únicamente sobre hojas de plantas superiores.
- **Forófito:** Se denomina a aquellas plantas superiores sobre las cuales crecen los hongos liquenizados de hábito corticícola (corteza) o folícola. (hojas) [Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002].
- **Fosforescencia:** Al igual que la fluorescencia es un tipo de emisión de radiación, en este caso los electrones excitados cambian su espín antes de emitir la radiación de mayor longitud de onda. Es decir el estado excitado es un triplete (espines desapareados) mientras el estado basal es un singlete [Bernath. 2005; Bonda. 2005].
- **Fotoenvejecimiento:** Hace referencia a los cambios que presenta la piel y que se sobreponen y acentúan el envejecimiento natural [Schroeder et al.. 2008a].
- **Fotoestable:** Se trata de una sustancia química que al verse expuesta y absorber radiación solar, disipa la energía regresando al mismo estado previo a la exposición, sin presentar cambio alguno en su composición [Bonda. 2005].
- **Fotoinestable:** Se trata de una sustancia química que al verse expuesta y absorber radiación solar, disipa la energía de forma destructiva, lo que implica cambios en su estructura y composición química; como, por ejemplo, productos de fragmentación, isomerización, entre otros [Bonda. 2005].
- **Fotolábil:** Sinónimo de fotoinestable o fotodegradable.
- **Fotosensibilización:** Es cuando el estado excitado de una molécula irradiada es más reactivo que la molécula en su estado basal y por tanto esta reacciona químicamente con componentes celulares.
- **Hapteno:** Sustancia química de bajo peso molecular que se une a una macromolécula (proteína) generando un aducto, el cual induce la respuesta inmune adaptativa [Abbas et al.. 2017, pp 110].
- **Neotrópico:** Región biogeográfica del planeta que comprende América Central y la parte septentrional de América del Sur, se le denomina de este modo por sus diferencias bióticas con el paleotrópico, que son las zonas trópicas de Africa (Región Etiópica) y Asia (Región Oriental).
- **Neotrópical:** Distribución geográfica de los organismos, que indica la pertenencia al neotrópico.
- **Orobioma:** Es un bioma definido por el relieve y la altitud.
- **Regulación retrógrada:** Regulación de la expresión genética que es mediada desde la mitocondria o cualquier organelo hacia al núcleo. [Krutmann & Schroeder. 2009]
- **Quimiotipo:** Se trata de organismos de la misma especie colectados en diferentes sitios, con idéntica morfología que poseen características de reactividad o composición química diferentes [Masuch. 1993].
- **Saxícola:** Son aquellos hongos liquenizados que crecen sobre suelo o rocas [Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002].

A. Glosario

- **Soredio:** Diáspora vegetativa minúscula formada por grupos de algas rodeados por hifas [*Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002*].
- **Simbiosis:** Asociación de dos o más organismos para beneficio mutuo [*Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002*].
- **Talo costroso:** Forma de crecimiento de los **HL** que crece adherido y en íntima relación con su sustrato [*Masuch. 1993, pp 37*] [*Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002, pp 26*].
- **Talo folioso:** Forma de crecimiento de los **HL** donde los talos son aplanados, similares a las hojas de las plantas [*Masuch. 1993, pp 40*] [*Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002, pp 29*].
- **Talo fruticoso:** Forma de crecimiento de los **HL** que es similar a pequeños arbolitos o ramas [*Masuch. 1993, pp 43*] [*Chaparro de Valencia & Aguirre. 2002, pp 31*] [*Notov. 2014*].
- **Talo heterómero:** Son talos que presentan una morfología dorsi-ventral, donde es claro diferenciar la cara adaxial (superior) de la cara abaxial (inferior o próxima al sustrato) [*Masuch. 1993, pp 39*].
- **Talo homómero:** Son talos que son idénticos por las dos caras [*Masuch. 1993, pp 39*].

B Espectros obtenidos

B.1 Pseudociferelina A

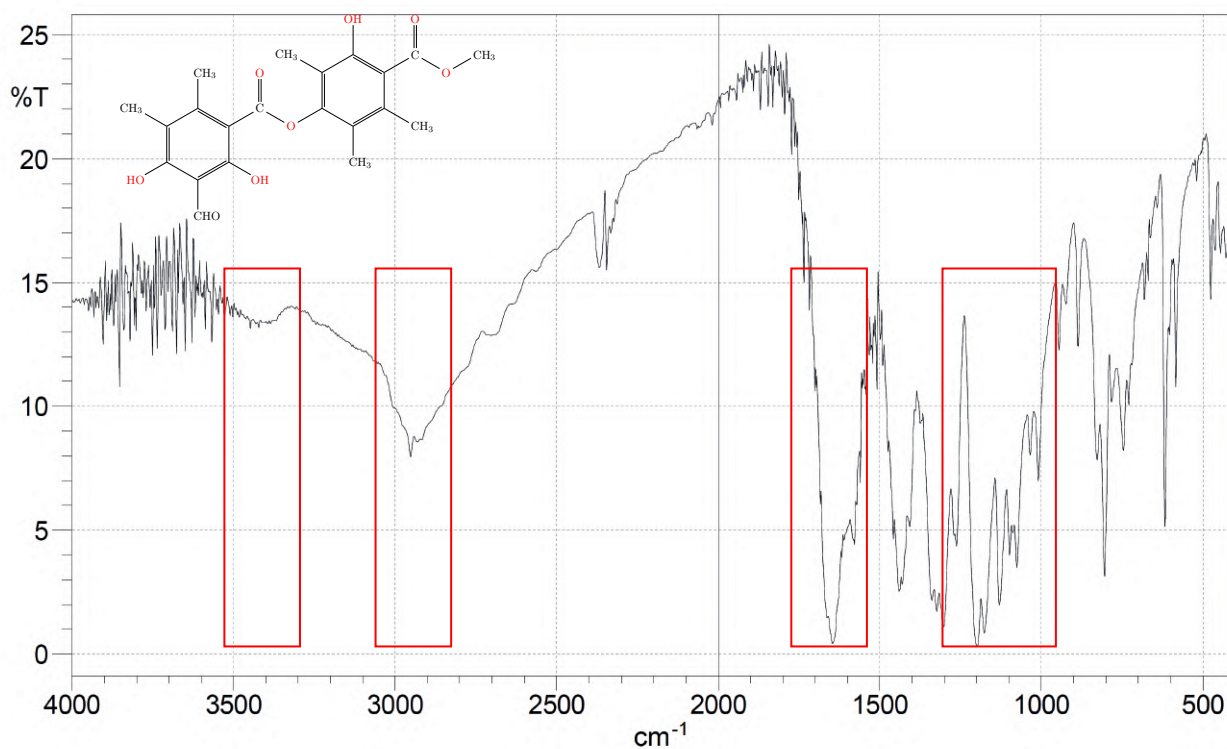


Figura B-1: Espectro Infrarrojo de la pseudociferelina A (1) de *Lobariella sipmanii*. Los recuadros en rojo indican las señales diagnósticas del espectro.

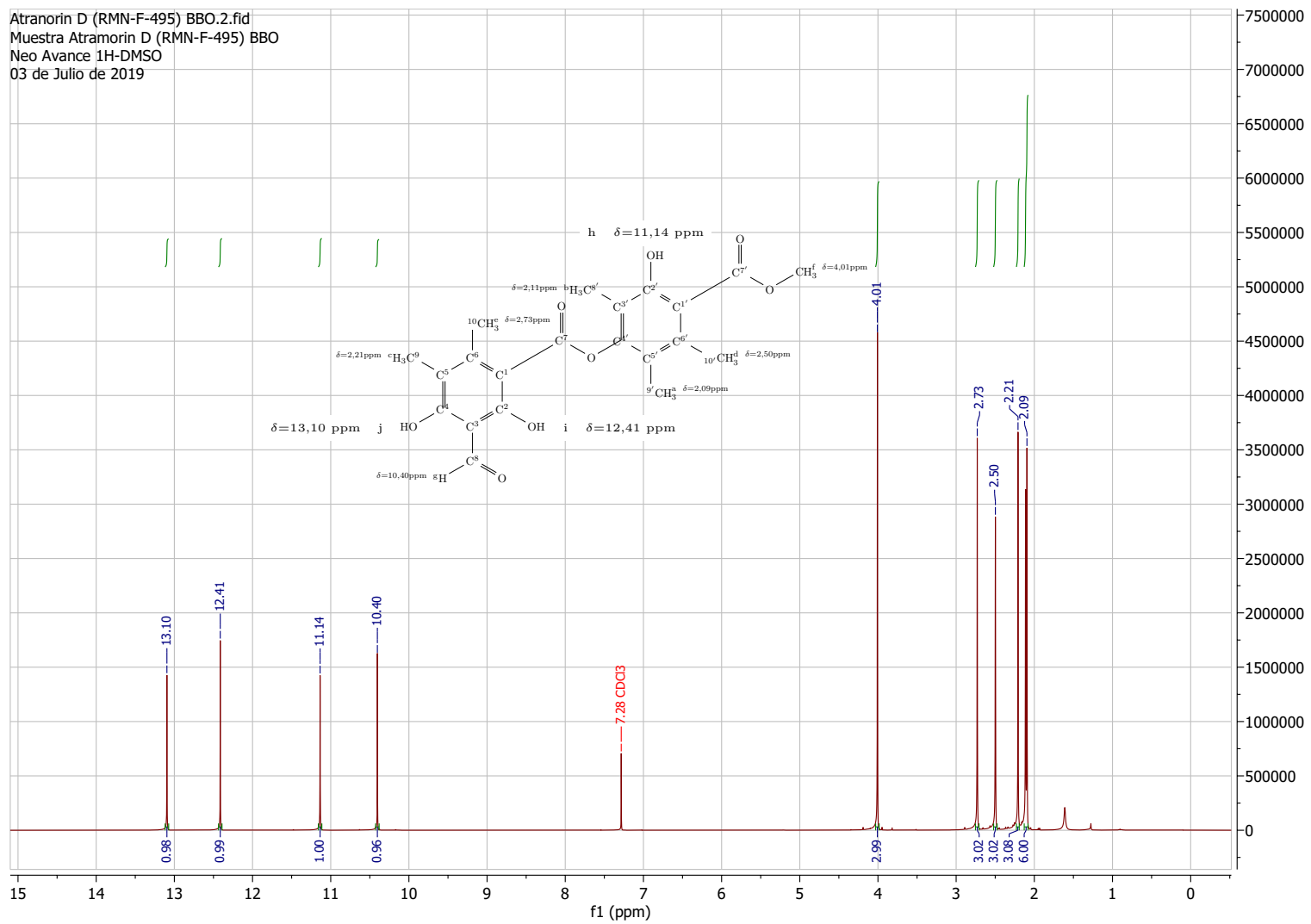


Figura B-2: Espectro protónico (RMN ^1H) de la pseudociferelina A (1) en CDCl_3 obtenida de *Lobariella sipmanii*.

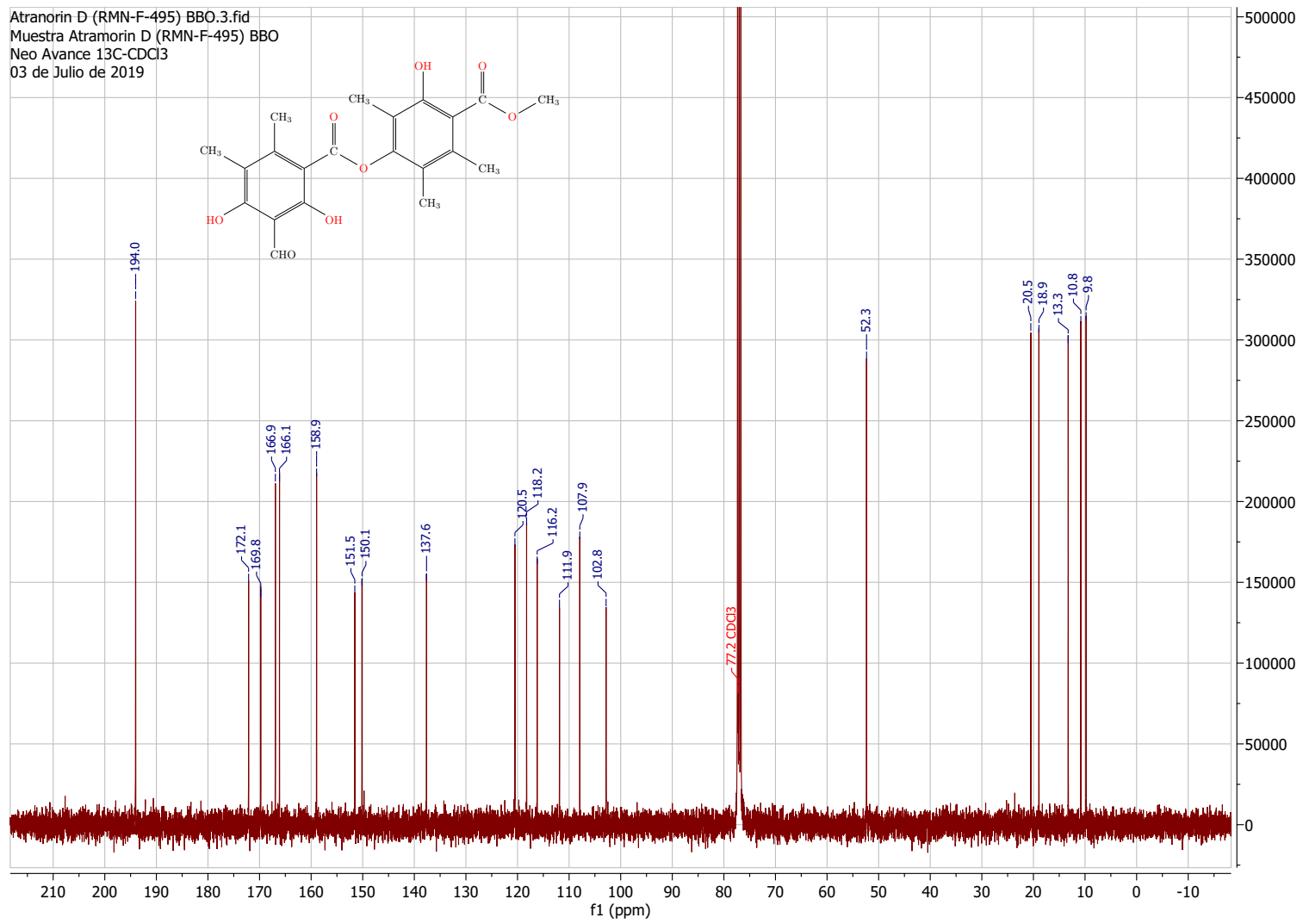


Figura B-3: Espectro de carbono 13 (RMN ^{13}C) de la pseudociferelina A (1) en CDCl_3 obtenida de *Lobariella sipmanii*.

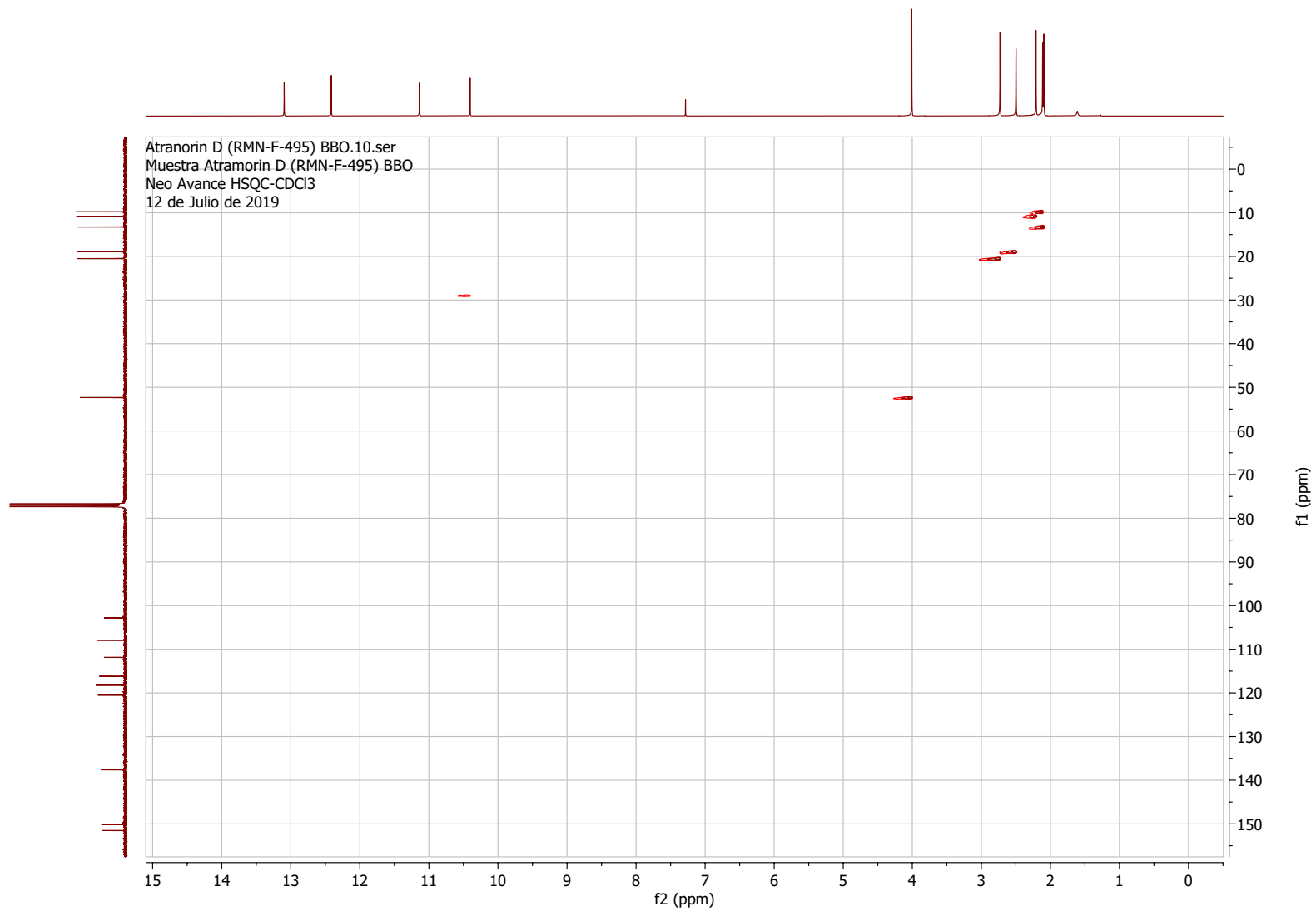


Figura B-4: Espectro de correlación hidrógeno-carbono **HSQC** de la pseudociferelina A (**1**) obtenida de *Lobariella sipmanii*.

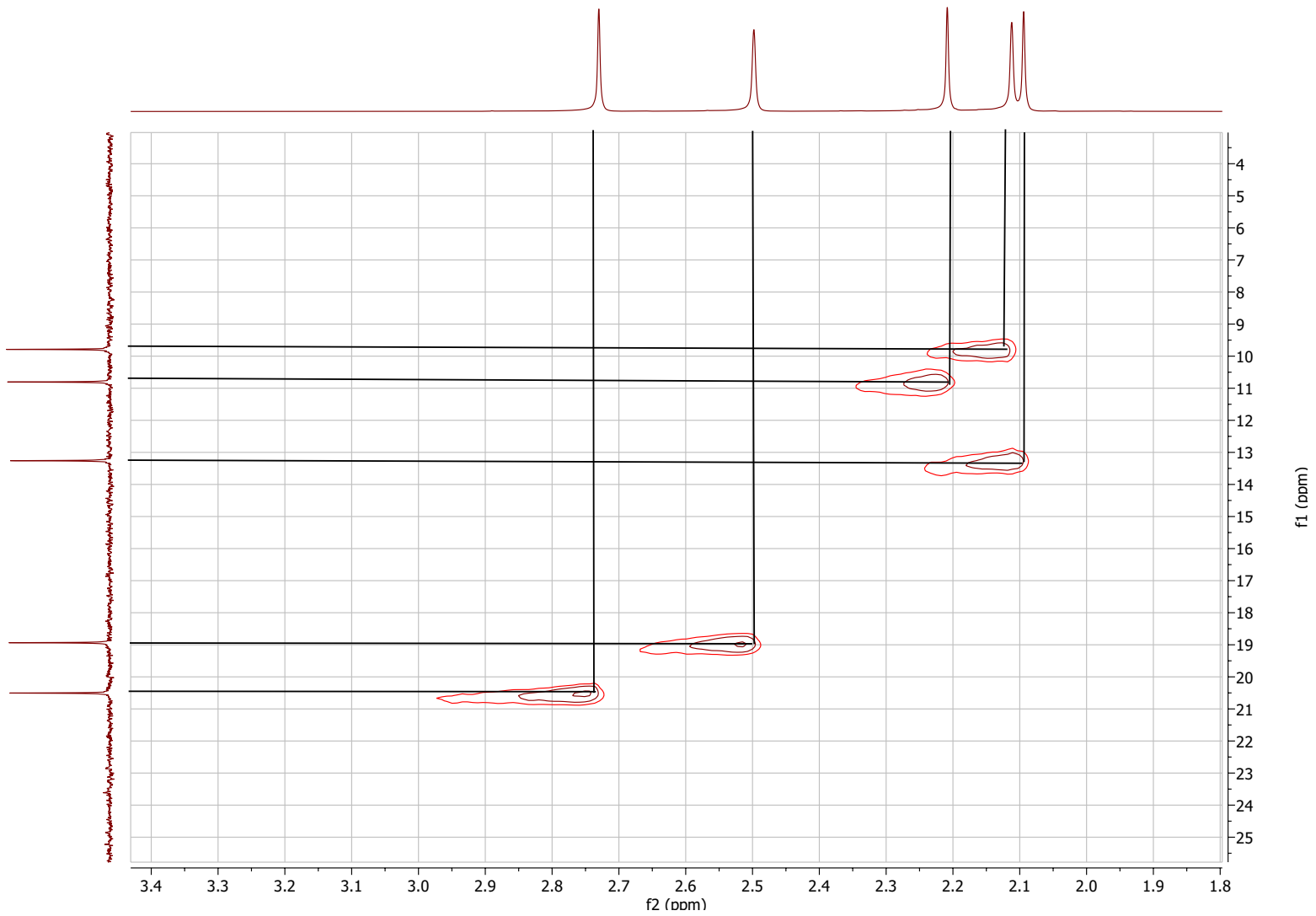


Figura B-5: Ampliación del Espectro de correlación H \rightarrow C HSQC δ_{H} 1,80 a 3,40 de la Pseudociferelina A (1).

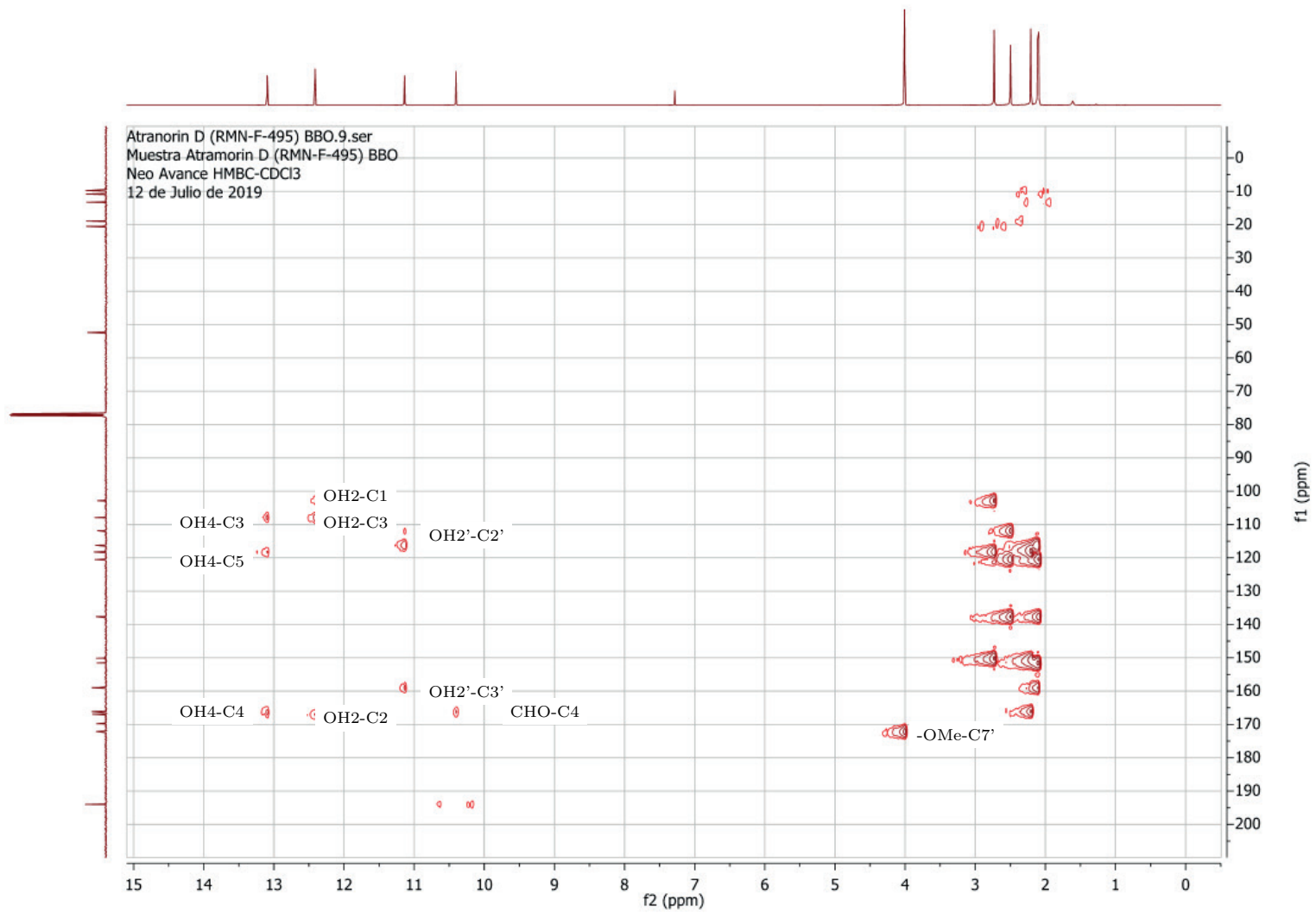


Figura B-6: Espectro de correlación hidrógeno-carbono HMBC de la pseudociferelina A (1) obtenida de *Lobariella sipmanii*.

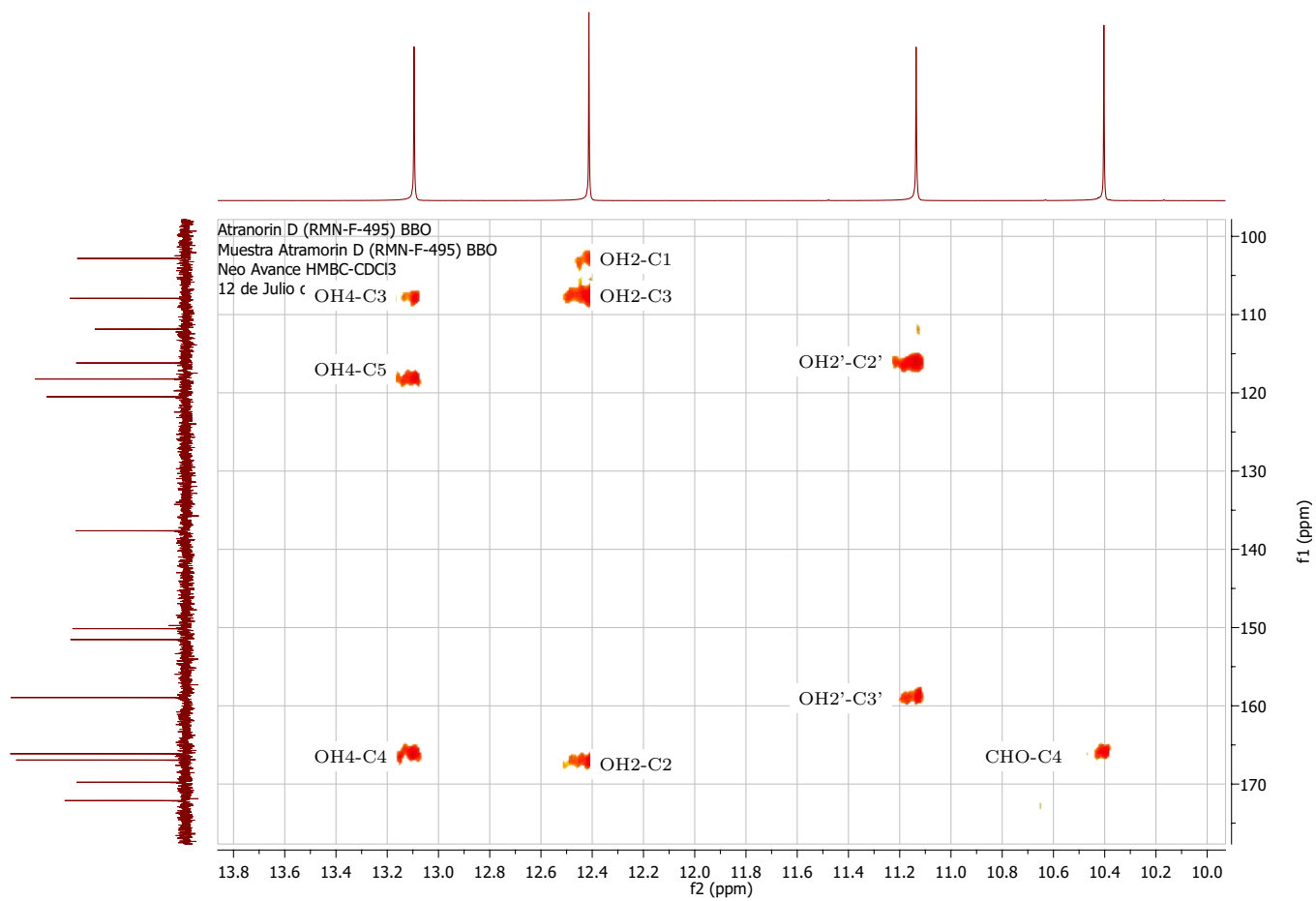


Figura B-7: Ampliación del espectro de correlación hidrógeno-carbono (δ_H 10,00 ppm - 13,80 ppm) HMBC de la pseudociferelina A (1).

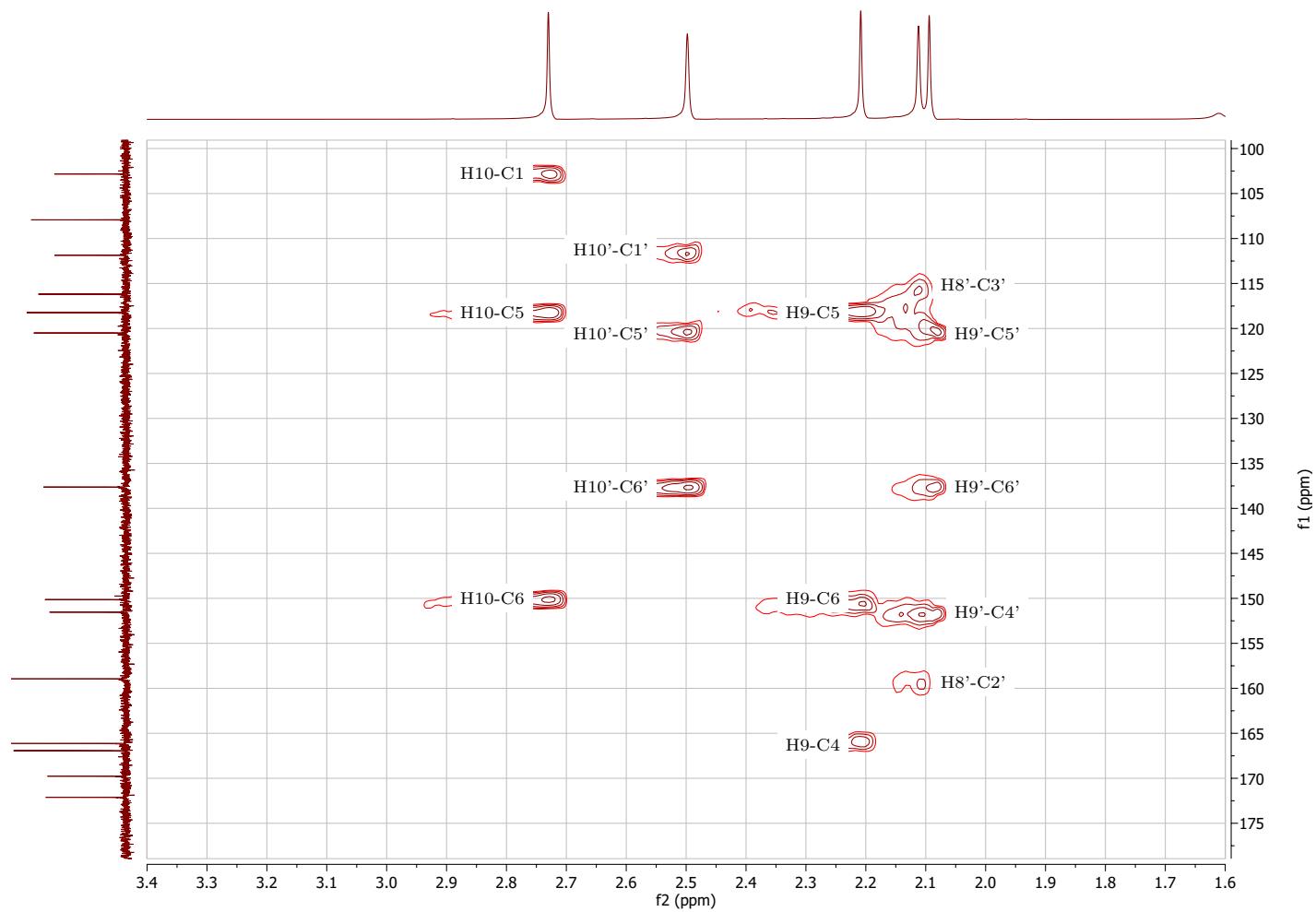


Figura B-8: Ampliación del espectro de correlación hidrógeno-carbono (δ_H 1,50 ppm - 3,40 ppm) HMBC de la pseudociferelina A (1).

B.2 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo

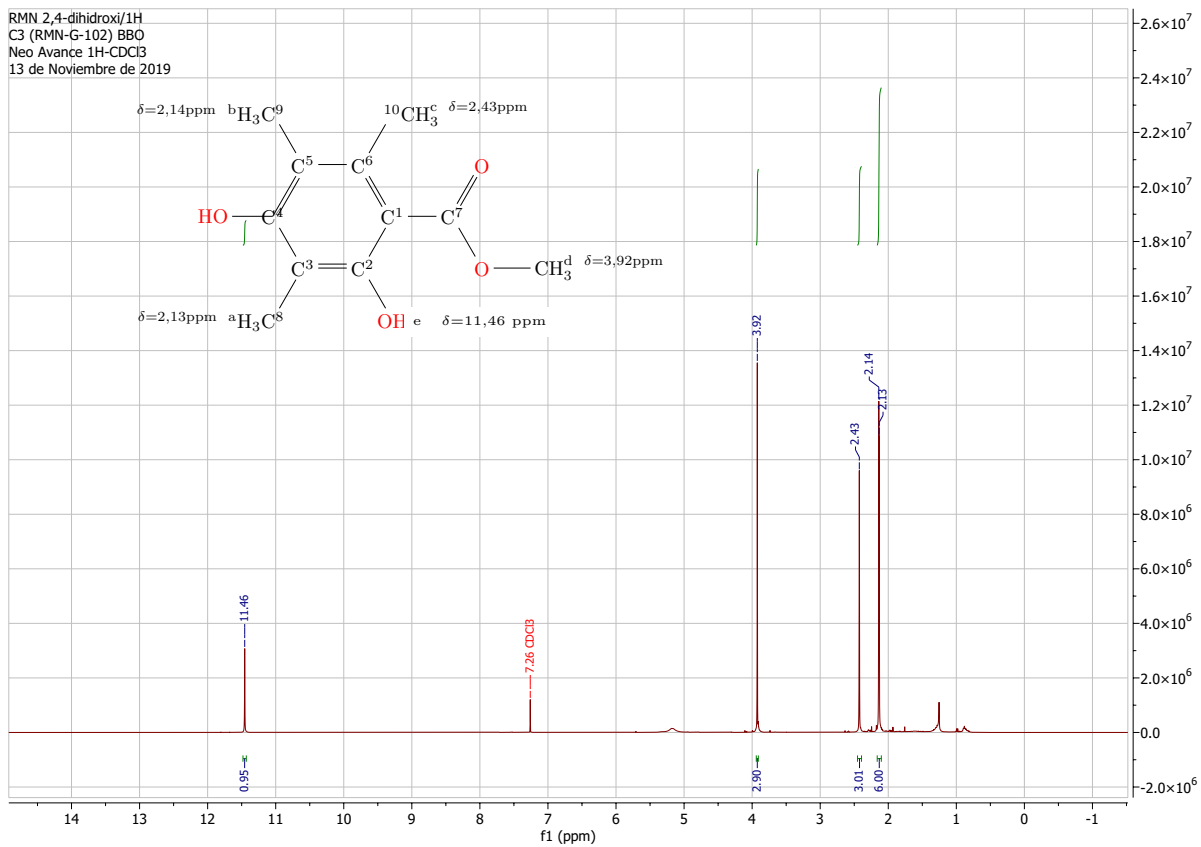


Figura B-9: Espectro protónico (RMN ^1H) de la 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) en CDCl_3 obtenido de *Lobariella sipmanii*.

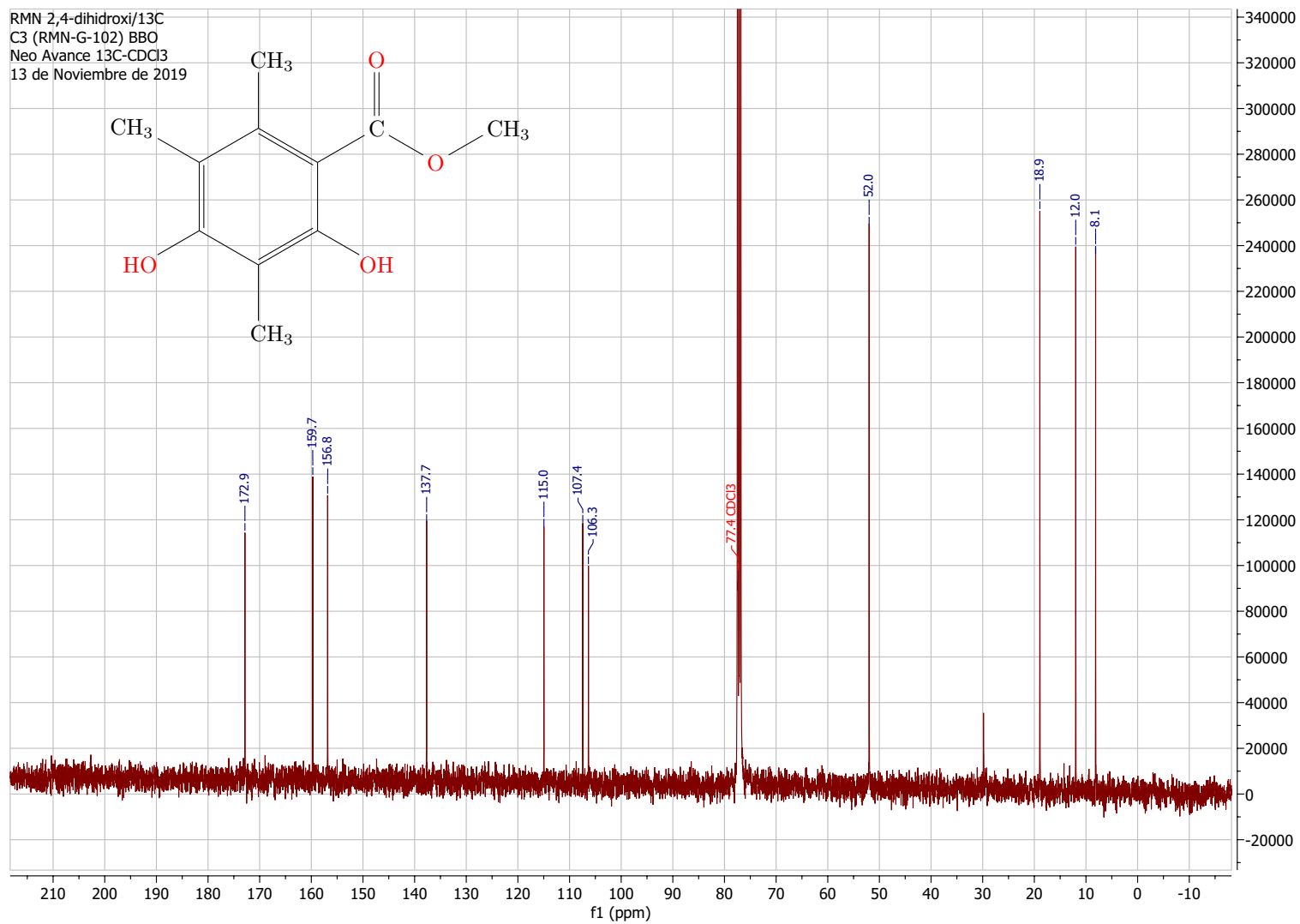


Figura B-10: Espectro de carbono 13 (RMN ^{13}C) del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) en CDCl_3 obtenido de *Lobariella sipmanii*.

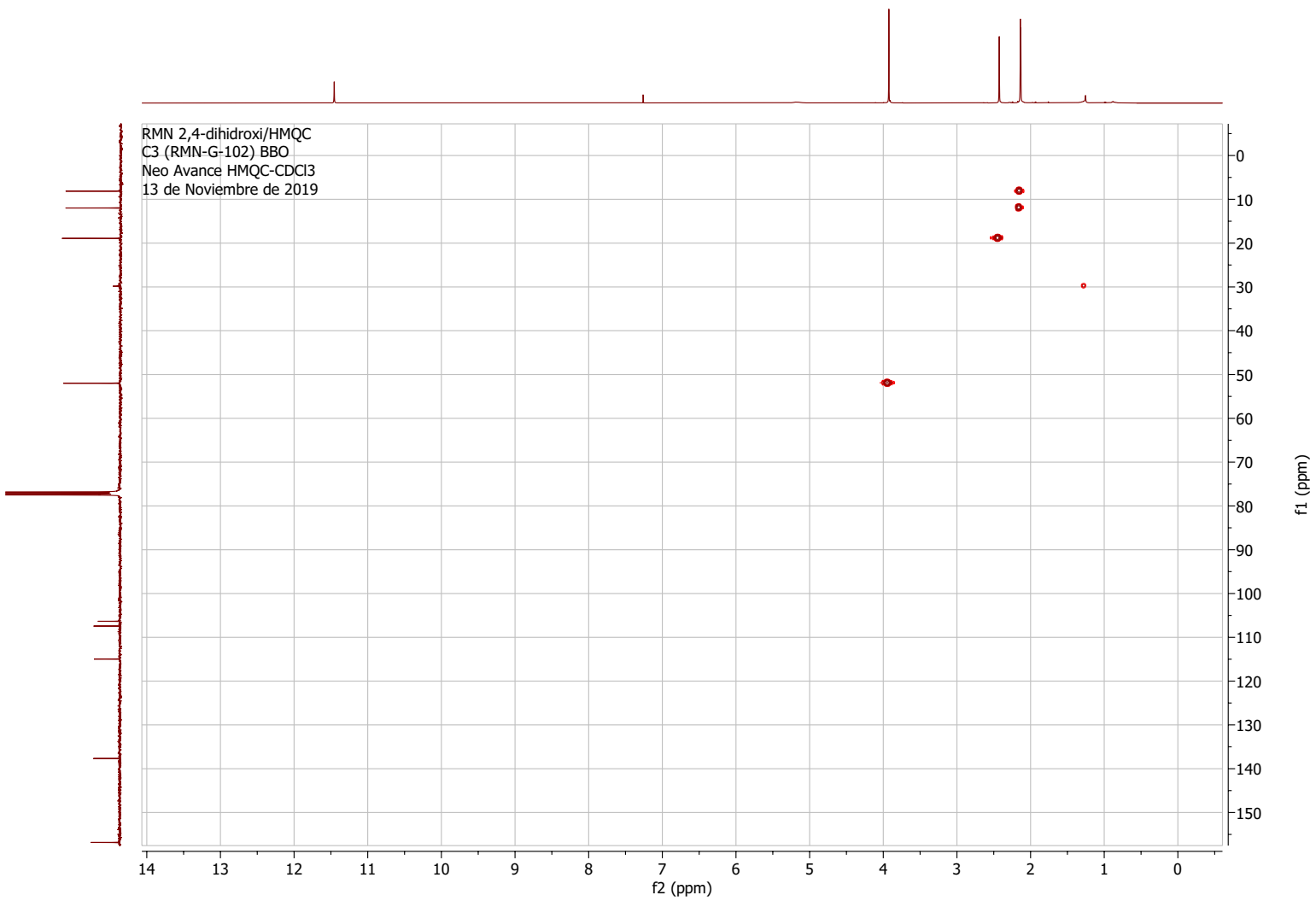


Figura B-11: Espectro de correlación hidrógeno-carbono **HMQC** del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**) obtenido de *Lobariella sipmanii*.

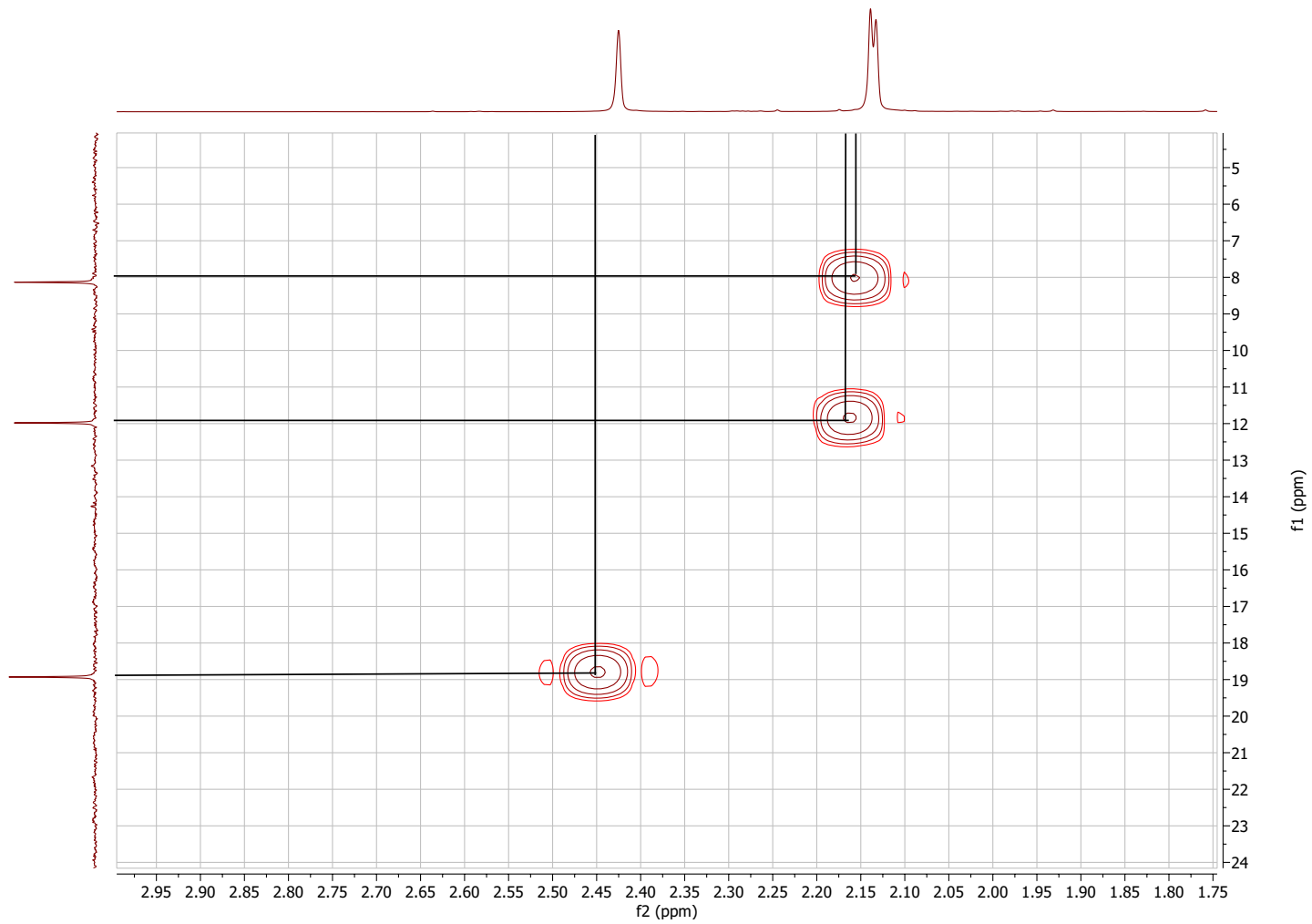


Figura B-12: Ampliación del Espectro de correlación $\text{H} \rightarrow \text{C}$ HMQC del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**). En este espectro se observan los átomos de hidrógeno de los grupos metilo, con sus correspondiente átomos de carbono ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 8,1/2,13; $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 12,0/2,14 y $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$ 18,9/2,43).

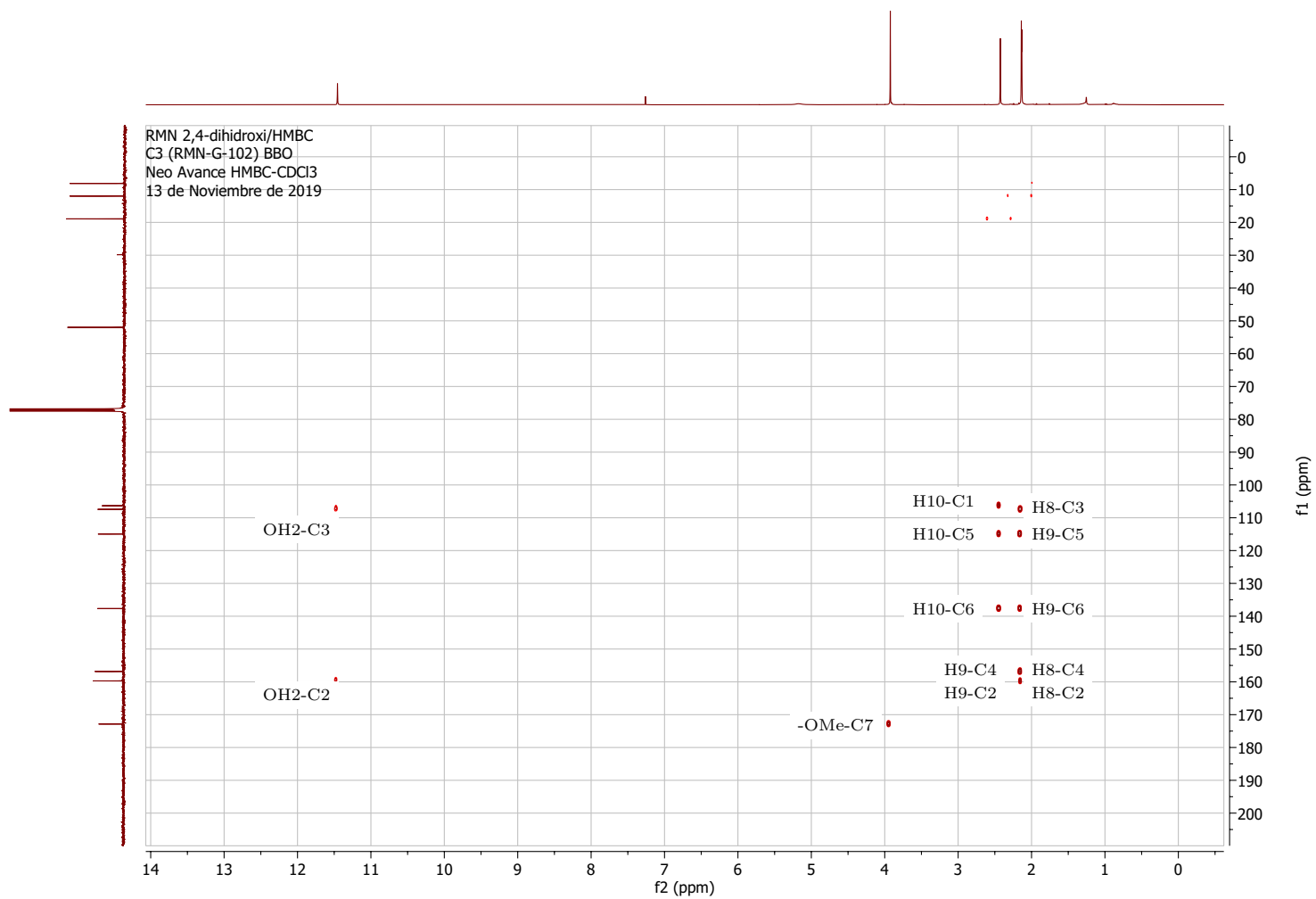


Figura B-13: Espectro de correlación hidrógeno-carbono HMBC del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2) obtenido de *Lobariella sipmanii*.

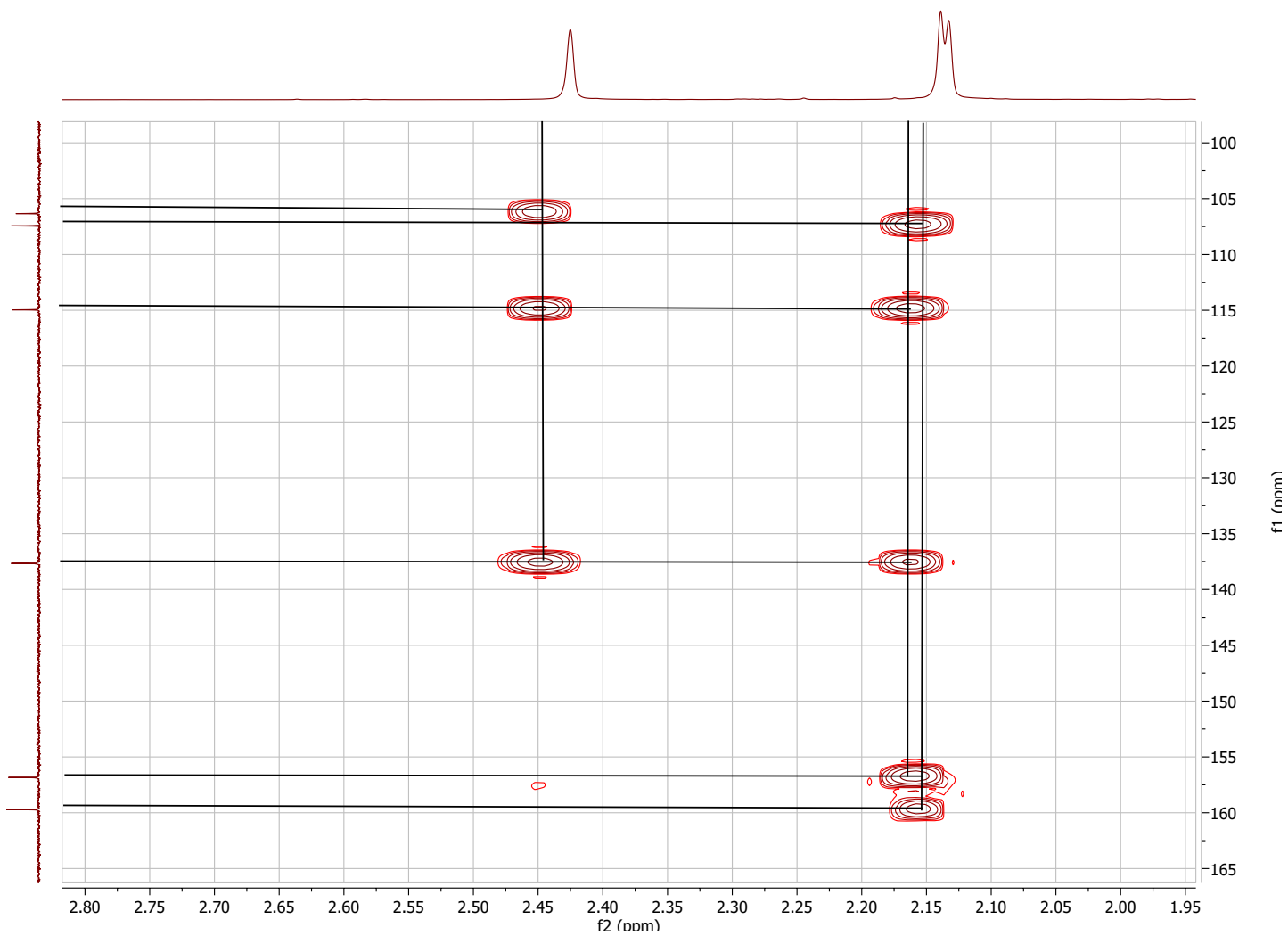


Figura B-14: Ampliación del Espectro de correlación $\text{H} \rightarrow \text{C}$ HMBC (δ_{H} 1,95 ppm - 2,80 ppm) del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (**2**). Correlaciones de los átomos de hidrógeno de los grupos metilo unidos al anillo aromático.

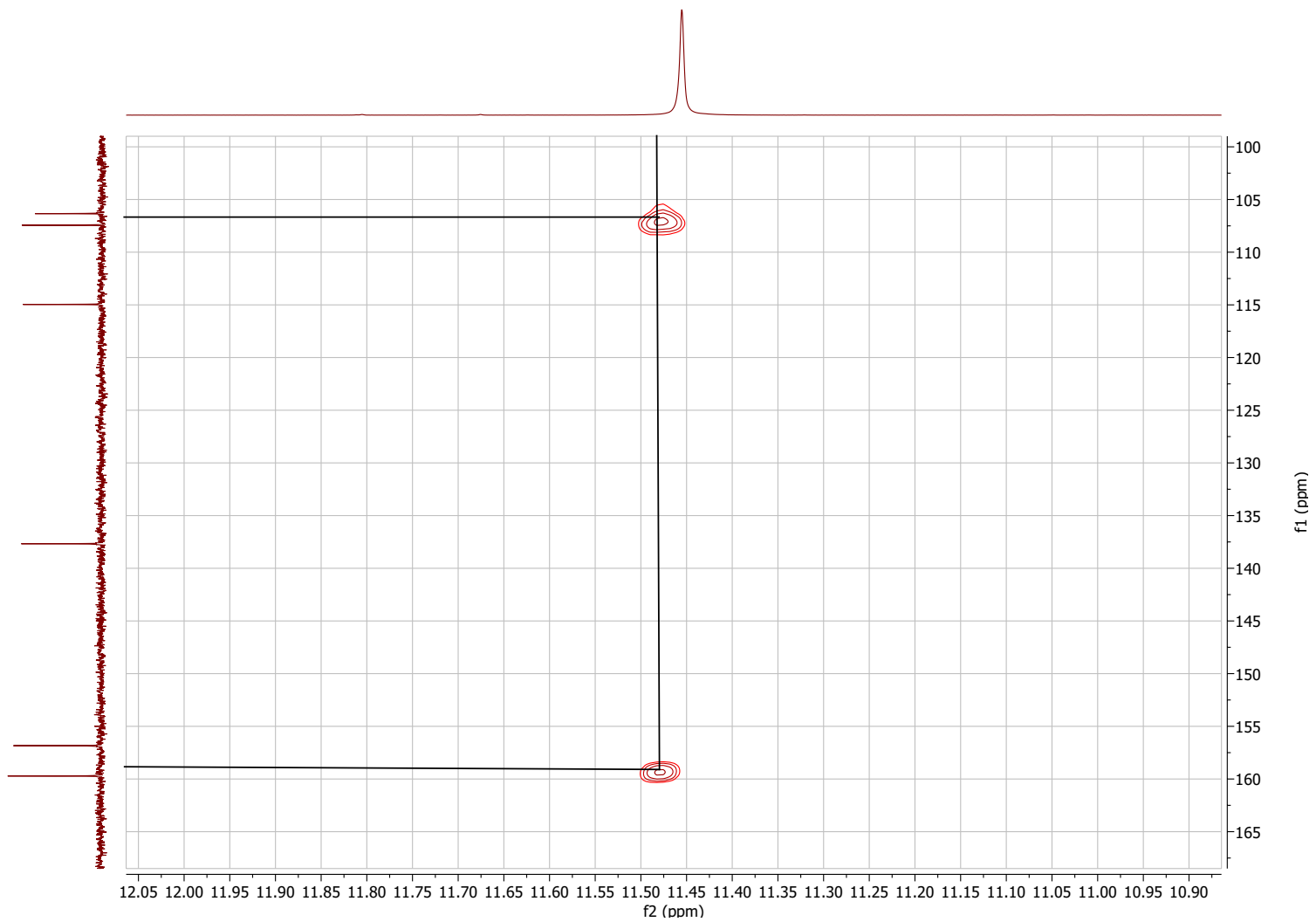


Figura B-15: Ampliación del Espectro de correlación H \rightarrow C **HMBC** ($\delta_H = 11,46$ ppm) del 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2).

B.3 Orselinato de metilo

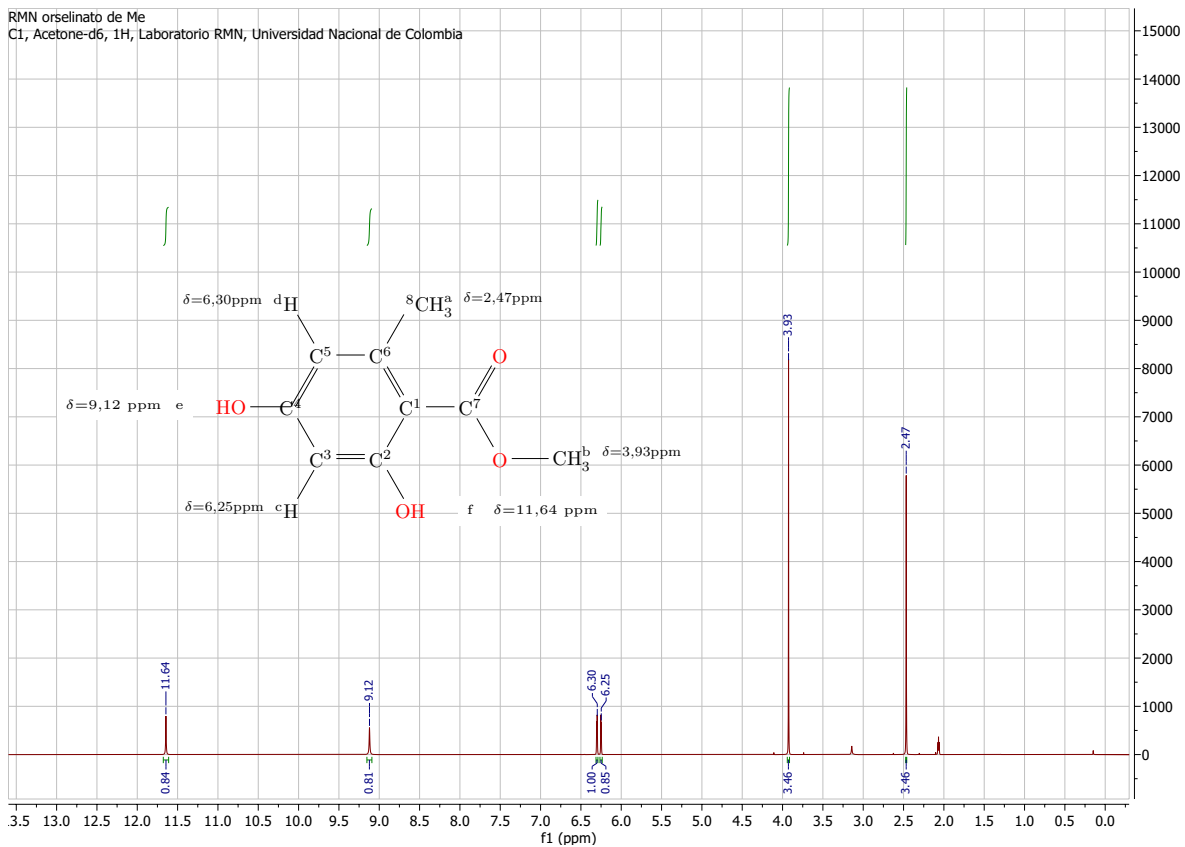


Figura B-16: Espectro protónico (RMN ^1H) del orselinato de metilo (**3**) en Acetona-d6 obtenido de *Lobariella sipmanii*.

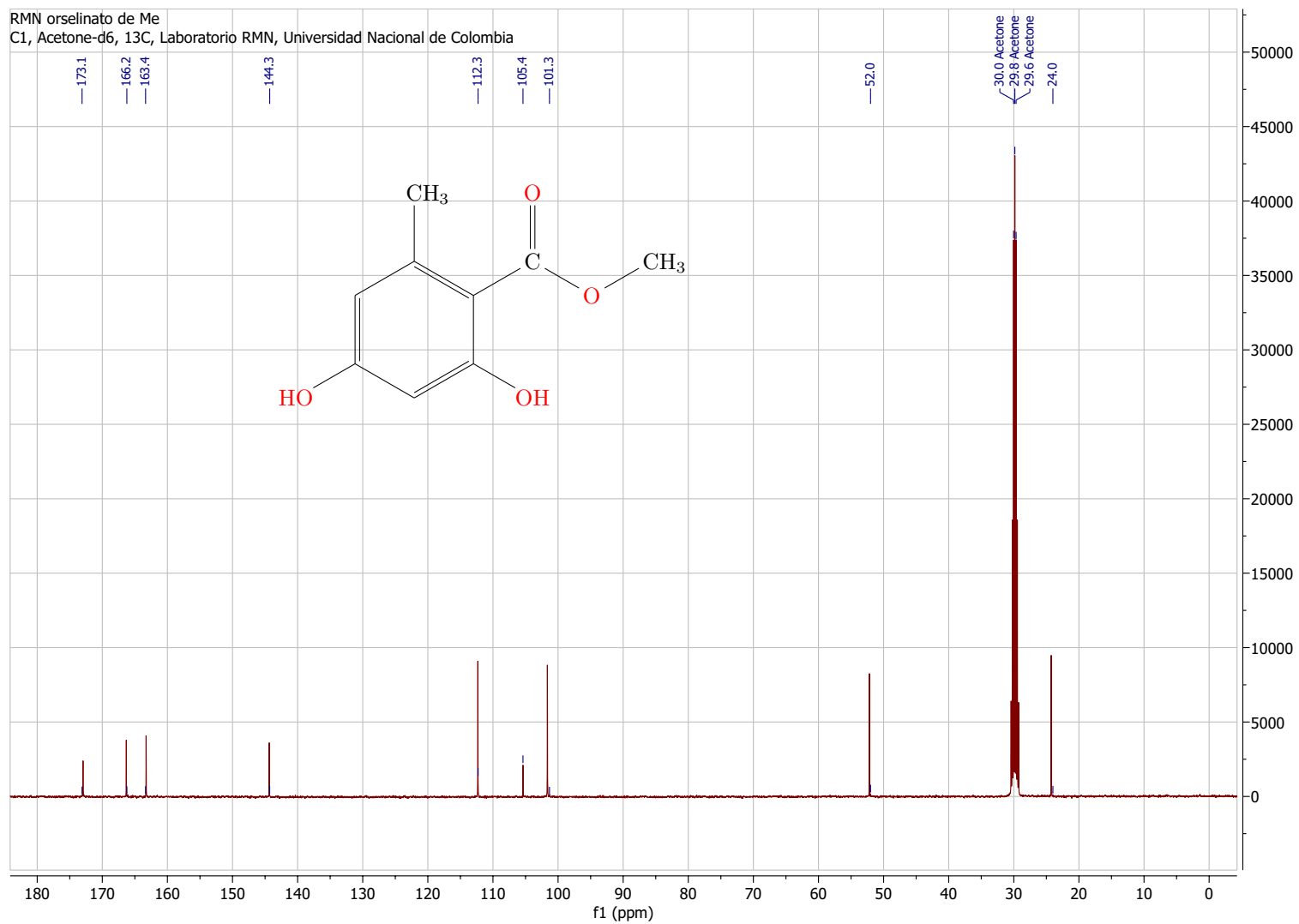


Figura B-17: Espectro de carbono 13 (RMN ^{13}C) del orselinato de metilo (**3**) en Acetona-d6 obtenido de *Lobariella sipmanii*.

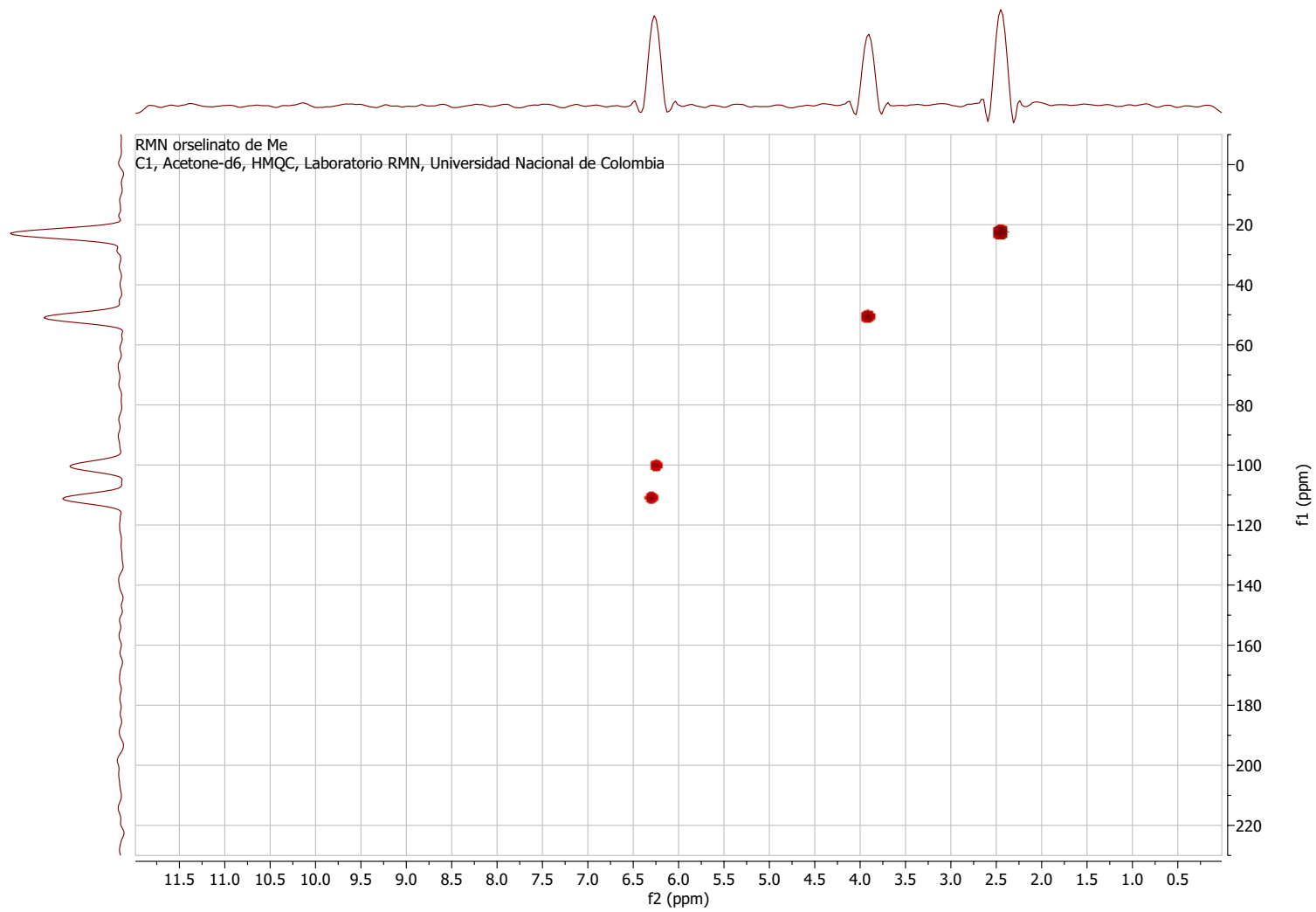


Figura B-18: Espectro de correlación $\text{H} \rightarrow \text{C}$ HMQC del orselinato de metilo (**3**).

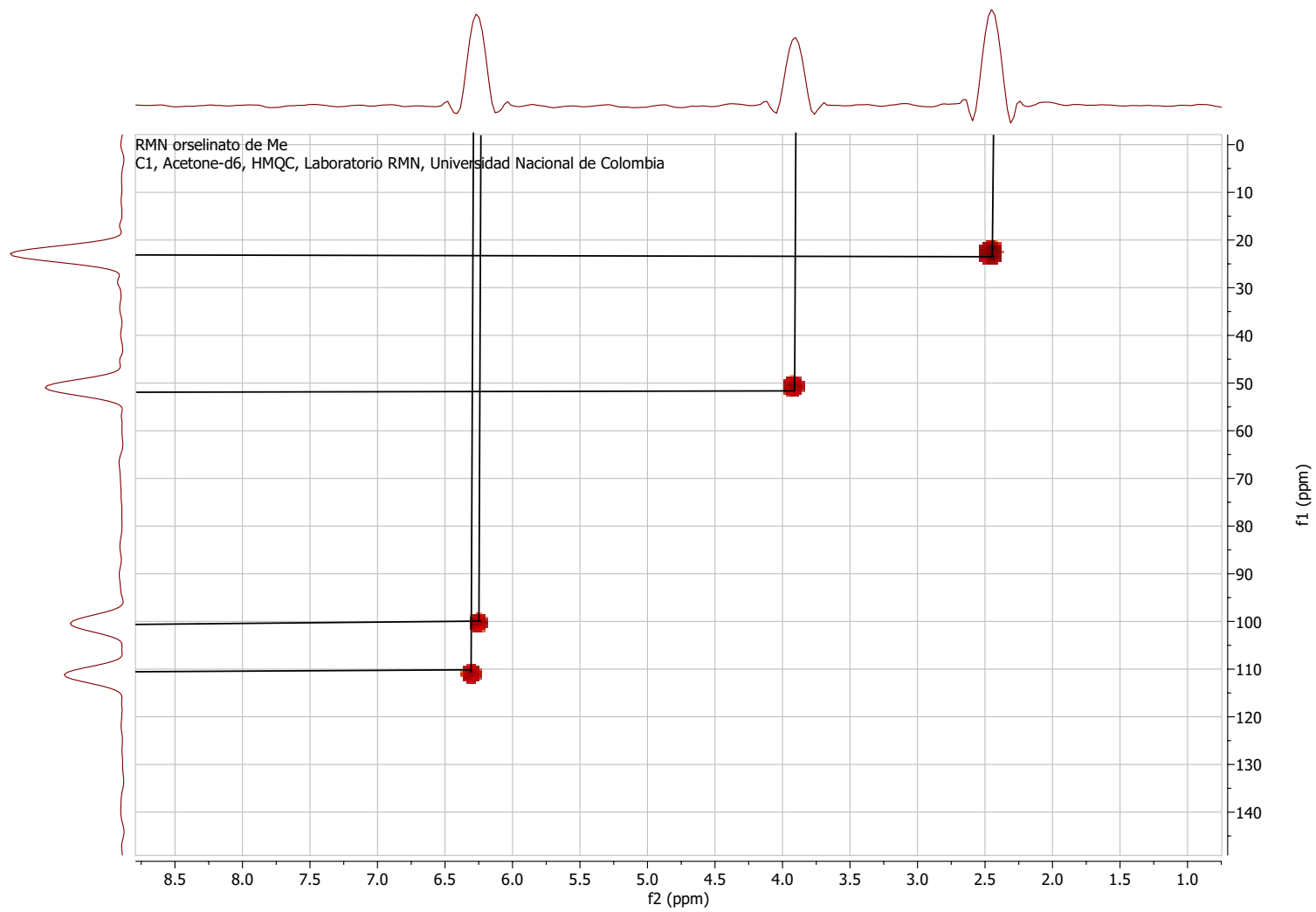


Figura B-19: Ampliación del Espectro de correlación H → C HMQC del orselinato de metilo (**3**). En este espectro se observan los átomos de hidrógeno de los grupos metilo y los protones del anillo aromático con sus correspondientes átomos de carbono (δ_C/δ_H 24,0/2,47; δ_C/δ_H 52,0/3,93; δ_C/δ_H 101,3/6,25 y δ_C/δ_H 112,3/6,30).

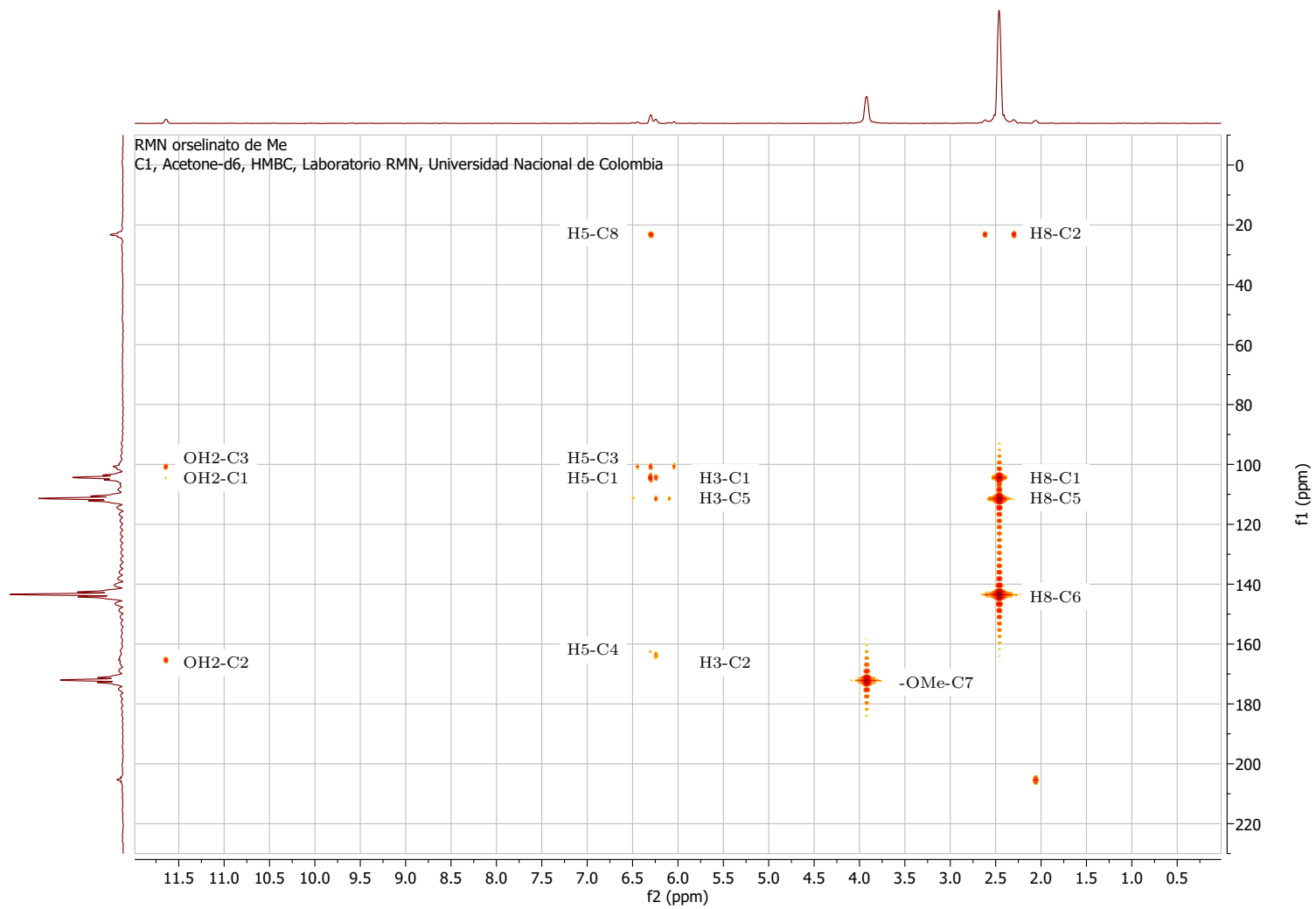


Figura B-20: Espectro de correlación hidrógeno-carbono HMBC del orselinato de metilo (**3**) obtenido de *Lobariella sipmanii*.

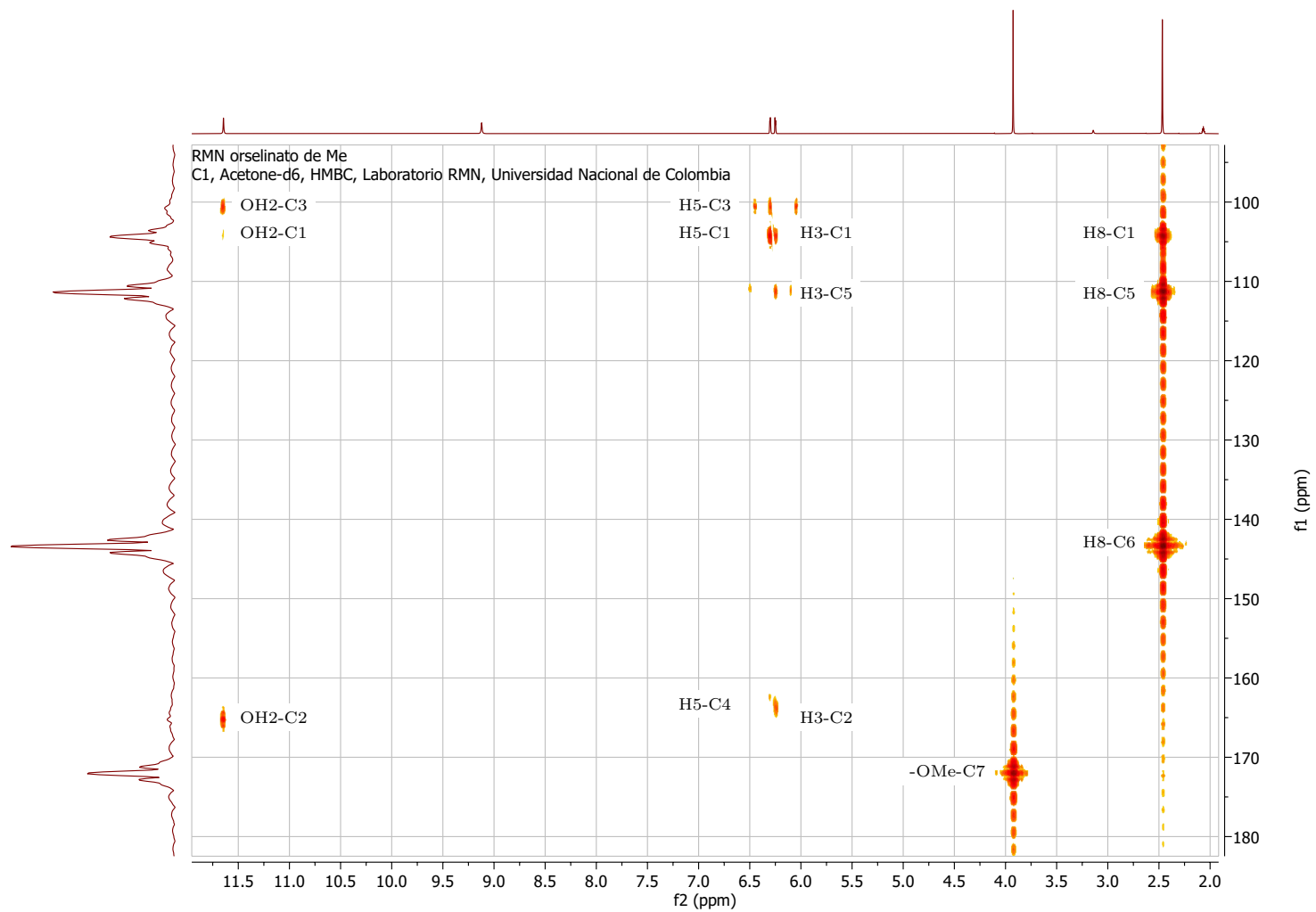


Figura B-21: Espectro de correlación H → C HMBC (δ_H 2,20 ppm - 11,50 ppm) del orselinato de metilo (3).

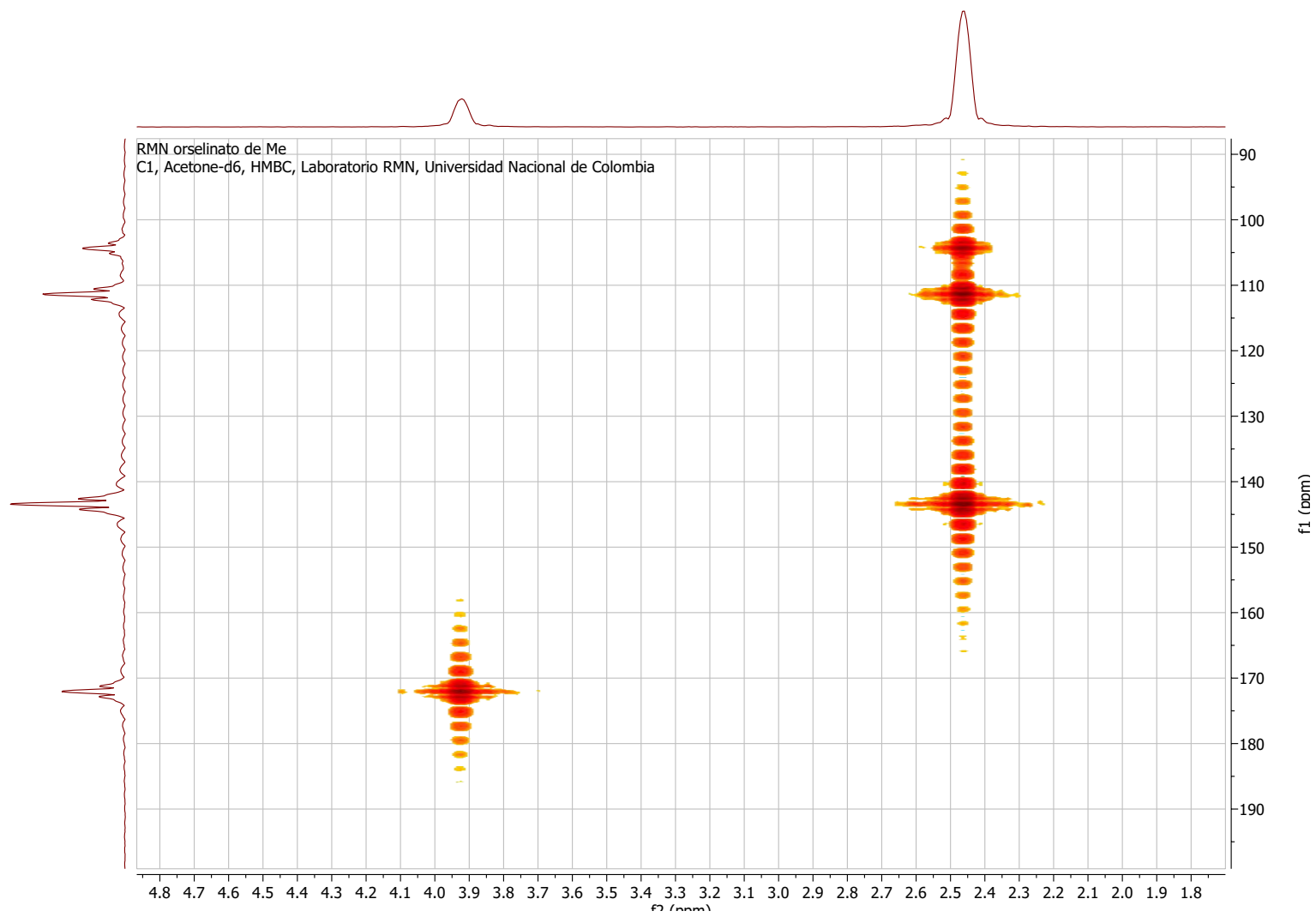


Figura B-22: Ampliación del Espectro de correlación H \rightarrow C HMBC (δ_H 1,70 ppm - 4,10 ppm) del orselinato de metilo (**3**). Correlaciones del átomo de hidrógeno del grupo metilo unido al anillo aromático (δ_H 2,47 ppm - H8) y del grupo metoxilo (δ_H 3,93 ppm - C7-COOCH3).

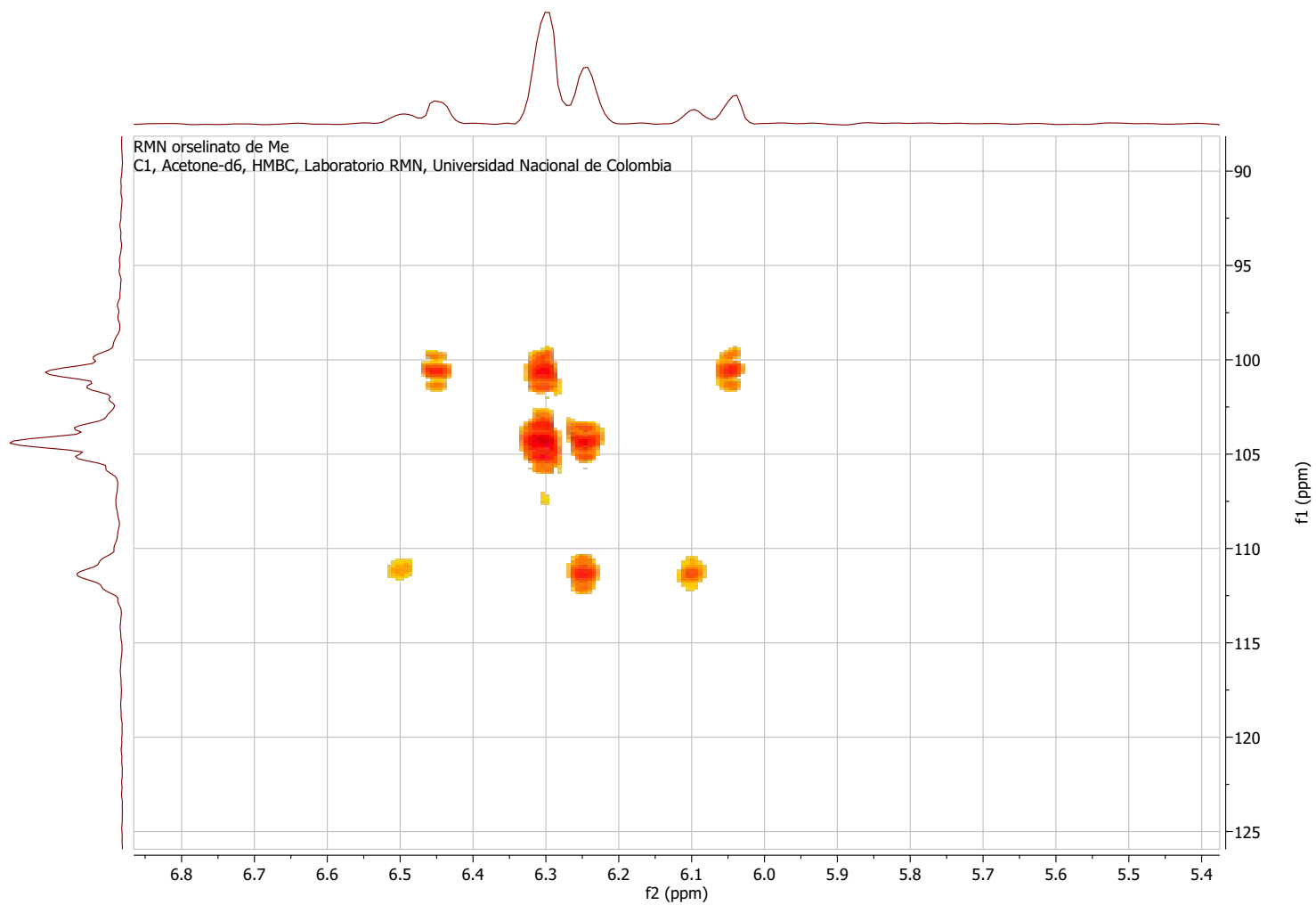


Figura B-23: Ampliación del Espectro de correlación H → C HMBC del orselinato de metilo (**3**) (δ_H 5,40 ppm - 6,80 ppm), para ver los acoplamientos H3 y H5 con C3 ($\delta_C = 101,3$); C1 ($\delta_C = 105,4$) y C5 ($\delta_C = 112,3$) y las señales satélite.

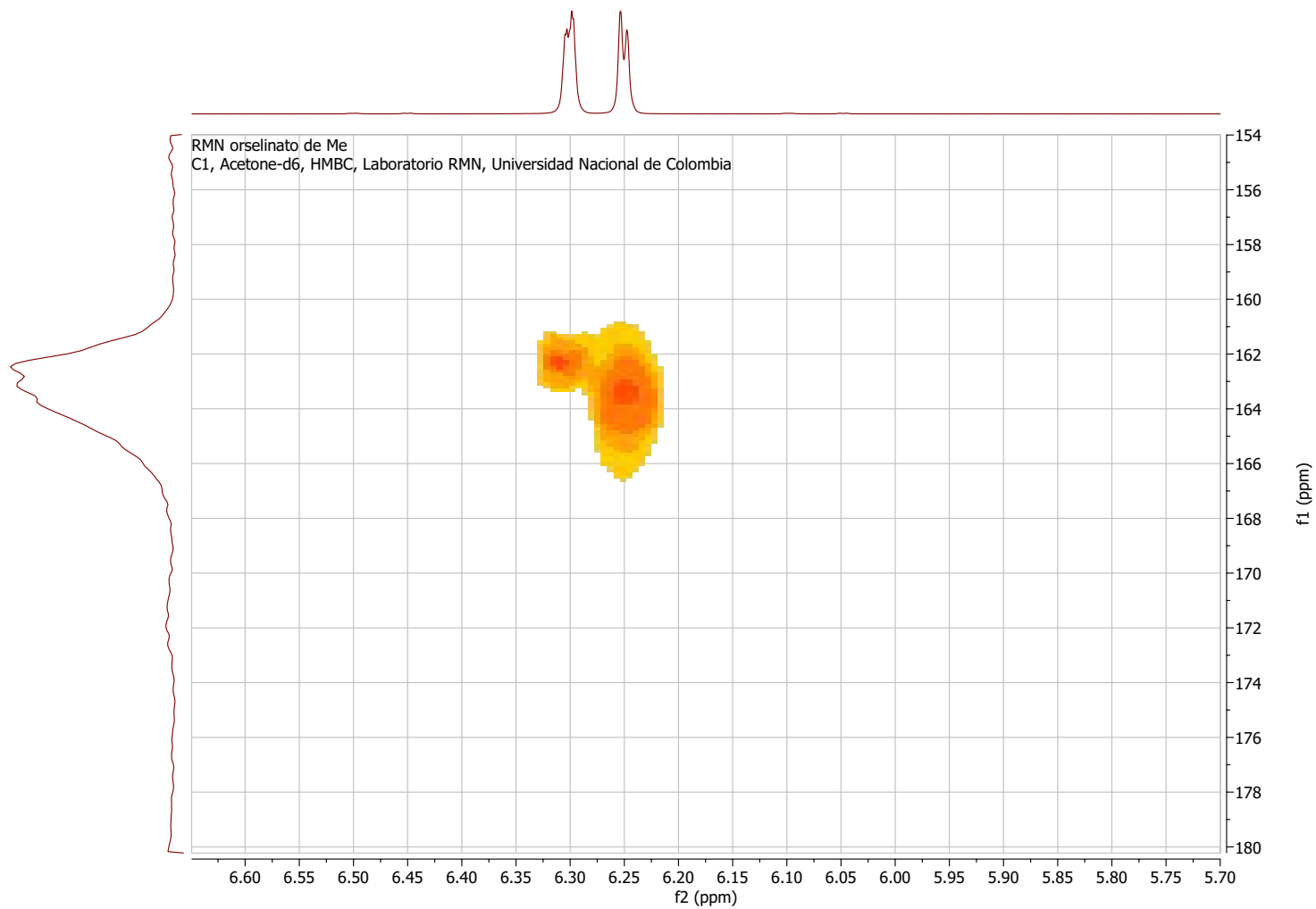


Figura B-24: Ampliación del Espectro de correlación H \rightarrow C **HMBC** (δ_H 5,70 ppm - 6,65 ppm) del orselinato de metilo (**3**), para observar los acoplamientos de H3 ($\delta_H = 6,25$) y H5 ($\delta_H = 6,30$) con C4 ($\delta_C = 163,4$).

C Datos de actividad antioxidante

C.1 Poder captador de radicales libres con el modelo DPPH

Tabla C-1: Datos estadísticos de la regresión para obtener la CE₅₀ para la actividad captadora de radicales libres con el modelo DPPH

Sustancia	Relación AH / DPPH	Porcentaje Remanente 1	Valores de regresión		Porcentaje Remanente 2	Valores de regresión		Porcentaje Remanente Promedio (SD)
			r ²	p-valor		r ²	p-valor	
BHT	0,00	100,00			100,00			100
	0,01	91,86	0,8932	0,00083	92,76	0,8659	0,00050	92,31 (0,64)
	0,05	89,21	0,9428	0,00017	92,40	0,9091	0,00019	90,81 (2,26)
	0,10	87,29	0,9533	0,00053	91,02	0,8843	0,00332	89,16 (2,64)
	0,25	80,36	0,8662	0,00147	81,99	0,6786	0,00389	81,18 (1,15)
	0,49	84,60	0,9914	0,00002	82,15	0,8529	0,00541	83,38 (1,73)
	1,03	69,32	0,8534	0,00537	77,91	0,9728	0,00125	73,62 (6,07)
	4,96	57,03	0,5734	0,04990	52,22	0,6437	0,00567	54,63 (3,40)
	9,91	45,22	0,8244	0,02114	38,76	0,8586	7,20 × 10 ⁻⁵	41,99 (4,57)
	19,83	17,01	0,6692	0,00804	24,82	0,9201	2,70 × 10 ⁻⁵	20,92 (5,52)
	39,45	19,74	0,8592	0,00020	22,46	0,8103	0,00358	21,10 (1,92)
AG	0,00	100,00			100,00			100
	0,01	75,43	0,8508	0,00194	70,39	0,7682	0,00266	72,91 (3,56)
	0,04	70,86	0,8775	0,00012	67,08	0,7510	0,00072	68,97 (2,67)
	0,09	44,50	0,6140	0,02276	44,85	0,5460	0,03515	44,68 (0,25)
	0,22	11,95	0,8028	0,02530	13,24	0,6149	0,02262	12,60 (0,91)
	1,05	13,01	0,9655	0,01156	9,16	0,9240	0,00588	11,09 (2,72)
	1,84	12,79	0,7892	0,00470	8,97	0,9754	0,00015	10,88 (2,70)
	8,66	9,25	0,5499	0,04602	4,70	0,4052	0,02833	6,98 (3,22)
	17,31	6,11	0,5924	0,00340	9,91	0,6913	0,00648	8,01 (2,69)
	34,36	11,19	0,5657	0,00116	8,52	0,9128	0,00724	9,86 (1,89)
	1	0,00	100,00			100,00		
0,01		95,11	0,9032	0,00018	87,22	0,6532	0,00159	91,16 (5,58)
0,05		87,95	0,7877	0,01149	85,25	0,5885	0,01604	86,60 (1,91)
0,10		87,51	0,8107	0,02375	84,85	0,5392	0,00395	86,18 (1,88)
0,34		82,65	0,7848	0,01182	86,32	0,7022	0,00041	84,49 (2,60)
0,57		81,58	0,7618	0,01459	84,18	0,7832	0,01200	82,88 (1,84)
1,02		81,69	0,8933	0,04840	81,73	0,5076	0,04379	81,71 (0,03)
4,98		63,34	0,9473	0,00337	73,81	0,6216	0,01229	68,58 (7,41)
9,96		71,04	0,9052	0,00061	76,72	0,7771	0,00237	73,88 (4,02)
19,80		47,70	0,5071	0,04112	34,14	0,8004	0,00570	40,92 (9,59)
39,49		24,83	0,8531	0,02022	15,53	0,6076	0,04070	20,58 (6,58)
2	0,00	100,00			100,00			100
	0,01	94,86	0,7708	0,00257	97,01	0,6596	0,00146	95,94 (1,52)
	0,05	91,10	0,6495	0,00534	92,95	0,5995	0,00313	92,03 (1,31)
	0,10	89,09	0,4786	0,03441	87,65	0,8197	0,00048	88,37 (1,02)
	0,24	84,36	0,4202	0,03506	85,94	0,7729	0,00250	85,15 (1,12)
	0,48	84,81	0,7237	0,04285	77,05	0,9966	0,00112	80,93 (5,43)
	1,08	75,43	0,8195	0,02207	77,91	0,9428	0,00382	76,67 (1,75)
	4,98	73,85	0,8947	0,00966	78,13	0,8235	0,02131	75,99 (3,03)
	9,74	63,65	0,9202	0,02695	72,94	0,7787	0,00533	68,30 (6,57)

Se acepta que el modelo de regresión lineal es válido para p-valor < 0,05.

Continúa en la página siguiente

Tabla C-1- Continúa de la página anterior

Sustancia	Relación AH / DPPH	Porcentaje Remanente 1	Valores de regresión		Valores de regresión		Porcentaje Remanente Promedio (SD)
			r ²	p-valor	Remanente 2	r ²	
2	19,48	58,89	0,9814	0,00008	50,94	0,9251	54,91 (5,62)
	38,75	40,20	0,8646	0,00175	33,57	0,9977	36,89 (4,69)
3	0,00	100,00			100,00		100
	2,08	96,22	0,7143	0,04515	94,05	0,8904	95,14 (1,53)
	9,35	93,71	0,9694	0,00149	75,06	0,9397	84,38 (13,19)
	17,40	87,73	0,9662	0,00005	77,87	0,8918	82,80 (6,97)
	36,87	83,02	0,8709	0,00134	87,79	0,9199	85,41 (3,37)
	73,74	79,71	0,8267	0,00109	82,39	0,9480	85,09 (4,56)

Se acepta que el modelo de regresión lineal es válido para p-valor < 0,05.

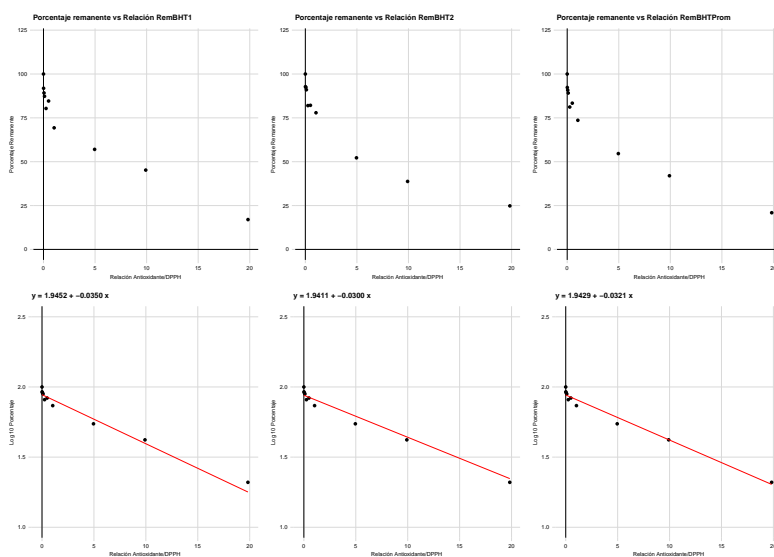


Figura C-1: Resultados de poder captador de radicales libres y modelo de regresión obtenido para el BHT.

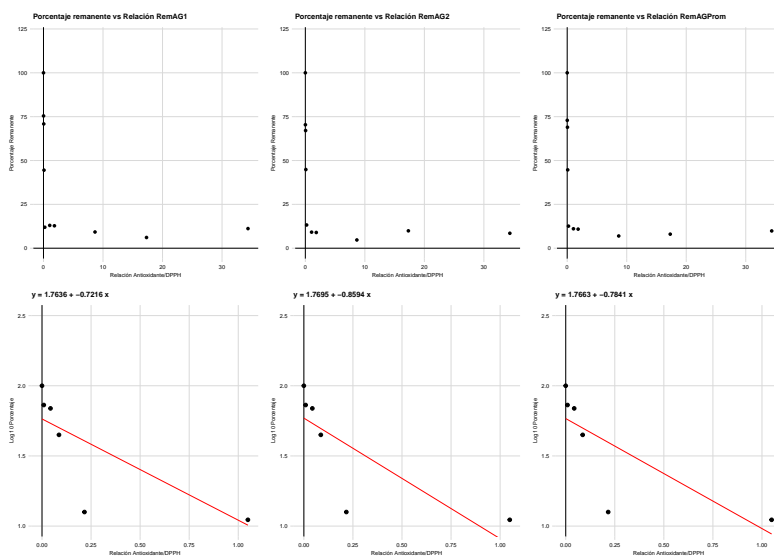


Figura C-2: Resultados de poder captador de radicales libres y modelo de regresión obtenido para el AG.

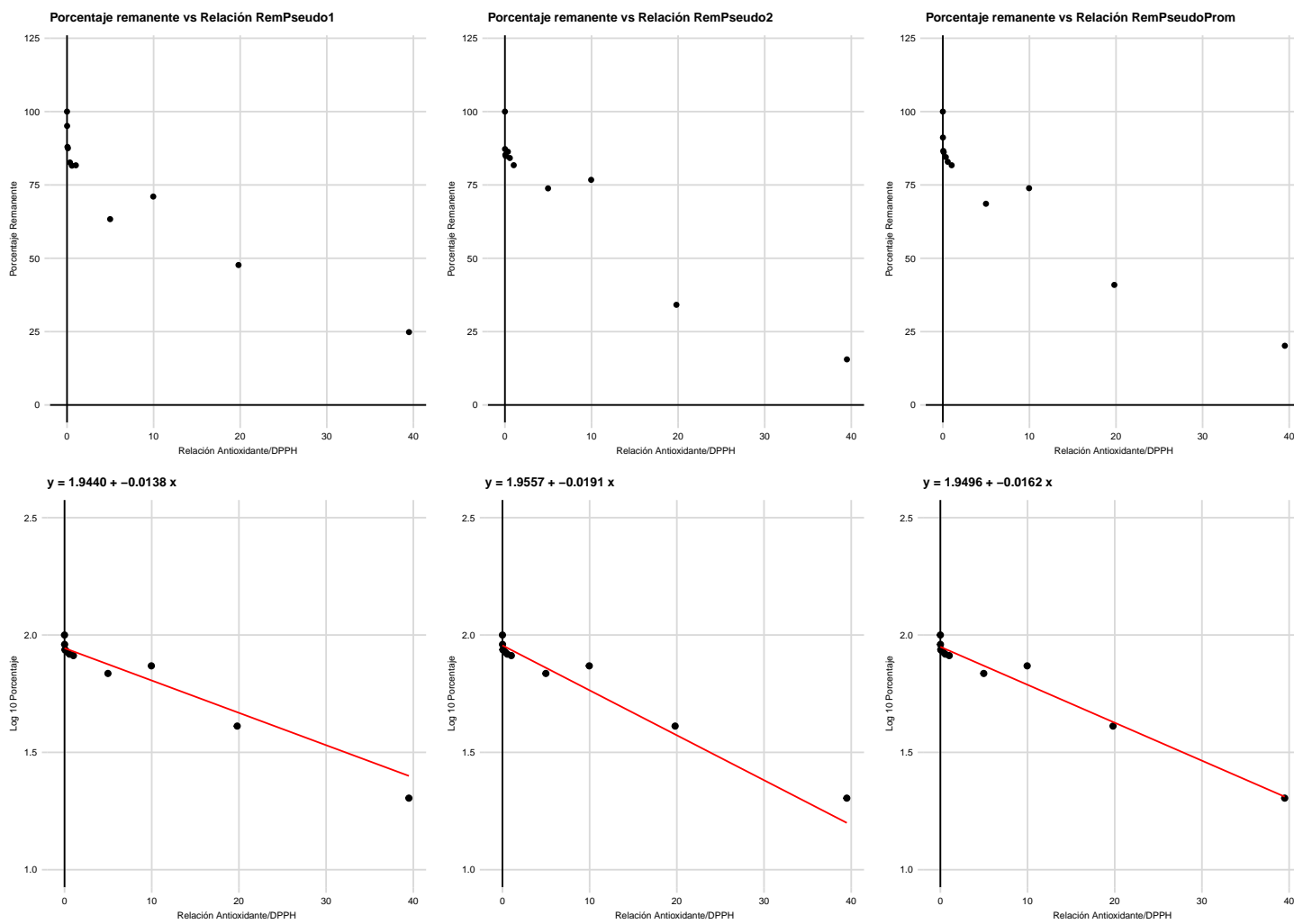


Figura C-3: Resultados de poder captador de radicales libres y modelo de regresión obtenido para la pseudociferelina A (1).

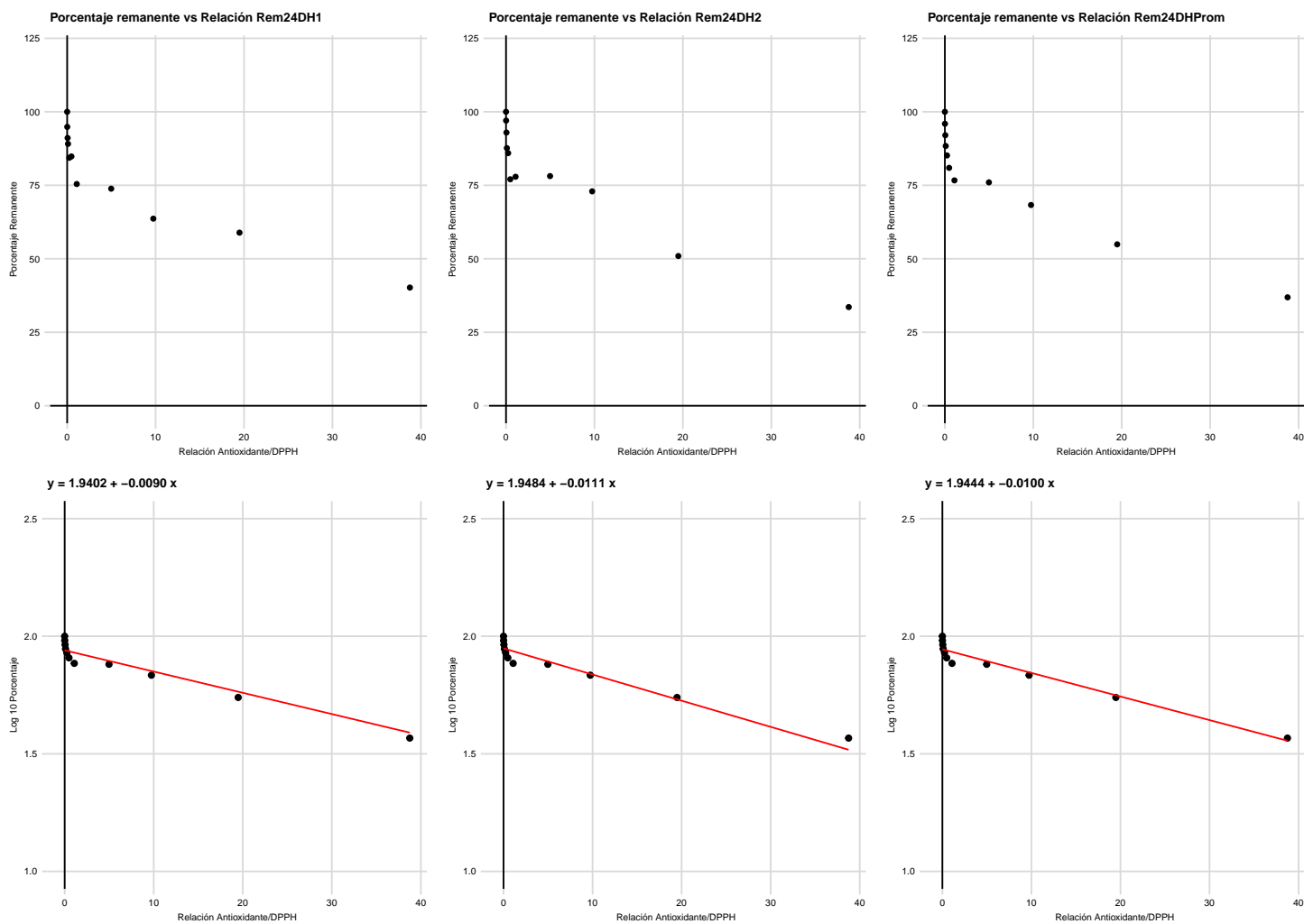


Figura C-4: Resultados de poder captador de radicales libres y modelo de regresión obtenido para el 2,4-dihidroxi-3,5,6-trimetilbenzoato de metilo (2).

C.2 Poder Reductor Ferrico - **FRAP**

Tabla C-2: Poder reductor férrico de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii*

Muestra	Poder reductor férrico (FRAP) expresado como Absorbancia			
	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	500 µg/mL
BHT	0,0882 (0,0018)	0,1319 (0,0168)	0,2159 (0,0059)	0,3994 (0,0166)
AG	0,3136 (0,0074)	0,6181 (0,0798)	0,9455 (0,0682)	2,0635 (0,0640)
1	0,0233 (0,0021)	0,0297 (0,0030)	0,0349 (0,0025)	0,0520 (0,0040)
2	0,0397 (0,0077)	0,0478 (0,0054)	0,0821 (0,0119)	0,1162 (0,0178)
3	0,1847 (0,0088)	0,2232 (0,0076)	0,2002 (0,0078)	0,1998 (0,0042)

Los valores representan el promedio de tres medidas independientes

La desviación estándar se presenta en los paréntesis (**SD**)

C.3 Inhibición de la peroxidación Lipídica

Tabla C-3: Poder inhibidor de la peroxidación lipídica del extracto y los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii*

Muestra	Poder inhibidor de la peroxidación lipídica - % IPL a 24 horas			
	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL	500 µg/mL
AG	-26,55 (5,62)	-22,45 (2,59)	-15,44 (2,31)	-1,54 (15,64)
BHT-Comp	77,67 (1,27)	78,01 (5,35)	79,75 (15,96)	86,46 (3,68)
BHT-Ext	89,01 (0,75)	84,60 (8,00)	63,84 (10,23)	87,73 (1,33)
TPNa-Comp	55,64 (15,30)	63,31 (1,08)	61,06 (5,05)	69,08 (1,34)
TPNa-Ext	23,98 (2,16)	22,65 (4,09)	42,26 (1,26)	38,27 (4,42)
Extracto <i>Lobariella</i>	23,85 (10,37)	53,86 (10,09)	50,03 (0,46)	46,04 (5,49)
Pseudociferelina A (1)	42,79 (3,49)	42,71 (13,03)	72,87 (2,80)	60,31 (0,19)
2,4-DH (2)	36,90 (5,94)	65,30 (2,09)	51,42 (0,75)	67,07 (1,71)
Orselinato de metilo (3)	32,02 (4,40)	48,69 (1,02)	21,78 (6,41)	36,82 (13,06)
	Poder inhibidor de la peroxidación lipídica - % IPL a 48 horas			
AG	4,16 (14,99)	9,44 (6,18)	9,11 (6,79)	-38,26 (10,98)
BHT-Comp	80,35 (0,22)	81,62 (1,00)	70,30 (3,12)	80,71 (4,33)
BHT-Ext	87,33 (2,15)	84,66 (0,28)	87,80 (5,22)	85,46 (0,17)
TPNa-Comp	36,61 (5,71)	17,49 (6,16)	47,59 (1,23)	71,32 (1,87)
TPNa-Ext	19,39 (18,52)	4,49 (9,39)	38,58 (1,60)	65,40 (4,71)
Extracto <i>Lobariella</i>	32,46 (2,27)	-1,08 (1,58)	31,93 (14,77)	52,89 (2,73)
Pseudociferelina A (1)	19,88 (5,35)	21,50 (5,72)	-1,19 (5,06)	10,13 (3,51)
2,4-DH (2)	-6,56 (0,35)	33,92 (1,83)	20,22 (1,73)	61,61 (5,67)
Orselinato de metilo (3)	-8,55 (28,32)	18,17 (8,49)	14,18 (0,78)	9,07 (2,00)
	Poder inhibidor de la peroxidación lipídica - % IPL a 72 horas			
AG	13,20 (6,04)	-7,82 (3,63)	-1,30 (1,92)	18,92 (3,25)
BHT-Comp	97,98 (0,73)	88,53 (0,42)	80,18 (3,09)	90,68 (1,01)
BHT-Ext	79,88 (0,67)	77,45 (0,22)	87,81 (0,86)	81,87 (0,26)
TPNa-Comp	29,93 (0,25)	-0,80 (6,11)	49,44 (0,76)	67,48 (0,66)
TPNa-Ext	38,89 (7,89)	32,51 (9,52)	45,40 (0,50)	73,00 (5,03)
Extracto <i>Lobariella</i>	45,98 (12,62)	43,29 (1,78)	38,59 (8,93)	76,26 (2,26)
Pseudociferelina A (1)	10,05 (12,95)	9,82 (0,41)	5,92 (0,87)	16,70 (7,00)
2,4-DH (2)	7,86 (3,51)	33,80 (3,42)	7,38 (7,42)	29,78 (0,68)
Orselinato de metilo (3)	18,14 (1,81)	13,22 (7,48)	12,63 (4,11)	18,63 (0,68)

2,4-DH Abreviatura de 2,4-dihidroxi-3,5,6-trihidroxibenzoato de metilo.

*Los valores representan el promedio de dos medidas independientes luego de hacer el descarte del tercer dato con Z-Score > 1.

La desviación estándar se presenta dentro de los paréntesis (**SD**)

D Datos de actividad fotoprotectora

Tabla D-1: Datos promedio de actividad fotoprotectora de diversos extractos de líquenes

Extracto / Sustancia	Concentración (µg/mL)	Longitud de onda crítica	Amplitud espectral			Factor de Protección Solar
			R*	R UVA/UVB	R UVA-I	
BMT	10	362,7 (0,1)	1,263 (0,049)	0,474 (0,018)	0,601 (0,010)	9,809 (0,844)
	50	364,1 (0,2)	1,744 (0,022)	0,654 (0,008)	0,720 (0,009)	40,01 (0,00)
	100	367,5 (0,0)	1,957 (0,010)	0,734 (0,004)	0,800 (0,003)	40,01 (0,00)
	200	374,2 (0,1)	2,108 (0,010)	0,790 (0,004)	0,850 (0,003)	40,01 (0,00)
OMC - EHMC	10	330,9 (3,0)	0,352 (0,048)	0,131 (0,022)	0,072 (0,045)	8,237 (0,321)
	50	329,6 (0,7)	0,360 (0,012)	0,135 (0,009)	0,042 (0,012)	34,54 (0,82)
	100	332,8 (0,4)	0,571 (0,010)	0,216 (0,003)	0,059 (0,009)	40,01 (0,00)
<i>Lobariella sipmanii</i>	10	354,7 (6,3)	0,535 (0,132)	0,200 (0,060)	0,297 (0,061)	2,56 (0,86)
	50	355,7 (6,3)	0,535 (0,132)	0,197 (0,020)	0,297 (0,061)	8,79 (1,94)
	100	355,8 (1,6)	0,544 (0,028)	0,203 (0,013)	0,299 (0,015)	17,37 (0,47)
	200	360,0 (0,7)	0,667 (0,021)	0,250 (0,009)	0,344 (0,009)	29,25 (1,68)
<i>Thamnomia vermicularis</i>	10	367,2 (7,9)	0,875 (0,304)	0,328 (0,114)	0,482 (0,124)	1,896 (0,913)
	50	367,0 (1,0)	1,032 (0,101)	0,387 (0,038)	0,537 (0,027)	5,727 (0,702)
	100	367,9 (0,7)	1,093 (0,054)	0,410 (0,020)	0,554 (0,014)	10,99 (0,81)
	200	366,9 (0,1)	1,047 (0,014)	0,393 (0,009)	0,538 (0,004)	21,19 (0,35)
<i>Everniastrum sp</i>	10	361,6 (3,4)	0,581 (0,133)	0,164 (0,078)	0,343 (0,043)	2,542 (0,736)
	50	346,7 (2,0)	0,474 (0,036)	0,177 (0,016)	0,236 (0,017)	8,110 (1,219)
	100	351,3 (3,4)	0,526 (0,041)	0,196 (0,018)	0,271 (0,026)	16,59 (1,16)
	200	344,9 (1,4)	0,478 (0,018)	0,179 (0,009)	0,222 (0,012)	31,74 (0,47)
<i>Peltigera neopolydactyla</i>	10	343,1 (14,3)	0,422 (0,193)	0,231 (0,117)	0,218 (0,117)	1,580 (0,938)
	50	340,3 (8,6)	0,384 (0,080)	0,221 (0,054)	0,185 (0,055)	3,373 (0,968)
	100	344,0 (1,3)	0,405 (0,024)	0,241 (0,034)	0,205 (0,007)	5,649 (1,015)
	200	338,0 (3,4)	0,369 (0,026)	0,314 (0,068)	0,170 (0,020)	8,710 (0,697)
<i>Cladonia didyma</i>	10	338,6 (14,8)	0,330 (0,209)	0,144 (0,071)	0,180 (0,127)	2,27 (0,07)
	50	360,7 (1,8)	0,546 (0,058)	0,204 (0,026)	0,340 (0,024)	5,89 (0,84)
	100	364,2 (1,2)	0,567 (0,038)	0,211 (0,017)	0,359 (0,016)	10,52 (0,86)
	200	366,7 (0,3)	0,597 (0,015)	0,223 (0,007)	0,379 (0,004)	17,39 (3,53)

La desviación estándar se presenta dentro de los paréntesis (SD)

Tabla D-2: Datos de actividad fotoprotectora de los compuestos obtenidos a partir de *Lobariella sipmanii*

Extracto / Sustancia	Concentración (µg/mL)	Longitud de onda crítica	R*	Amplitud espectral		Factor de Protección Solar
				R UVA/UVB	R UVA-I	
Extracto <i>Lobariella sipmanii</i>	10	355,4	0,534	0,200	0,321	4,723
		349,0	0,465	0,174	0,265	4,479
		348,7	0,462	0,173	0,262	4,415
Promedio ± SD		351,0 ± 3,7	0,487 ± 0,041	0,183 ± 0,015	0,283 ± 0,033	4,539 ± 0,162
Extracto <i>Lobariella sipmanii</i>	50	349,2	0,447	0,168	0,261	10,47
		347,9	0,429	0,161	0,250	10,71
		349,9	0,450	0,169	0,266	11,01
Promedio ± SD		349,0 ± 1,0	0,442 ± 0,011	0,166 ± 0,004	0,259 ± 0,008	10,73 ± 0,27
Extracto <i>Lobariella sipmanii</i>	100	347,7	0,415	0,156	0,245	17,83
		348,2	0,419	0,157	0,249	17,71
		348,2	0,419	0,157	0,249	17,17
Promedio ± SD		348,0 ± 0,3	0,418 ± 0,002	0,157 ± 0,001	0,248 ± 0,002	17,57 ± 0,35
Extracto <i>Lobariella sipmanii</i>	200	347,8	0,405	0,152	0,243	37,24
		348,4	0,416	0,156	0,248	33,04
		348,9	0,429	0,161	0,254	32,50
Promedio ± SD		348,3 ± 0,6	0,417 ± 0,012	0,156 ± 0,005	0,248 ± 0,005	34,26 ± 2,59

Continúa en la siguiente página

D. Datos de actividad fotoprotectora

Tabla D-2 - Continúa de la página anterior

Extracto / Sustancia	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Longitud de onda crítica	Amplitud espectral			Factor de Protección Solar
			R UV-r*	R UVA/UVB	R UVA-I	
Pseudociferelina A	10	346,4	0,443	0,166	0,244	3,407
		348,6	0,460	0,172	0,262	3,349
		353,0	0,504	0,189	0,299	3,428
Promedio \pm SD		349,3 \pm 3,4	0,469 \pm 0,032	0,176 \pm 0,012	0,269 \pm 0,028	3,394 \pm 0,041
Pseudociferelina A	50	360,9	0,540	0,202	0,340	5,192
		356,9	0,501	0,188	0,310	5,105
		355,9	0,492	0,185	0,303	5,087
Promedio \pm SD		357,9 \pm 2,7	0,511 \pm 0,025	0,192 \pm 0,009	0,317 \pm 0,020	5,128 \pm 0,056
Pseudociferelina A	100	367,2	0,604	0,226	0,388	7,761
		366,3	0,593	0,222	0,380	7,329
		367,7	0,614	0,230	0,395	7,448
Promedio \pm SD		367,1 \pm 0,7	0,604 \pm 0,010	0,226 \pm 0,004	0,388 \pm 0,007	7,512 \pm 0,223
Pseudociferelina A	200	366,4	0,700	0,262	0,431	10,39
		364,2	0,723	0,271	0,434	9,223
		366,7	0,677	0,254	0,421	9,855
Promedio \pm SD		365,8 \pm 1,3	0,700 \pm 0,023	0,262 \pm 0,009	0,428 \pm 0,007	9,822 \pm 0,584
2,4-hidroxi-3,5,6-trimetil benzoato de metilo	10	339,7	0,4139	0,1552	0,1796	4,020
		339,1	0,4190	0,1571	0,1741	4,258
		339,7	0,4194	0,1573	0,1801	4,074
Promedio \pm SD		339,5	0,4174	0,1565	0,1779	4,117
2,4-hidroxi-3,5,6-trimetil benzoato de metilo	50	335,8	0,456	0,171	0,133	8,29
		336,1	0,458	0,172	0,139	8,05
		335,8	0,456	0,171	0,134	8,23
Promedio \pm SD		335,9 \pm 0,2	0,457 \pm 0,001	0,171 \pm 0,001	0,135 \pm 0,003	8,19 \pm 0,12
2,4-hidroxi-3,5,6-trimetil benzoato de metilo	100	334,7	0,465	0,174	0,117	12,24
		334,7	0,466	0,175	0,117	12,46
		334,7	0,466	0,175	0,117	12,36
Promedio \pm SD		334,7 \pm 0,01	0,466 \pm 0,001	0,175 \pm 0,001	0,117 \pm 0,001	12,35 \pm 0,01
2,4-hidroxi-3,5,6-trimetil benzoato de metilo	200	333,9	0,475	0,178	0,104	21,86
		333,9	0,475	0,178	0,104	21,78
		333,9	0,478	0,179	0,103	21,95
Promedio \pm SD		333,9 \pm 0,0	0,476 \pm 0,002	0,178 \pm 0,001	0,104 \pm 0,001	21,86 \pm 0,09
Orselinato de metilo	10	332,9	0,2513	0,0942	0,1278	5,9298
		332,5	0,2487	0,0933	0,1242	5,8899
		332,9	0,2509	0,0941	0,1264	5,9398
Promedio \pm SD		332,8	0,2503	0,0939	0,1261	5,92
Orselinato de metilo	50	322,1	0,1367	0,0513	0,0661	17,61
		322,3	0,1386	0,052	0,065	16,45
		321,7	0,1315	0,0493	0,0589	17,07
Promedio \pm SD		322,0142	0,1356	0,0509	0,0633	17,04
Orselinato de metilo	100	319,1	0,0991	0,0371	0,0354	27,79
		319,1	0,0984	0,0369	0,0343	30,51
		318,9	0,096	0,0360	0,0337	29,40
Promedio \pm SD		319,0359	0,0978	0,0367	0,0345	29,23
Orselinato de metilo	200	319,6	0,1043	0,0391	0,0241	38,16
		319,6	0,1042	0,0391	0,0261	38,67
		319,4	0,1015	0,0381	0,0241	38,40
Promedio \pm SD		319,5	0,1033	0,0388	0,0248	38,41

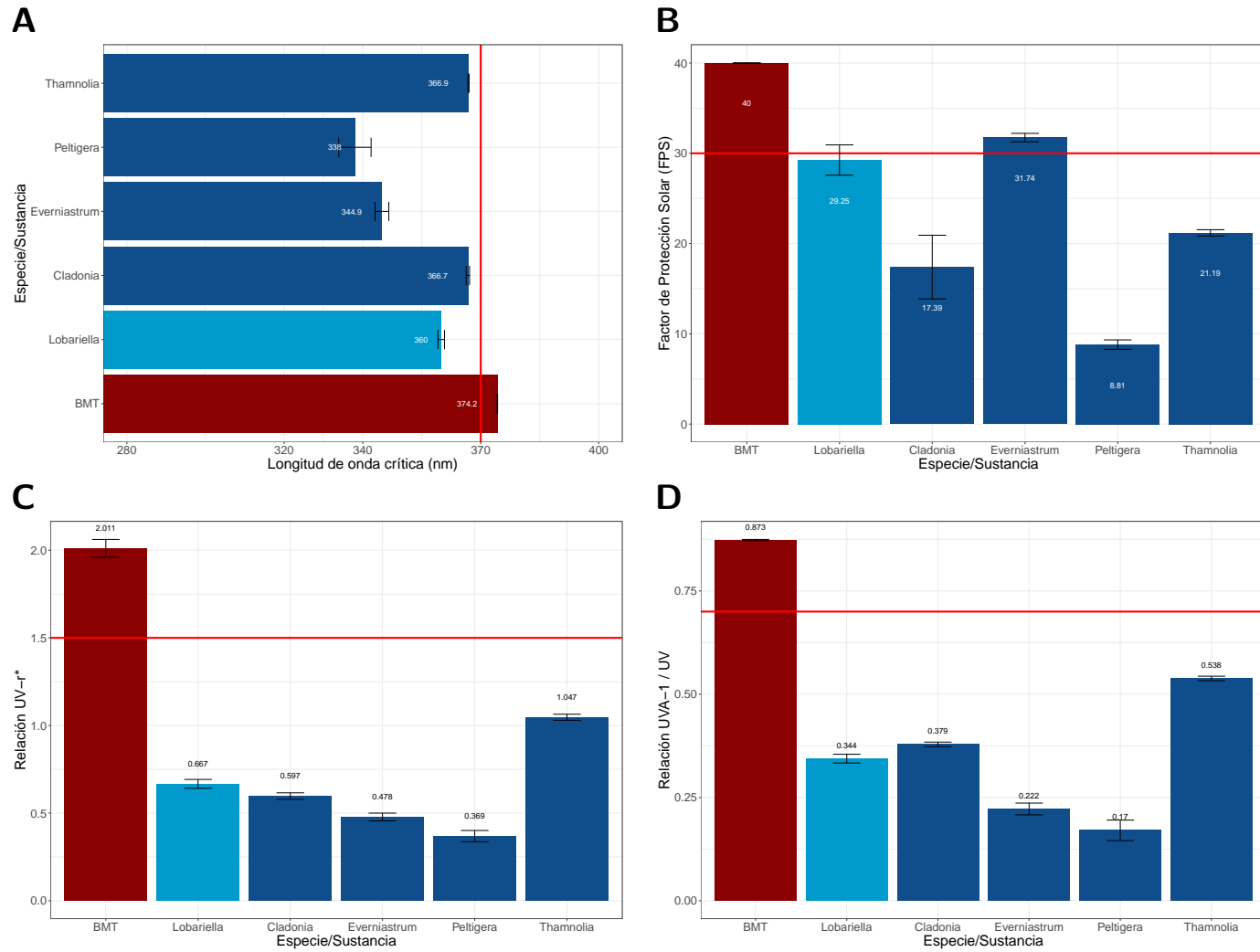


Figura D-1: Resultados de los parámetros de fotoprotección a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de algunos extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz y el patrón BMT. **A.** Longitud de onda crítica (λ_{crit}) **B.** Factor de protección solar (FPS) **C.** Relación UV-r* **D.** Relación UVA-I. En azul celeste se resalta *Lobariella sipmanii*.

E Análisis estadístico

En esta sección se presentan las gráficas y tablas que soportan el análisis estadístico (Sección 6.3.4) de los datos obtenidos para cada uno de los ensayos.

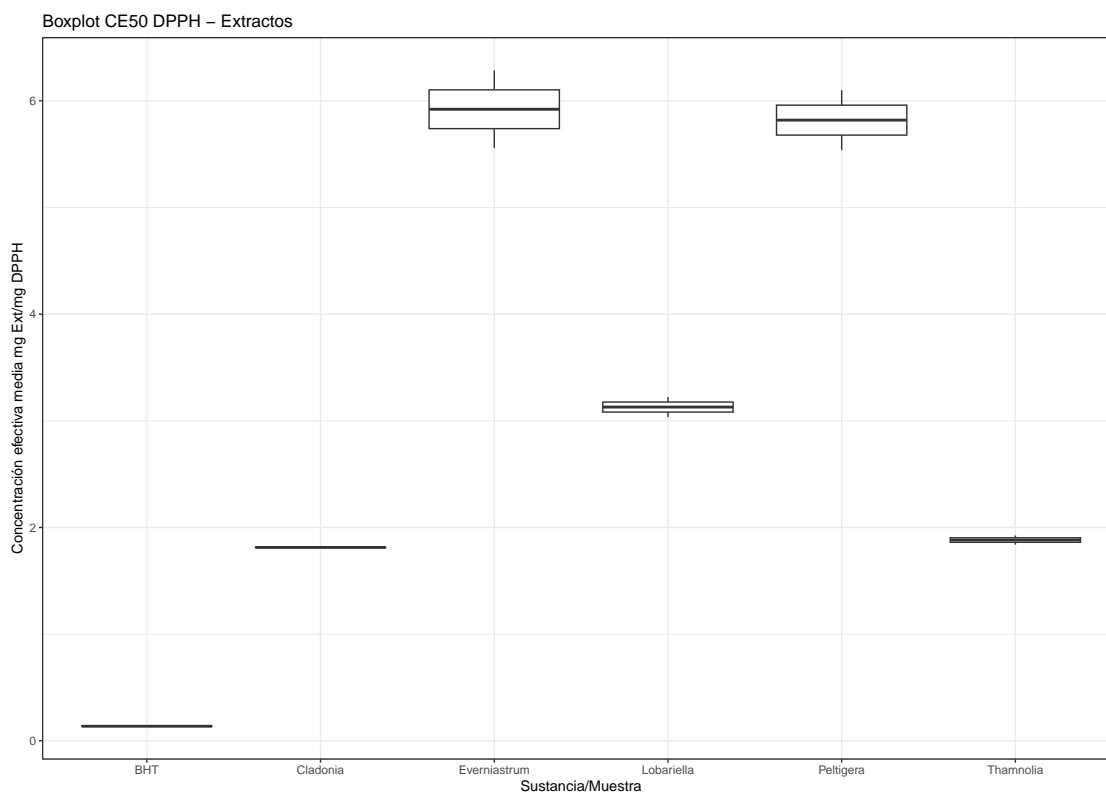


Figura E-1: Diagrama de caja de los datos de actividad captadora de radicales (Concentración efectiva media CE_{50}) con el modelo **DPPH** para los extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz.

Tabla E-1: Pruebas de comprobación de hipótesis de normalidad y homocedasticidad para el ensayo de la actividad captadora de radicales libres de los extractos de hongos liquenizados del Páramo de Sumapaz y el patrón **BHT**.

	Normalidad		Homocedasticidad		
	Estadístico W	p-valor	Prueba de Bartlett	Estadístico K	p-valor
Shapiro-Wilk	0,8894	0,1157		13,301	0,0207

Se aplicó un **ANOVA** de Welch sobre los datos transformados para establecer las diferencias entre grupos

E. Análisis estadístico

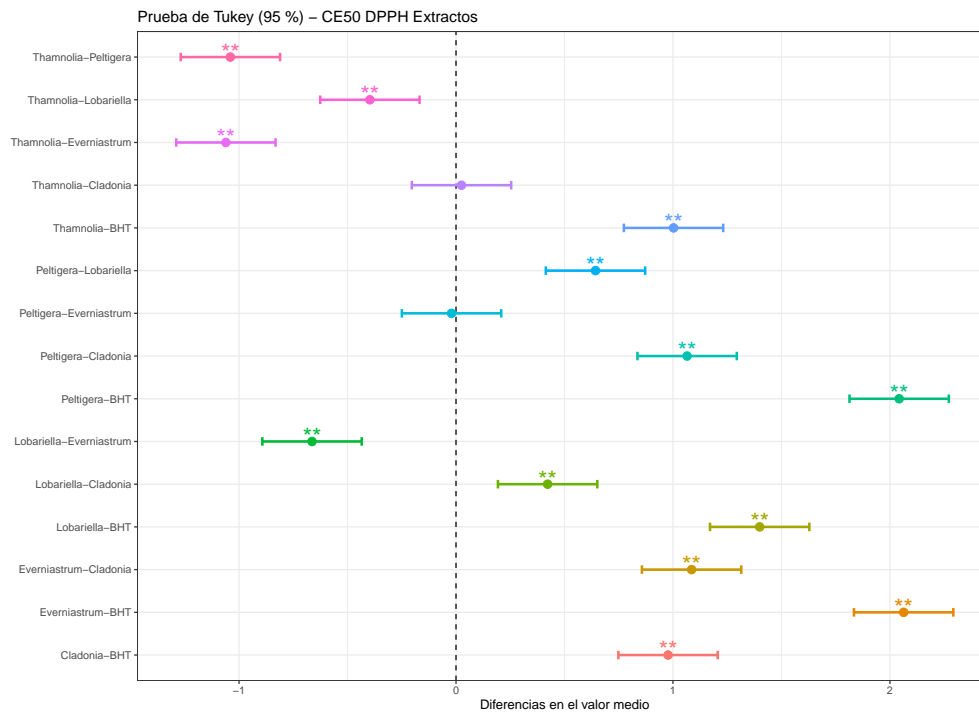


Figura E-2: Prueba de Tukey con nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para el ANOVA de Welch del ensayo de actividad captadora de radicales con el modelo DPPH para los extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz. Los * representan los niveles de significancia en donde hay diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Sin símbolo, no hay diferencias.

Tabla E-2: Resultados del ANOVA a una vía de Welch del ensayo de captación de radicales libres con el modelo DPPH para algunos extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz

	Numerador DF	Denominador DF	Valor F	Prob > F
DPPH	5,000	2,482	145299	$4,8 \times 10^{-7}$

Se efectuó un ANOVA de Welch debido a que los datos presentaron no homogeneidad de varianzas.

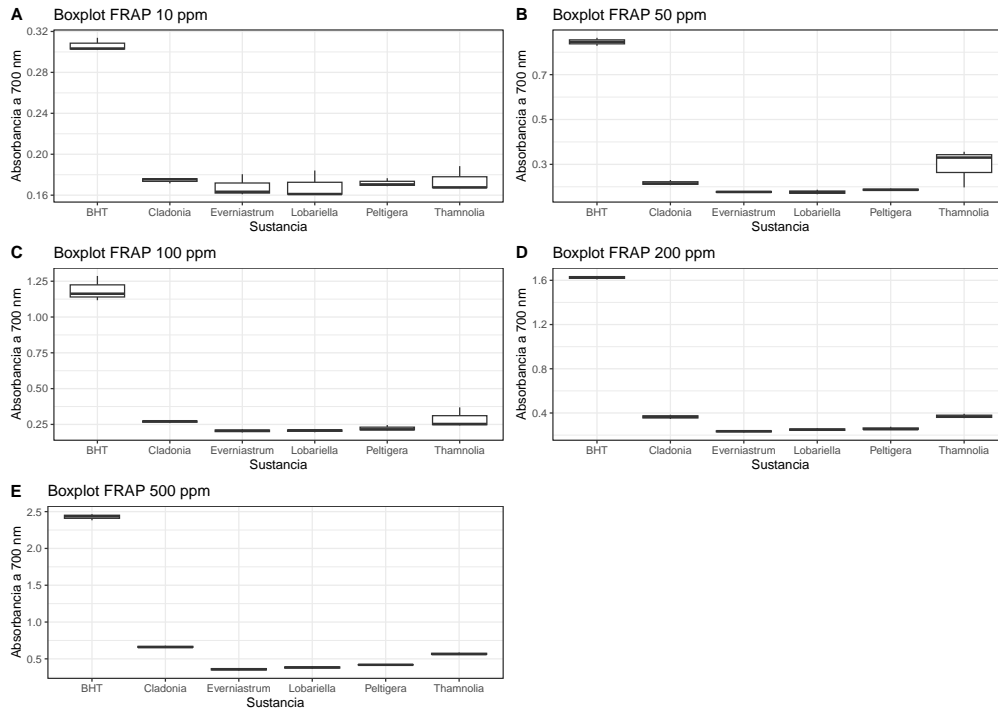


Figura E-3: Diagrama de caja de los datos de Poder Reductor Férrico para los extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz.

Tabla E-3: Valores de la prueba de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$) para el ensayo de poder reductor férrico de los extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz.

Sustancia	Parámetro	Concentración en el ensayo				
		10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
BHT	Estadístico W	0,808812547	0,9998719	0,9328096	0,9773808	0,9725446
	p-valor	0,135715214	0,9783802	0,4992247	0,7116691	0,6820763
<i>Lobariella</i>	Estadístico W	0,7741676	0,9940213	0,9313432	0,9961490	0,9864889
	p-valor	0,0542145	0,8521777	0,4936594	0,8814049	0,7775004
<i>Thamnolia</i>	Estadístico W	0,9642857	0,8685554	0,8058367	0,9699652	0,9035680
	p-valor	0,6368868	0,2914312	0,1285100	0,6673312	0,3969508
<i>Everniastrum</i>	Estadístico W	0,840293980	0,9971047	0,9974036	0,9727419	0,9992275
	p-valor	0,214826758	0,8971847	0,9026402	0,6832315	0,9469112
<i>Peltigera</i>	Estadístico W	0,904101446	0,9732128	0,8773185	0,7966805	0,7500000
	p-valor	0,398678649	0,6860043	0,3165610	0,1065980	0,0000000
<i>Cladonia</i>	Estadístico W	0,902707080	0,9592859	0,9295739	0,9999906	0,9131581
	p-valor	0,394171200	0,6119694	0,4870173	0,9941348	0,4287027

Tabla E-4: Prueba de Levene para establecer la homocedasticidad de los datos del ensayo de poder reductor férrico (FRAP) para los extractos de varias especies de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz.

Estadístico	Prueba de Levene				
	10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	200 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
F-value	0,652168	1,300446	1,022014	0,237098	1,292214
Pr > F	0,665751	0,326803	0,447080	0,938532	0,329852

E. Análisis estadístico

Tabla E-5: Resultados del ANOVA a una vía para el ensayo de poder reductor férrico (FRAP) de algunos extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz y el patrón BHT.

Concentración	GL	GL Residual	Suma de Cuadrados	Residual	Error Cuadrado Medio	Residual	Valor F	Prob > F
10 µg/mL	5	12	0,04760	0,00036	0,00952	0,00003	313,9	$2,77 \times 10^{-12}$
50 µg/mL			1,040	0,016	0,20808	0,00131	159,1	$1,55 \times 10^{-10}$
100 µg/mL			2,276	0,026	0,4552	0,0022	206,2	$3,35 \times 10^{-11}$
200 µg/mL			4,469	0,003	0,8938	0,0002	3731	$< 2 \times 10^{-16}$
500 µg/mL			9,711	0,005	1,9422	0,0005	4293	$< 2 \times 10^{-16}$

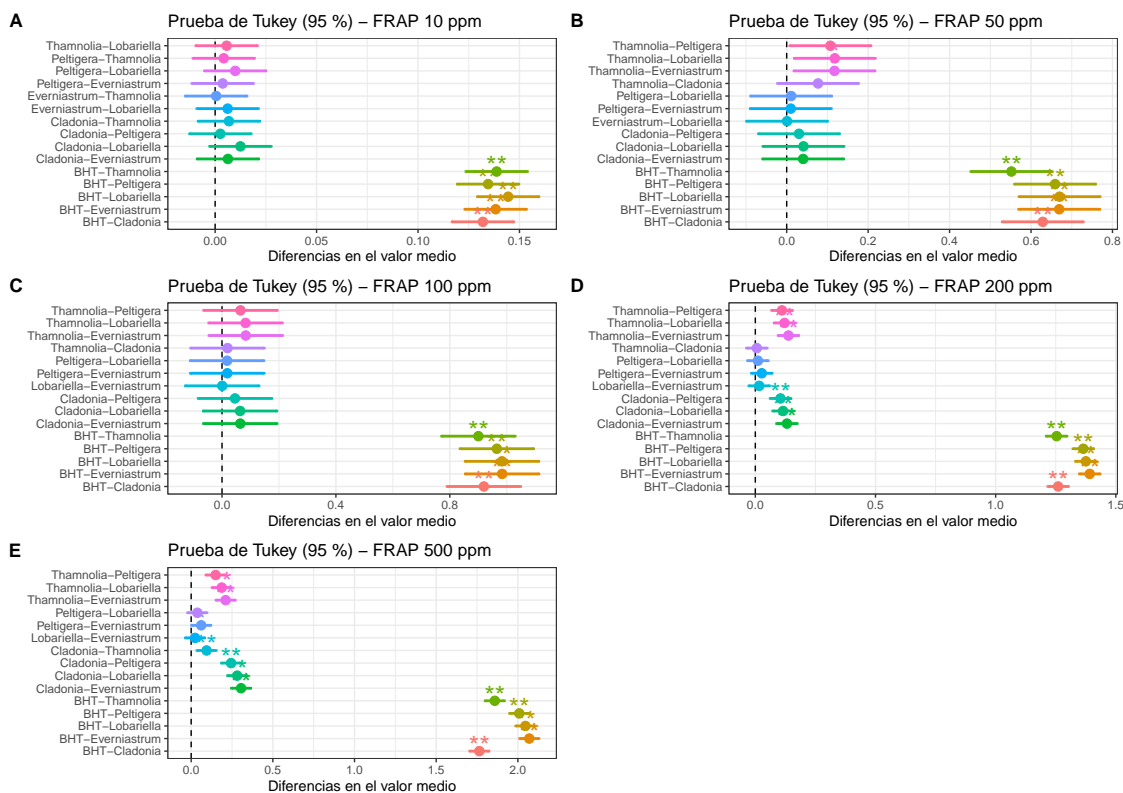


Figura E-4: Prueba de Tukey con nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para los ANOVA del ensayo de Poder Reductor Férrico - FRAP para los extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz. Los * representan los niveles de significancia en donde hay diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Sin símbolo, no hay diferencias.

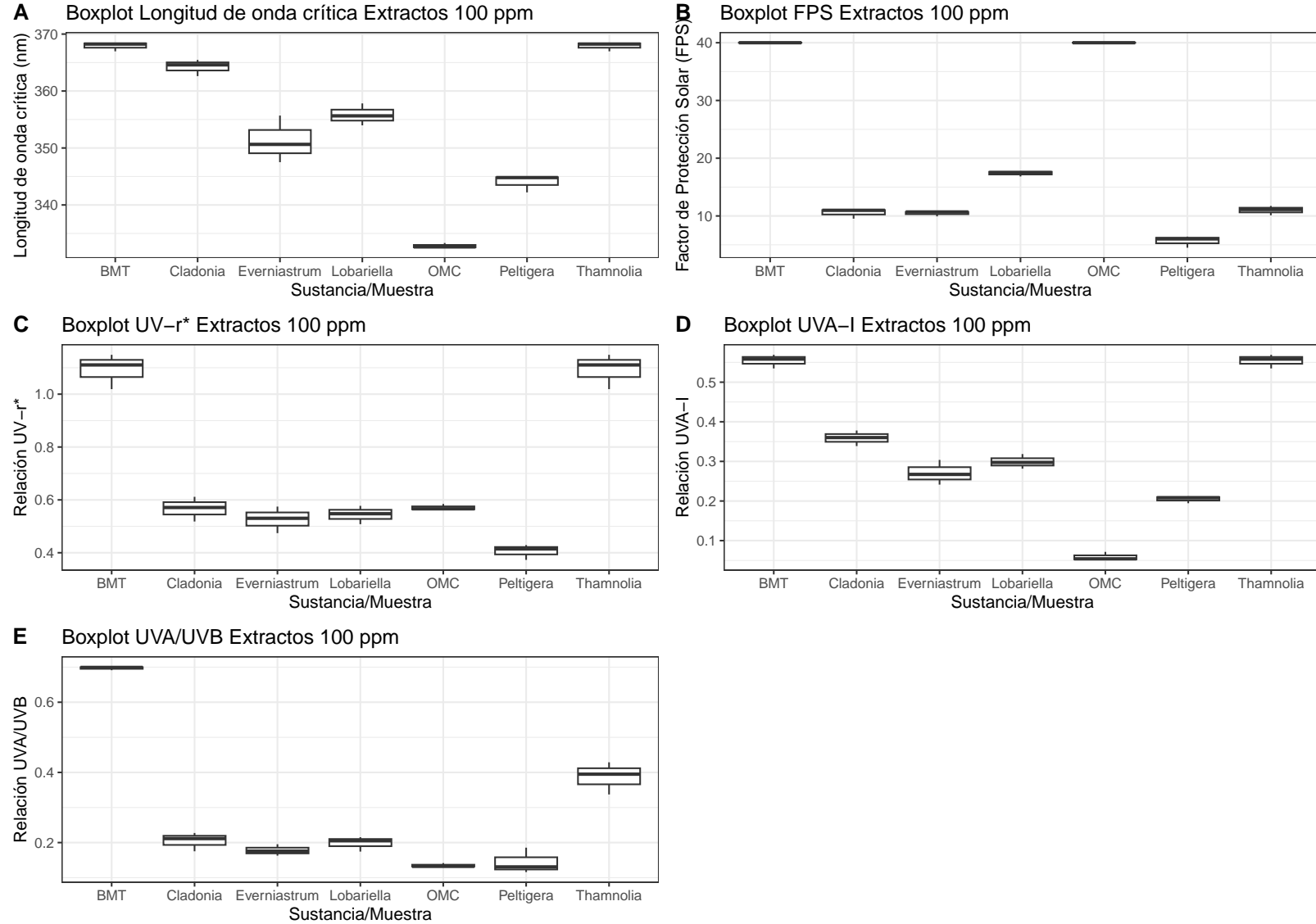


Figura E-5: Diagramas de caja para los parámetros de fotoprotección de algunos extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz y los patrones **BMT** y **OMC** - **EHMC**. **A.** Longitud de onda crítica (λ_{crit}) **B.** Factor de protección solar (**FPS**) **C.** Relación UV- r^* **D.** Relación UVA-I **E.** Relación UVA/UVB.

E. Análisis estadístico

Tabla E-6: Pruebas de comprobación de hipótesis de normalidad y homocedasticidad para los datos de fotoprotección obtenidos para distintos extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz y los patrones **BMT** y **OMC - EHMC**

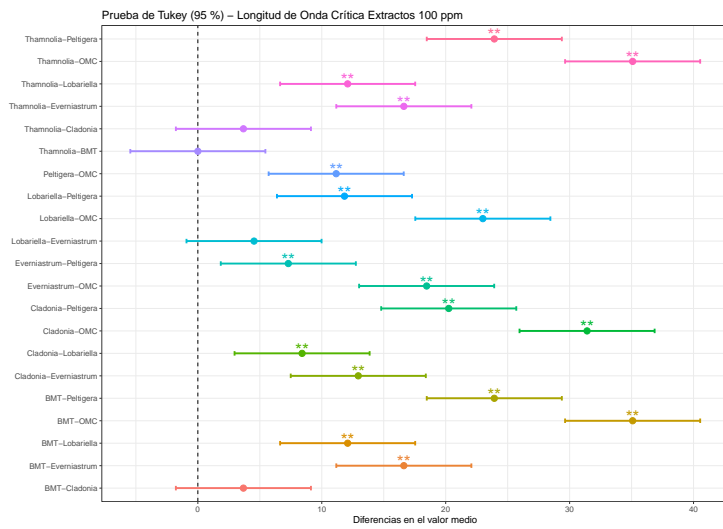
50 $\mu\text{g/mL}$			λ_{crit}	UV- r^*	R UVA/UVB	R UVA-I	FPS
Normalidad - Shapiro	BMT	Estadístico W	0,9988	0,8505	0,8505	0,9897	0,8811
		p-valor	0,9398	0,2418	0,2418	0,5026	0,3275
	OMC - EHMC	Estadístico W	0,9120	0,8304	0,8304	0,8740	0,8695
		p-valor	0,4248	0,1892	0,1892	0,3069	0,2941
	<i>Lobariella</i>	Estadístico W	0,8656	0,9221	0,9221	0,9441	0,8330
		p-valor	0,2831	0,4597	0,4597	0,5440	0,1959
	<i>Thamnolia</i>	Estadístico W	0,9170	0,9777	0,9777	0,9984	0,9956
		p-valor	0,4418	0,7137	0,7137	0,9234	0,8735
	<i>Everniastrum</i>	Estadístico W	0,9894	0,9858	0,9858	0,9573	0,9294
		p-valor	0,8033	0,7718	0,7718	0,6023	0,4863
	<i>Peltigera</i>	Estadístico W	0,7555	0,9000	0,9000	0,0760	0,9074
		p-valor	0,0521	0,3853	0,3853	0,0527	0,4094
	<i>Cladonia</i>	Estadístico W	0,9126	0,9519	0,9519	0,9337	0,9482
		p-valor	0,4268	0,5777	0,5777	0,5026	0,5614
Homocedasticidad	Barlett	Estadístico K	-	10,3070	10,3070	11,3160	4,5510
		p-valor	-	0,1123	0,1123	0,0791	0,6025
	Levene	Valor F	0,6866	0,8983	0,8983	0,4831	0,3383
		Pr > F	0,6639	0,5227	0,5227	0,8102	0,9052
100 $\mu\text{g/mL}$			λ_{crit}	UV- r^*	R UVA/UVB	R UVA-I	FPS
Normalidad - Shapiro	BMT	Estadístico W	0,8685	0,9468	0,9468	0,9549	1,0000
		p-valor	0,2911	0,5553	0,5553	0,5913	1,0000
	OMC - EHMC	Estadístico W	0,8762	0,8816	0,9954	0,8467	1,0000
		p-valor	0,3133	0,3292	0,8696	0,2315	1,0000
	<i>Lobariella</i>	Estadístico W	0,9940	0,9934	0,9952	0,9934	0,9247
		p-valor	0,8515	0,8451	0,8680	0,8446	0,4692
	<i>Thamnolia</i>	Estadístico W	0,8685	0,9468	0,9515	0,9549	0,9816
		p-valor	0,2911	0,5553	0,5758	0,5913	0,7400
	<i>Everniastrum</i>	Estadístico W	0,9818	0,9954	0,9915	0,9901	0,7535
		p-valor	0,7413	0,8699	0,8233	0,8100	0,0783
	<i>Peltigera</i>	Estadístico W	0,7833	0,9274	0,9992	0,9016	0,8957
		p-valor	0,0751	0,4788	0,9443	0,3907	0,3720
	<i>Cladonia</i>	Estadístico W	0,9521	0,9940	0,9920	0,9971	0,7878
		p-valor	0,5787	0,8520	0,8289	0,8971	0,0856
Homocedasticidad	Barlett	Estadístico K	10,2080	4,9502	5,8815	3,1295	-
		p-valor	0,1162	0,5502	0,4366	0,7924	-
	Levene	Valor F	1,1935	0,5319	0,5902	0,4920	0,7264
		Pr > F	0,3648	0,7754	0,7332	0,8039	0,6360

Se considera que se cumplen los supuestos estadísticos cuando NO se rechazan las hipótesis nulas (p-valor > 0,05).

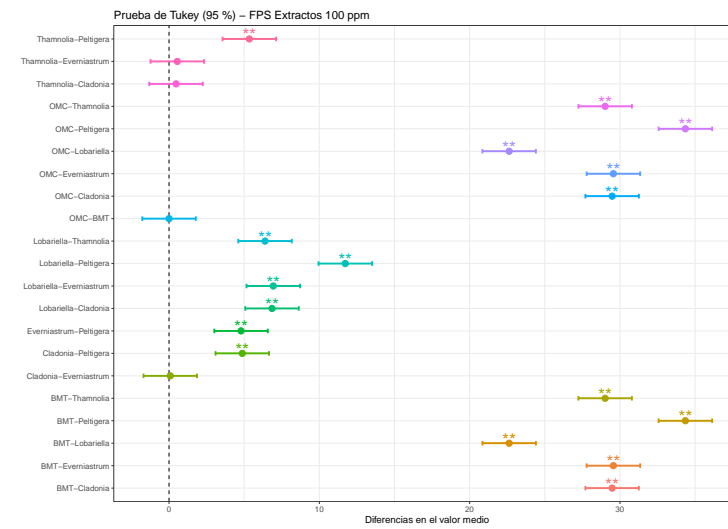
Tabla E-7: Resultados del ANOVA a una vía para los parámetros de fotoprotección de algunos extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz y los patrones **BMT & OMC - EHMC** a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Parámetro Fotoprotección	GL	GL Residual	Suma de Cuadrados	Residual	Error Cuadrado Medio	Residual	Valor F	Prob > F
λ_{crit}	6	14	3137,8	53,5	523,0	3,8	136,8	$1,3 \times 10^{-11}$
FPS			3815	6	635,8	0,4	1560	$< 2 \times 10^{-10}$
UV- r^*			1,4479	0,0316	0,2413	0,0023	106,9	$7,4 \times 10^{-11}$
R UVA/UVB			0,2072	0,0042	0,0345	0,0003	114,7	$4,4 \times 10^{-11}$
R UVA-I			0,5843	0,0051	0,0974	0,0004	269,7	$1,2 \times 10^{-14}$

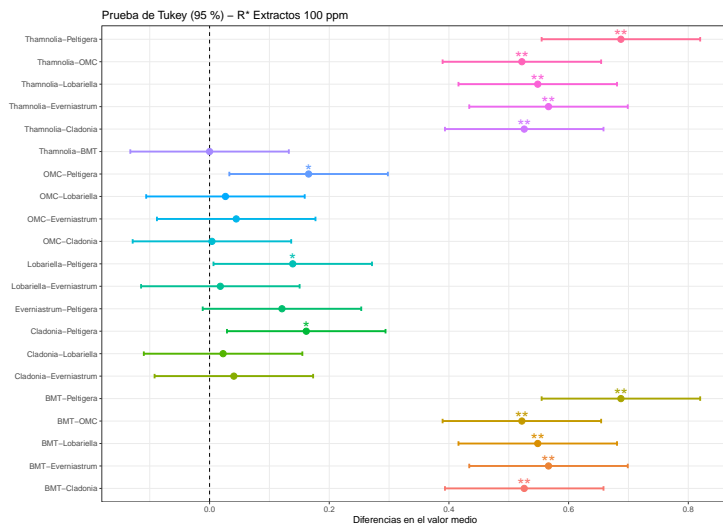
A



B



C



D

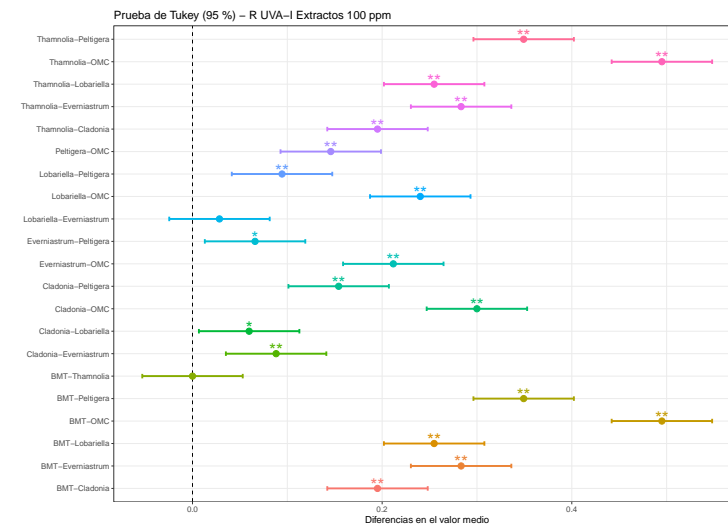


Figura E-6: Diagramas de Tukey para los parámetros de fotoprotección de algunos extractos de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz y los patrones BMT y OMC - EHMC. **A.** Longitud de onda crítica (λ_{crit}) **B.** Factor de protección solar (FPS) **C.** Relación UV- r^* **D.** Relación UVA-I

E. Análisis estadístico

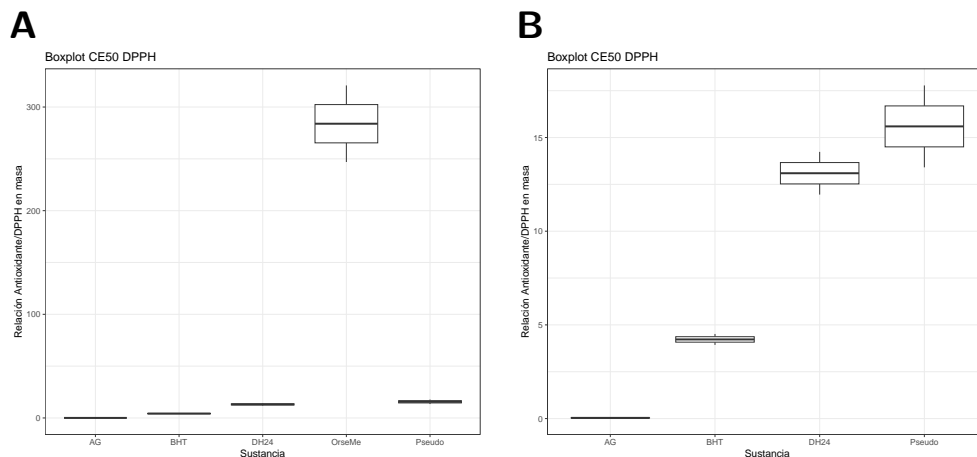


Figura E-7: Diagrama de caja de los datos del ensayo de determinación de la concentración efectiva media (CE_{50}) **DPPH** para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (**BHT & AG**). **A.** Incluye valor estimado del orselinato de metilo (**3**). **B.** Ampliación sin el compuesto **3**.

Tabla E-8: Pruebas de comprobación de hipótesis de normalidad y homocedasticidad para el ensayo de determinación de la concentración efectiva media (CE_{50}) de las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (**BHT & AG**).

Shapiro-Wilk	Normalidad		Homocedasticidad		
	Estadístico W	p-valor	Prueba de Bartlett	Estadístico K	p-valor
	0.89549	0.263		10,7419	0.01321

No se utilizaron los valores estimados del compuesto **3** en el **ANOVA**

Se aplicó un **ANOVA** de Welch sobre los datos transformados para establecer las diferencias entre grupos

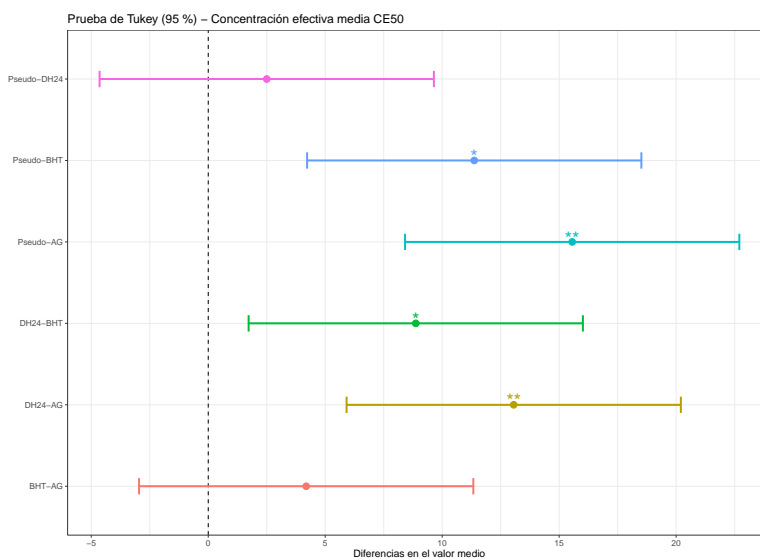


Figura E-8: Prueba de Tukey con nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para los **ANOVA** del ensayo de determinación de la concentración efectiva media (CE_{50}) ante el radical **DPPH** para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (**BHT & AG**). Los * representan los niveles de significancia en donde hay diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Sin símbolo, no hay diferencias.

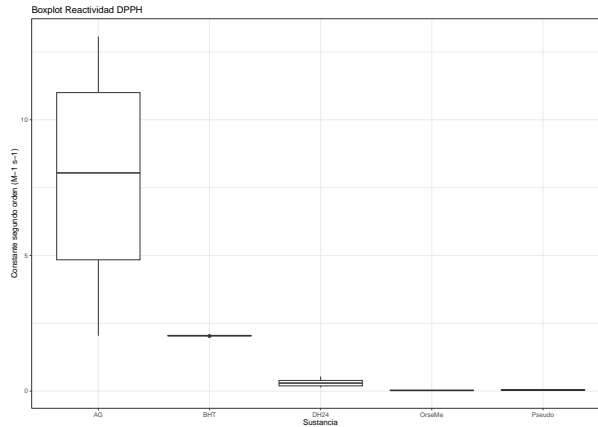


Figura E-9: Diagrama de caja de los datos de reactividad ante el radical **DPPH** para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (**BHT & AG**).

Tabla E-9: Pruebas de comprobación de hipótesis de normalidad y homocedasticidad para el ensayo de determinación de reactividad ante radicales libres de las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (**BHT & AG**).

Shapiro-Wilk	Normalidad				Bartlett	Homocedasticidad			
	Sin transformar		$\log_{10}(Constante)$			Sin transformar		$\log_{10}(Constante)$	
	Estadístico W	p-valor	Estadístico W	p-valor		Estadístico K	p-valor	Estadístico K	p-valor
	0,54911	$1,752 \times 10^{-7}$	0,92435	0,07292		105,4702	$6,725 \times 10^{-22}$	26,5574	$1,53 \times 10^{-4}$

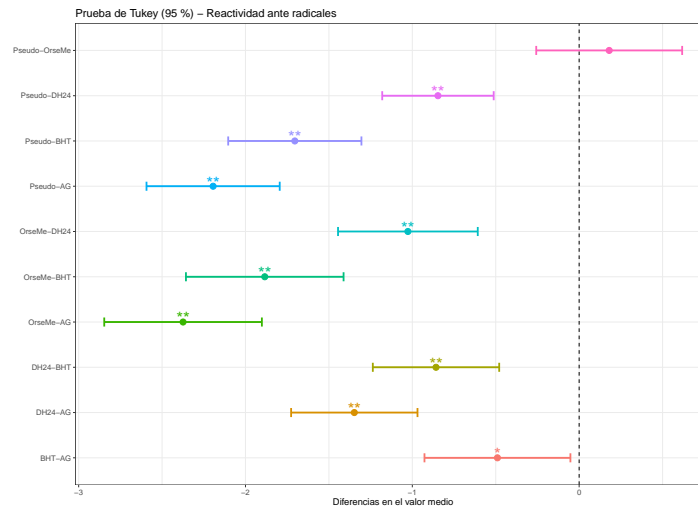


Figura E-10: Prueba de Tukey con nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para los **ANOVA** del ensayo de reactividad ante el radical **DPPH** para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (**BHT & AG**). Los * representan los niveles de significancia en donde hay diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Sin símbolo, no hay diferencias.

Tabla E-10: Resultados del **ANOVA** a una vía de Welch del ensayo de captación de radicales libres con el modelo **DPPH** para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii*

Ensayo	Numerador DF	Denominador DF	Valor F	Prob > F
CE ₅₀	3,000	1,667	71,833	0,02464
Reactividad	4,000	6,809	424,64	$3,02 \times 10^{-8}$

Se efectuó un **ANOVA** de Welch debido a que los datos presentaron no homogeneidad de varianzas.

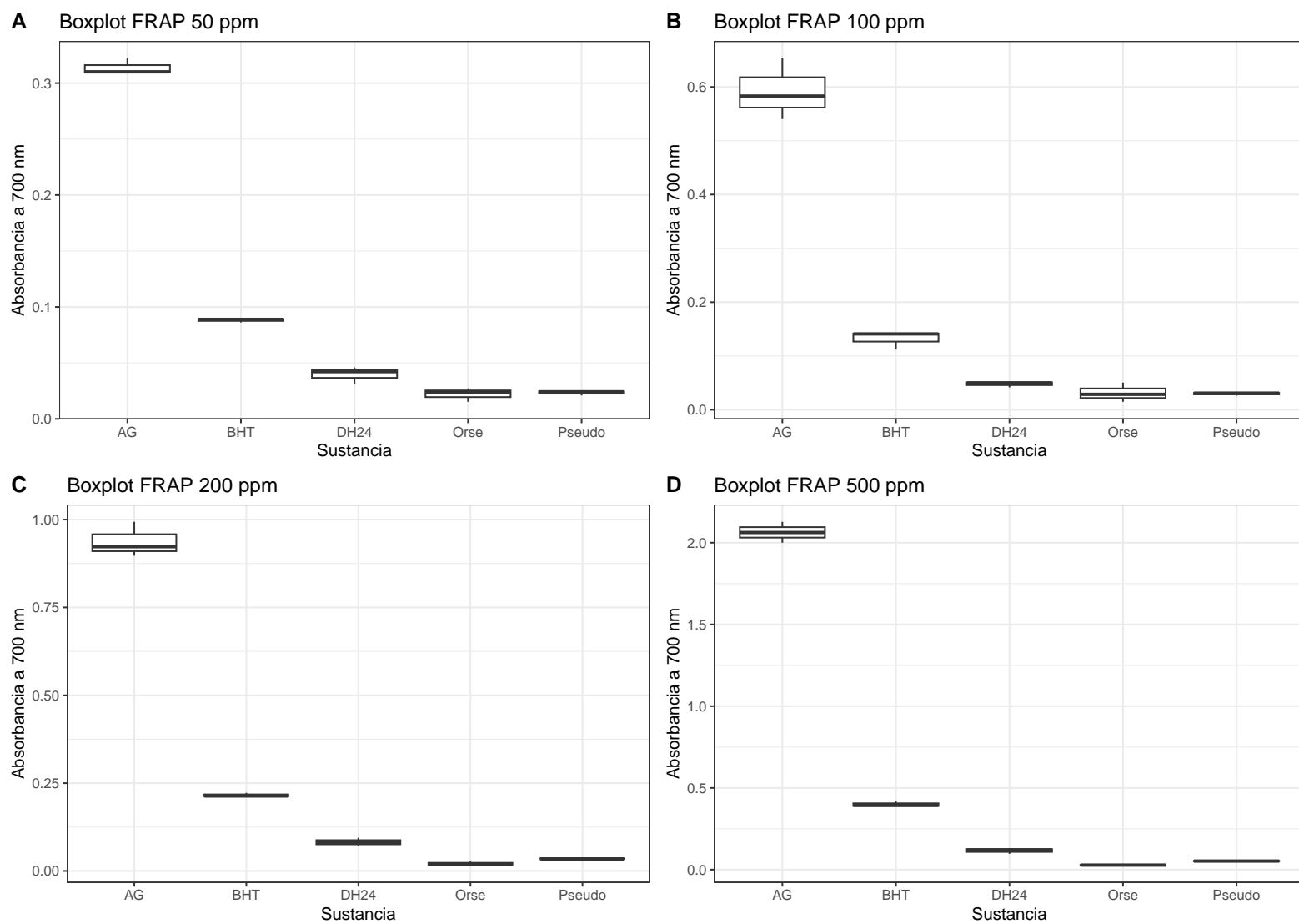


Figura E-11: Diagrama de caja de los datos del ensayo de poder reductor férrico de las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (BHT & AG). **A.** Ensayo a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm). **B.** 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **C.** 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **D.** 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla E-11: Valores de la prueba de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$) para evaluar la normalidad en el ensayo de poder reductor férrico de los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii* y los patrones (**BHT & AG**).

Sustancia	Parámetro	Concentración en el ensayo						
		50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$		200 $\mu\text{g/mL}$		500 $\mu\text{g/mL}$	
			Sin Transformar	$\log_{10}(Abs)$	Sin Transformar	\sqrt{Abs}	Sin Transformar	\sqrt{Abs}
AG	Estadístico W	0,8274146	0,9807113	0,9871423	0,931721	0,9344316	0,9998515	0,9999405
	p-valor	0,1817783	0,73389138	0,7829705	0,4950878	0,5054467	0,9767238	0,9852647
BHT	Estadístico W	0,8965874	0,78265315	0,7792458	0,8720169	0,8731852	0,9082112	0,9102977
	p-valor	0,3747199	0,07372606	0,06585908	0,3012695	0,3046158	0,4121373	0,4190739
1	Estadístico W	0,8622449	0,87684419	0,8676749	0,9423077	0,9459165	0,9956924	0,994171
	p-valor	0,2737737	0,31518158	0,2889463	0,5367371	0,5517415	0,8745614	0,8540443
2	Estadístico W	0,9230769	0,87753036	0,8673217	0,9910544	0,994469	0,9614755	0,9541674
	p-valor	0,4632629	0,31717794	0,2879515	0,819093	0,8578314	0,6226898	0,5879372
3	Estadístico W	0,9457989	0,9499818	0,9898999	0,8081269	0,7623625	0,8920385	0,8757173
	p-valor	0,5512455	0,5692213	0,807736	0,1340514	0,0274956	0,3605899	0,3119133

Se toma que la distribución de los datos es normal si el p-valor $> 0,05$

Tabla E-12: Valores de la prueba de Bartlett ($\alpha = 0,05$) para evaluar homocedasticidad del ensayo de poder reductor férrico de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii*.

Parámetro	Concentración en el ensayo						
	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$		200 $\mu\text{g/mL}$		500 $\mu\text{g/mL}$	
		Sin Transformar	$\log_{10}(Abs)$	Sin Transformar	\sqrt{Abs}	Sin Transformar	\sqrt{Abs}
Estadístico K	4,9108	13,8376	7,7420	16,2018	4,6633	12,7232	2,6660
p-valor	0,2966	0,00783	0,1015	0,00276	0,3236	0,01271	0,6152

Se aplicó la transformación de datos Box-Cox para los datos cuyo p-valor sin transformar fue menor a 0,05

Se considera que se cumple la condición de homocedasticidad (Varianzas iguales) si el p-valor $> 0,05$

Tabla E-13: Valores de la prueba de Levene ($\alpha = 0,05$ & $n - 1 = 4$) para evaluar homocedasticidad del ensayo de poder reductor férrico de los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii*

Estadístico	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$		200 $\mu\text{g/mL}$		500 $\mu\text{g/mL}$	
		Sin Transformar	$\log_{10}(Abs)$	Sin Transformar	\sqrt{Abs}	Sin Transformar	\sqrt{Abs}
Valor F	0,5029414	2,130452	1,560454	1,681986	0,5151898	2,449692	0,3814214
Prob $> F$	0,7348064	0,151412	0,2584858	0,2298774	0,7266284	0,1142123	0,8170741

Se considera que se cumple la condición de homocedasticidad (Varianzas iguales) si el Prob $> F > 0,05$

Tabla E-14: Resultados del ANOVA a una vía para el ensayo de poder reductor férrico de las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (**BHT & AG**).

Concentración	GL	GL Residual	Suma de Cuadrados	Residual	Error Cuadrado Medio	Residual	Valor F	Prob $> F$
50 $\mu\text{g/mL}$	4	10	0,18407	0,00032	0,04602	0,00003	1427	$9,79 \times 10^{-14}$
100 $\mu\text{g/mL}$			3,644	0,108	0,9109	0,0108	84,58	$1,14 \times 10^{-7}$
200 $\mu\text{g/mL}$			1,3380	0,0032	0,3345	0,0003	1037	$4,82 \times 10^{-13}$
500 $\mu\text{g/mL}$			3,286	0,004	0,8215	0,0004	1851	$2,68 \times 10^{-14}$

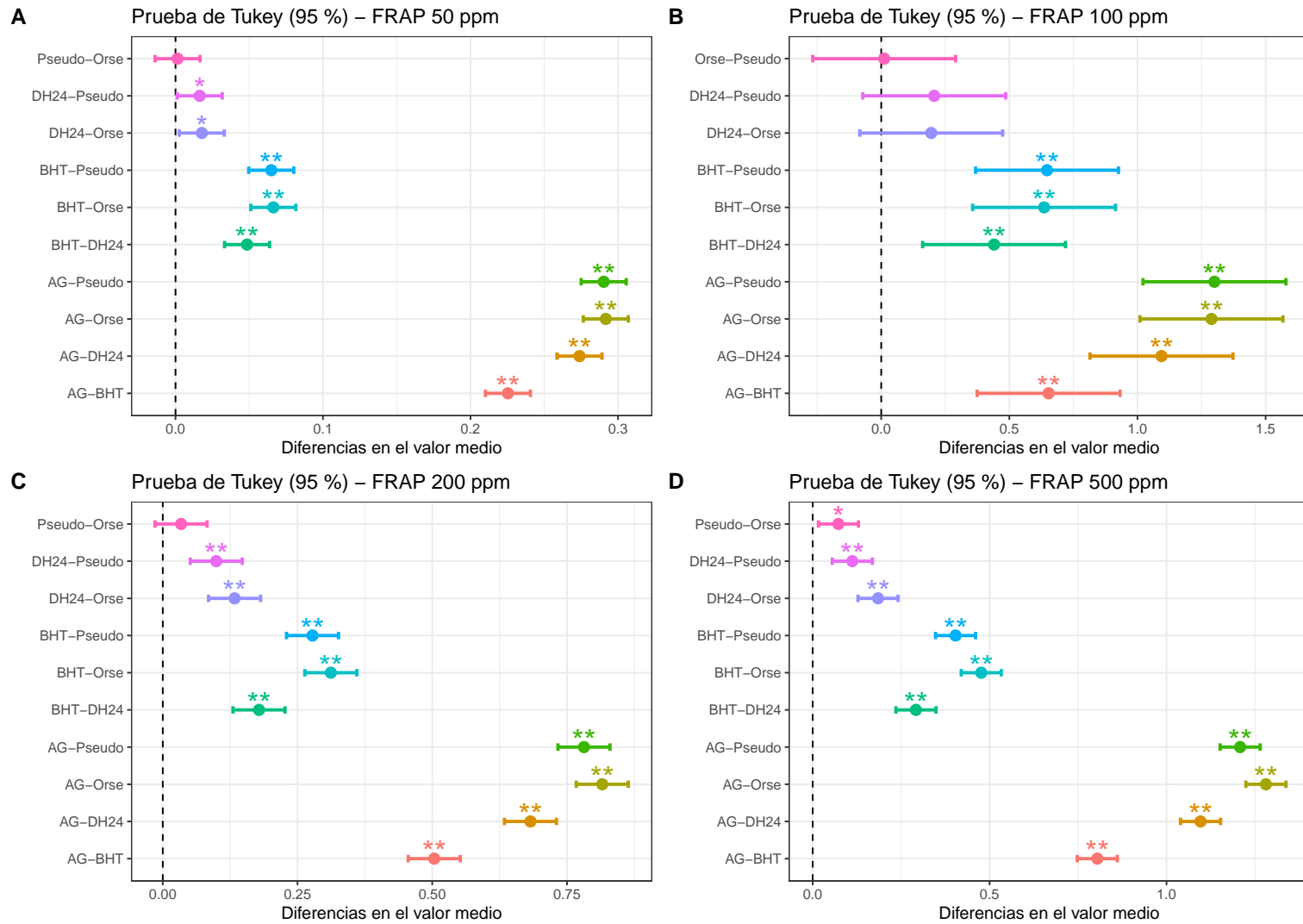


Figura E-12: Prueba de Tukey con nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para los ANOVA del ensayo de Poder Reductor Férrico - FRAP para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (BHT & AG). Los * representan los niveles de significancia en donde hay diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Sin símbolo, no hay diferencias. **A.** Ensayo a 50 $\mu\text{g/mL}$ (ppm). **B.** 100 $\mu\text{g/mL}$. **C.** 200 $\mu\text{g/mL}$. **D.** 500 $\mu\text{g/mL}$.

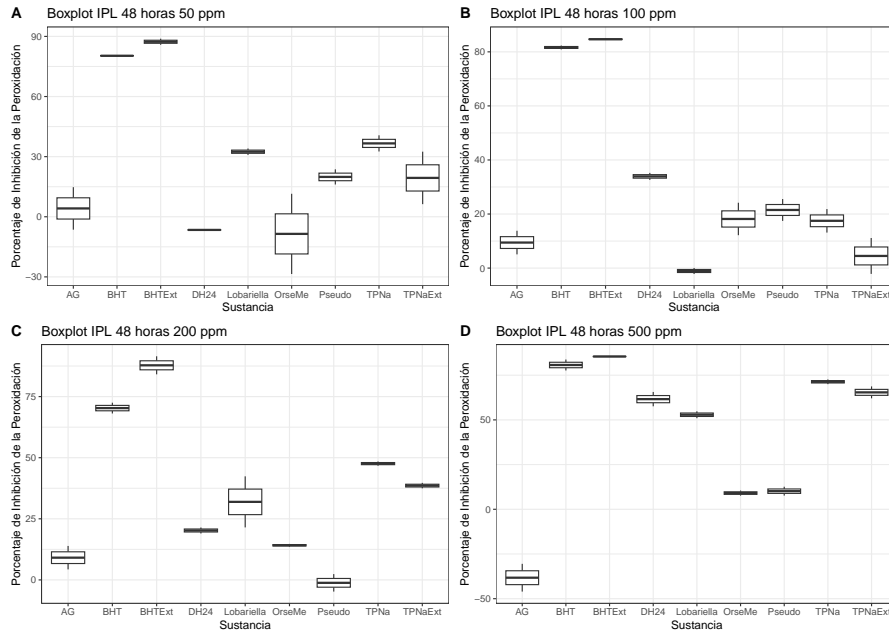


Figura E-13: Diagrama de caja de los datos de Inhibición de la peroxidación lipídica (IPL) a las 24 horas para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (BHT, AG & TPNa). A. Ensayo a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm). B. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. C. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. D. 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

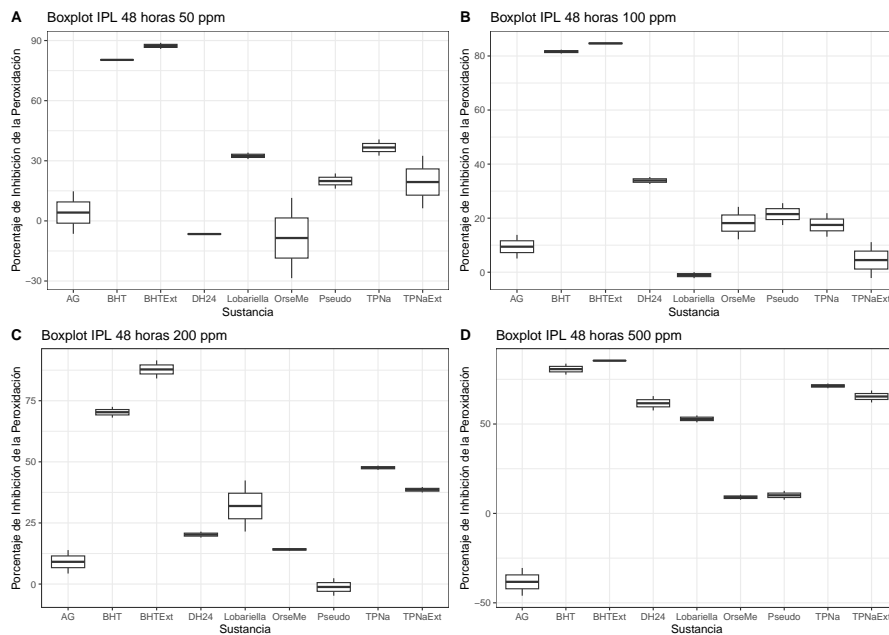


Figura E-14: Diagrama de caja de los datos de Inhibición de la peroxidación lipídica (IPL) a las 48 horas para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (BHT, AG & TPNa). A. Ensayo a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm). B. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. C. 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. D. 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

E. Análisis estadístico

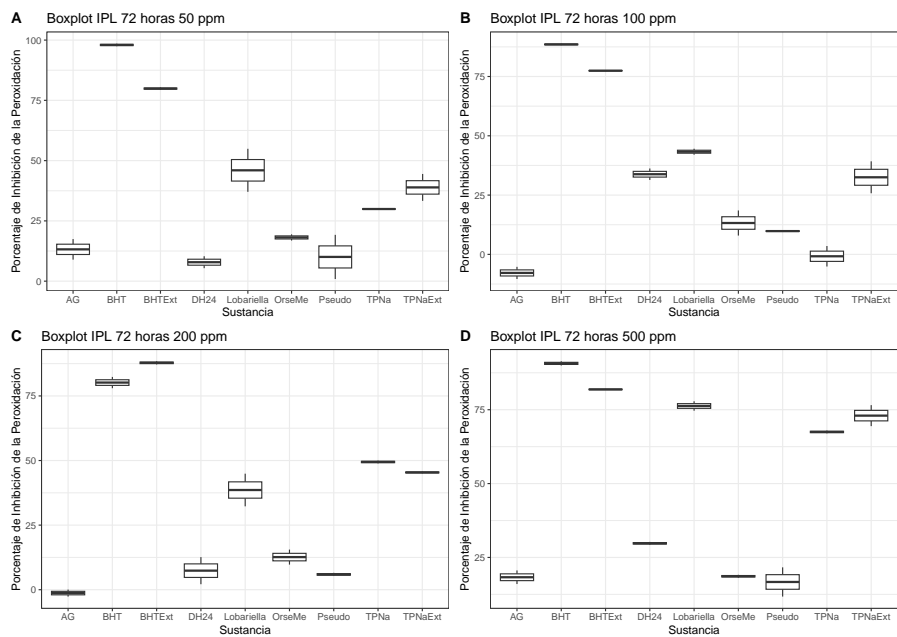


Figura E-15: Diagrama de caja de los datos de Inhibición de la peroxidación lipídica (IPL) a las 72 horas para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (BHT, AG & TPNa). **A.** Ensayo a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm). **B.** 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **C.** 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **D.** 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tabla E-15: Valores de las pruebas de comprobación de hipótesis estadísticas de normalidad (Shapiro-Wilk al 95 %) y homocedasticidad (Bartlett al 95 %) para inhibición de la peroxidación lipídica (IPL) de los compuestos aislados de *Lobariella sipmanii* y los patrones BHT, AG & TPNa.

24 horas										
Normalidad - Shapiro	50 ppm			100 ppm			200 ppm			500 ppm
	Sin transformar	Box Cox	Transformado	Sin transformar	Box Cox	Transformado	Sin transformar	Box Cox	Transformado	Sin transformar
Estadístico W	0.9318			0.8865		0.9346	0.8956		0.9296	0.9342
p-valor	0.2087			0.0336	IPL ^{2/3}	0.2337	0.0483	IPL ^{2/3}	0.1914	0.2304
Homocedasticidad - Bartlett										
Estadístico K	8.0952			7.5699		0.4808	11.8580		10.6240	12.6560
p-valor	0.4242			0.4766	IPL ^{2/3}	7.5290	0.1577	IPL ^{2/3}	0.2239	0.1243
48 horas										
Normalidad - Shapiro	50 ppm			100 ppm			200 ppm			500 ppm
	Sin transformar	Box Cox	Transformado	Sin transformar	Box Cox	Transformado	Sin transformar	Box Cox	Transformado	Sin transformar
Estadístico W	0.9221			0.8045		0.9393	0.9347		0.8577	0.9050
p-valor	0.1407			0.0018	IPL ^{2/5}	0.2813	0.2347		0.0112	IPL ^{4/3}
0.0701										0.0701
Homocedasticidad - Bartlett										
Estadístico K	12.7170			8.5288		12.0276	9.1618		7.9233	8.3319
p-valor	0.1332			0.3836	IPL ^{2/5}	0.1500	0.3288		0.4410	IPL ^{4/3}
0.4017										0.4017
72 horas										
Normalidad - Shapiro	50 ppm			100 ppm			200 ppm			500 ppm
	Sin transformar	Box Cox	Transformado	Sin transformar	Box Cox	Transformado	Sin transformar	Box Cox	Transformado	Sin transformar
Estadístico W	0.8761			0.9106		0.9127	0.8893		0.8360	0.9345
p-valor	0.0224	IPL ^{2/3}	0.2622	0.0881		0.0961	0.0375	IPL ^{2/3}	0.0051	IPL ^{3/5}
0.2238										0.2238
Homocedasticidad - Bartlett										
Estadístico K	12.8977			12.1305		10.2470	11.9322		10.8811	13.9868
p-valor	0.1154	IPL ^{2/3}	0.0543	0.1455		0.2481	0.1543		0.2085	IPL ^{3/5}
0.0821										0.0821

Se considera que se cumplen los supuestos para hacer el ANOVA si el p-valor > 0,05
Aquellos datos que requirieron transformación mediante Box Cox fue por problemas de normalidad

Tabla E-16: Resultados del ANOVA a una vía para el ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica (IPL) de las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (BHT & AG).

Ensayo a 24 horas									
Concentración	GL	GL Residual	Suma de Cuadrados	Residual	Error Cuadrado Medio	Residual	Valor F	Prob > F	
50 µg/mL	8	9	18181	447	2272,6	49,7	45,77	2,16 × 10 ⁻⁶	
100 µg/mL			261,51	13,07	32,69	1,45	22,5	4,45 × 10 ⁻⁵	
200 µg/mL			275,62	12,78	34,45	1,42	24,26	3,25 × 10 ⁻⁵	
500 µg/mL			12637	485	1579,6	53,9	29,31	1,46 × 10 ⁻⁵	
Ensayo a 48 horas									
50 µg/mL	8	9	19148	1441	2393,5	160,1	14,95	2,38 × 10 ⁻⁴	
100 µg/mL			44,79	2,55	5,598	0,284	19,74	7,66 × 10 ⁻⁵	
200 µg/mL			13690	334	1711,2	37,2	46,06	2,10 × 10 ⁻⁶	
500 µg/mL			273169	5006	34146	556	61,39	6,01 × 10 ⁻⁷	
Ensayo a 72 horas									
50 µg/mL	8	9	620,1	32,1	77,51	3,56	21,75	5,12 × 10 ⁻⁵	
100 µg/mL			17797	212	2224,6	23,6	94,28	9,11 × 10 ⁻⁸	
200 µg/mL			758,1	13,6	94,76	1,51	62,92	5,40 × 10 ⁻⁷	
500 µg/mL			262,94	2,65	32,87	0,29	111,5	4,33 × 10 ⁻⁸	

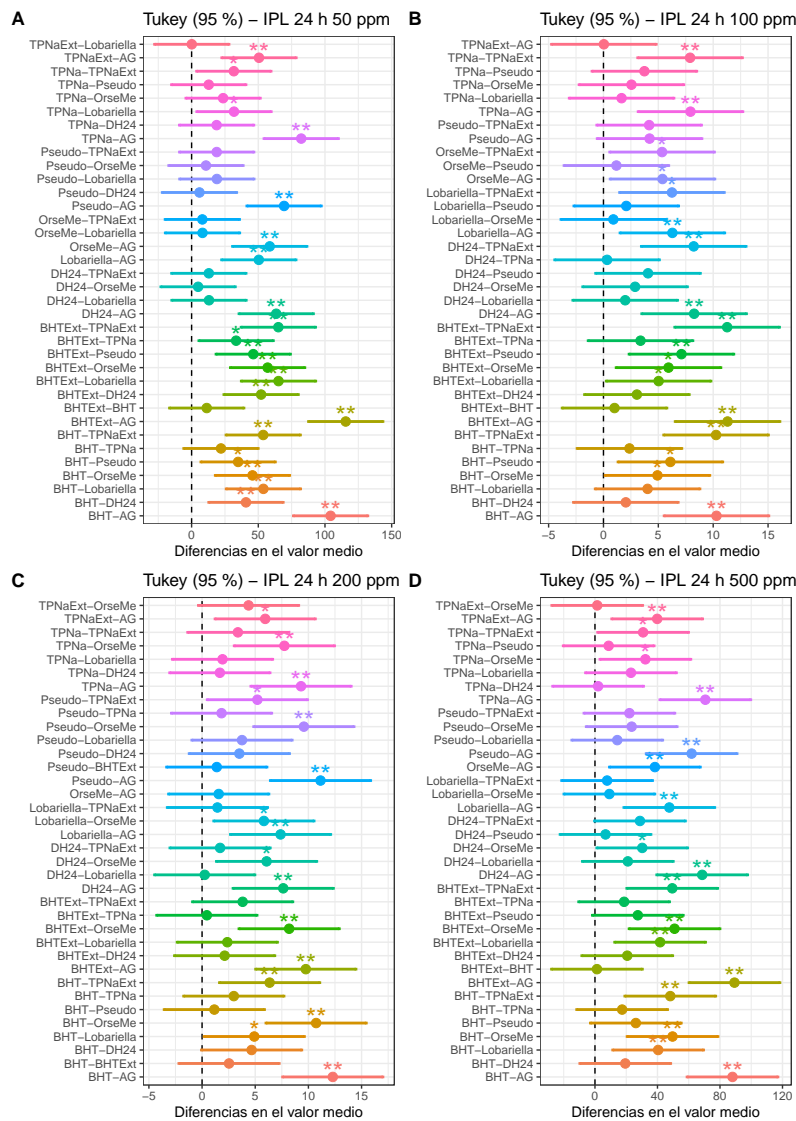


Figura E-16: Prueba de Tukey con nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para los ANOVA del ensayo de Inhibición de la Peroxidación Lipídica (IPL) a las 24 h para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (BHT, AG & TPNa). Los * representan los niveles de significancia en donde hay diferencias estadísticamente significativas: **p < 0,01; *p < 0,05; Sin símbolo, no hay diferencias. **A.** Ensayo a 50 µg/mL (ppm). **B.** 100 µg/mL. **C.** 200 µg/mL. **D.** 500 µg/mL.

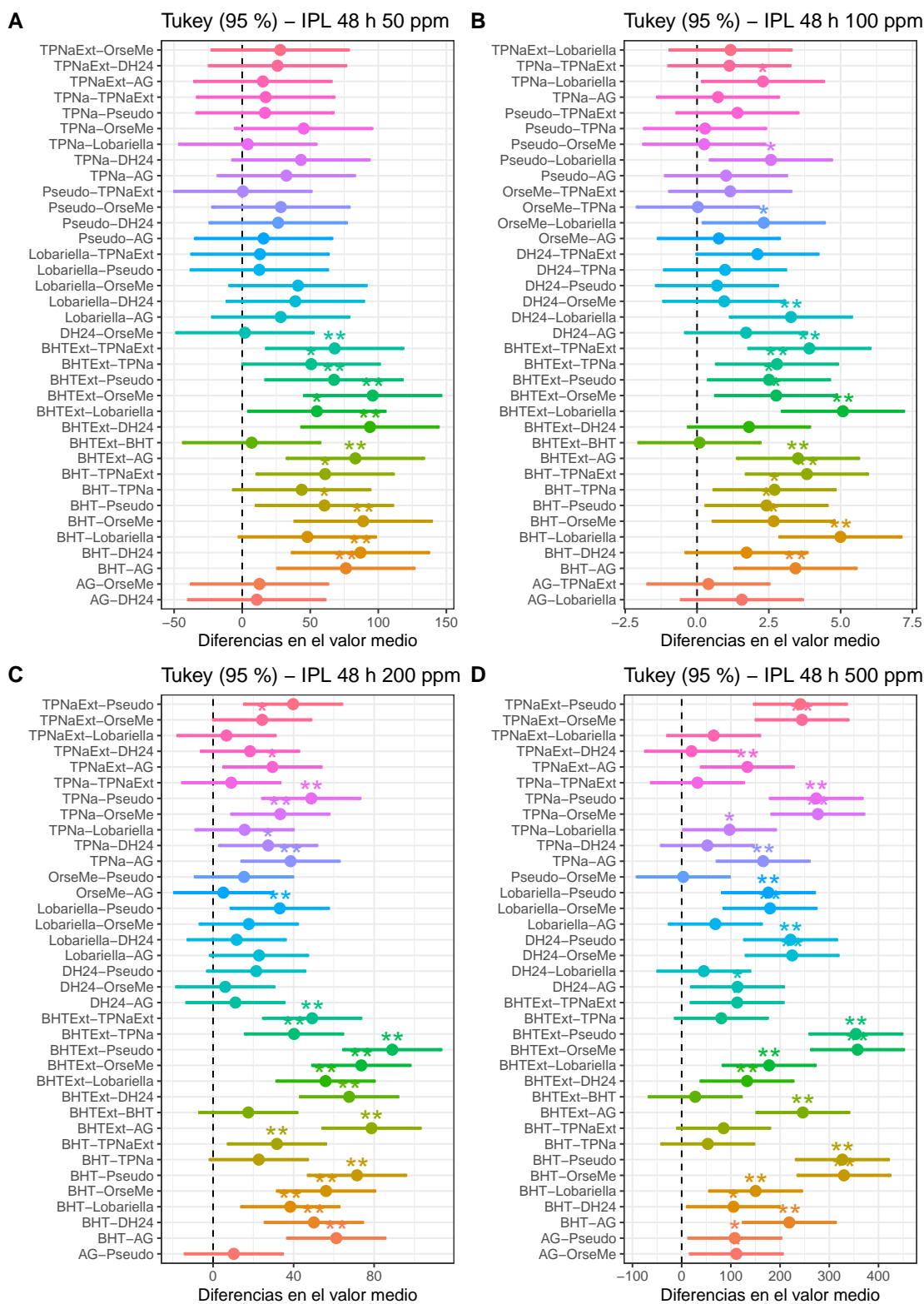


Figura E-17: Prueba de Tukey con nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para los ANOVA del ensayo de Inhibición de la Peroxidación Lipídica (IPL) a las 48 h para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (BHT, AG & TPNa). Los * representan los niveles de significancia en donde hay diferencias estadísticamente significativas: **p < 0,01; *p < 0,05; Sin símbolo, no hay diferencias. **A.** Ensayo a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm). **B.** 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **C.** 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **D.** 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

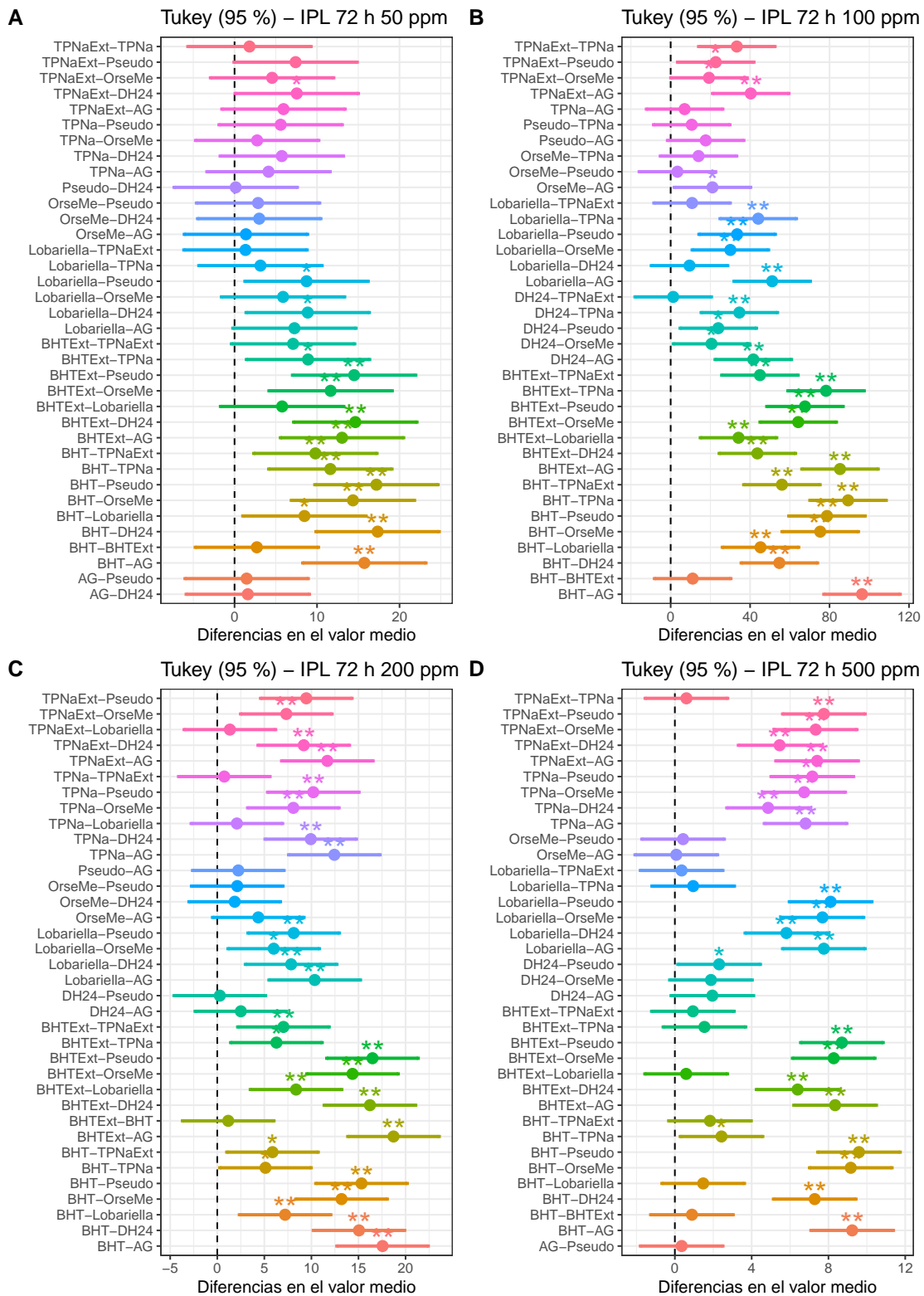


Figura E-18: Prueba de Tukey con nivel de significancia $\alpha = 0,05$ para los ANOVA del ensayo de Inhibición de la Peroxidación Lipídica (IPL) a las 72 h para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y los patrones (BHT, AG & TPNa). Los * representan los niveles de significancia en donde hay diferencias estadísticamente significativas: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; Sin símbolo, no hay diferencias. **A.** Ensayo a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ppm). **B.** 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **C.** 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **D.** 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

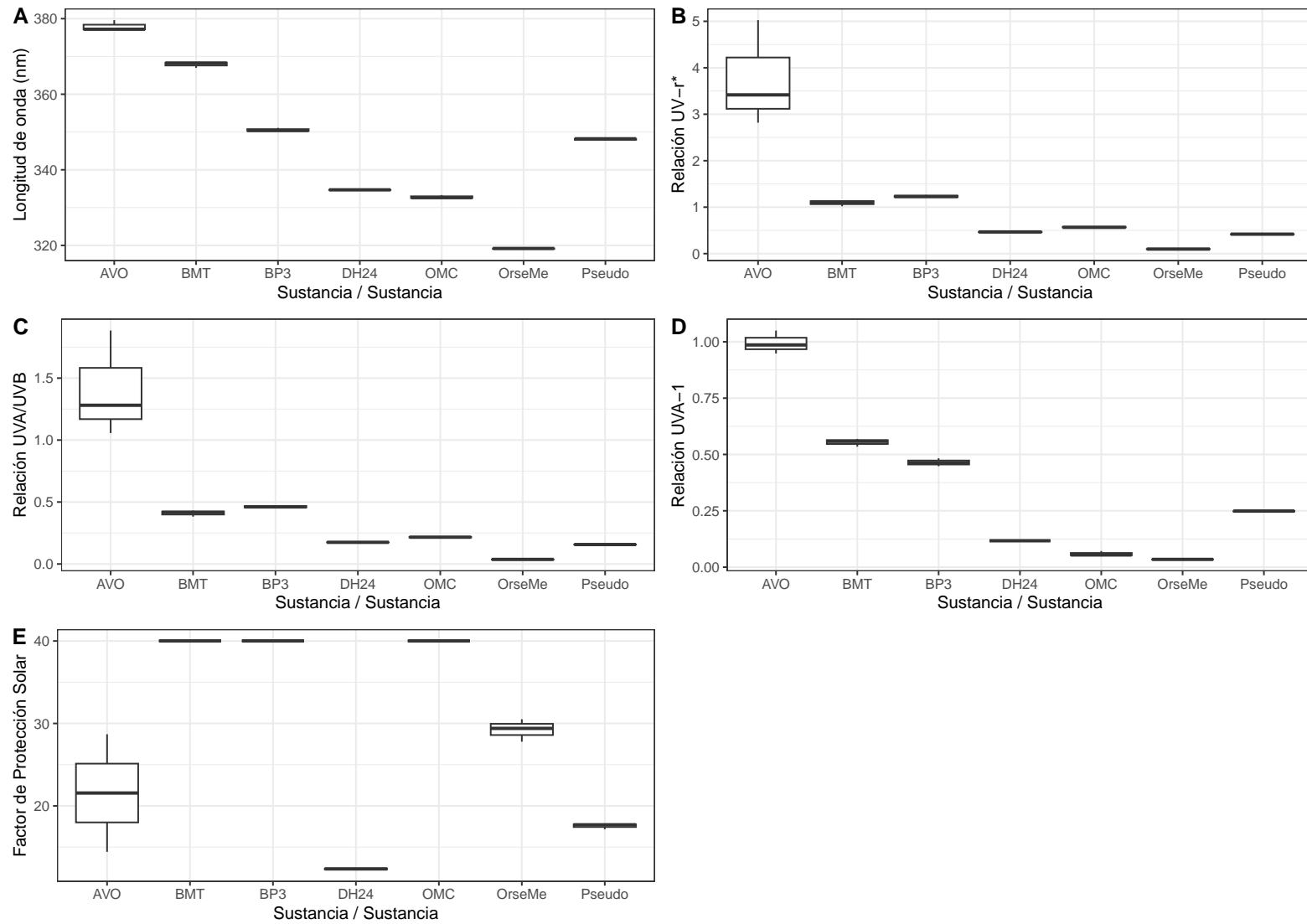


Figura E-19: Diagrama de caja de los datos de fotoprotección a 100µg/mL para las sustancias obtenidas de *Lobariella sipmanii* y cuatro filtros solares comerciales (AVO, BP-3, BEMT y OMC - EHMC).

Tabla E-17: Pruebas de comprobación de hipótesis de normalidad y homocedasticidad para los datos de fotoprotección obtenidos para los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* y los patrones **BMT** y **OMC - EHMC**

50 $\mu\text{g/mL}$			λ_{crit}	UV- r^*	R UVA/UVB	R UVA-I	FPS	$1/\sqrt{FPS}$
Normalidad - Shapiro	AVO	Estadístico W	0,9643	0,8079	0,8069	0,9643	1,0000	0,97945
		p-valor	0,6369	0,1336	0,1310	0,6369	0,9999	0,7252
	BMT	Estadístico W	0,9988	0,8505	0,8505	0,9988	0,8811	0,87964
		p-valor	0,9328	0,2418	0,2418	0,9328	0,3275	0,3233
	OMC - EHMC	Estadístico W	0,9120	0,8304	0,8304	0,9120	0,8695	0,8664
		p-valor	0,4248	0,1892	0,1892	0,4248	0,2941	0,2854
	1	Estadístico W	0,9709	0,8547	0,8421	0,9709	0,9959	0,9972
		p-valor	0,6725	0,2530	0,2196	0,6725	0,8777	0,8982
	2	Estadístico W	0,7500	0,7500	0,7500	0,7500	0,9231	0,9207
		p-valor	0,0501	0,0501	0,0501	0,0501	0,4633	0,4549
	3	Estadístico W	0,9643	0,9328	0,9283	0,9643	0,9984	0,9970
		p-valor	0,6329	0,4993	0,4822	0,6329	0,9240	0,8961
Homocedasticidad	Levene	Valor F	1,2606	1,2477	1,2415	0,6874	3,4200	2,8487
		Pr > F	0,3418	0,3469	0,3493	0,6423	0,0376	0,0638
100 $\mu\text{g/mL}$			λ_{crit}	UV- r^*	R UVA/UVB	R UVA-I	FPS	FPS ^{1,5}
Normalidad - Shapiro	AVO	Estadístico W	0,7800	0,9349	0,9346	0,9788	1,0000	0,9830
		p-valor	0,0675	0,5071	0,5060	0,7209	1,0000	0,7499
	BMT	Estadístico W	0,8685	0,9468	0,9468	0,9549	1,0000	1,0000
		p-valor	0,2911	0,5553	0,5553	0,5913	1,0000	0,9999
	BP3	Estadístico W	0,9067	0,9902	0,9891	0,9932	1,0000	1,0000
		p-valor	0,4072	0,8105	0,8002	0,8428	1,0000	0,9999
	OMC - EHMC	Estadístico W	0,8762	0,8816	0,9954	0,8467	1,0000	1,0000
		p-valor	0,3133	0,3292	0,8696	0,2315	1,0000	0,9999
	1	Estadístico W	0,7500	0,7500	0,8811	0,7865	0,8811	0,8820
		p-valor	0,0501	0,0501	0,3276	0,0827	0,3275	0,3303
	2	Estadístico W	0,7500	0,7500	0,9643	1,0000	0,9973	0,9974
		p-valor	0,0501	0,0501	0,6369	1,0000	0,8999	0,9023
3	Estadístico W	0,7894	0,9089	0,8811	0,9720	0,9889	0,9902	
	p-valor	0,0893	0,4144	0,3276	0,6788	0,7981	0,8103	
Homocedasticidad	Levene	Valor F	0,6217	2,3766	2,3733	2,1573	3,6242	2,8969
		Pr > F	0,7104	0,0854	0,0857	0,1107	0,0221	0,0514

Se considera que se cumplen los supuestos estadísticos cuando NO se rechazan las hipótesis nulas (p-valor > 0,05).

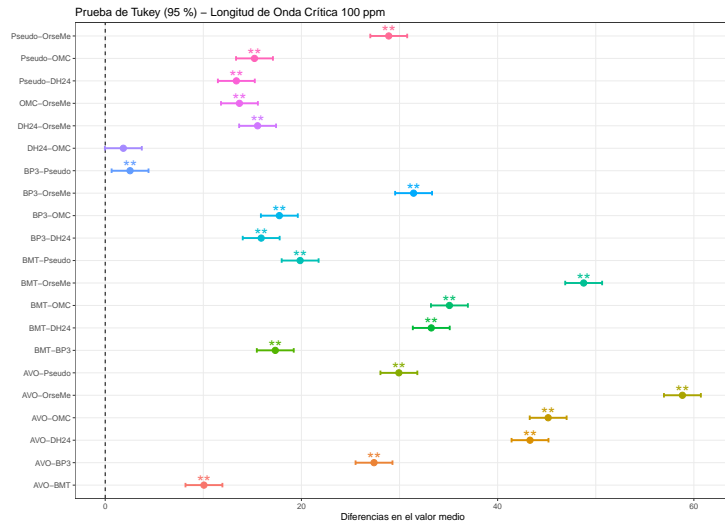
En la prueba de Levene se consideran 5 grados de libertad para los grupos y 12 en total para 50 $\mu\text{g/mL}$.

En la prueba de Levene se consideran 6 grados de libertad para los grupos y 14 en total para 100 $\mu\text{g/mL}$.

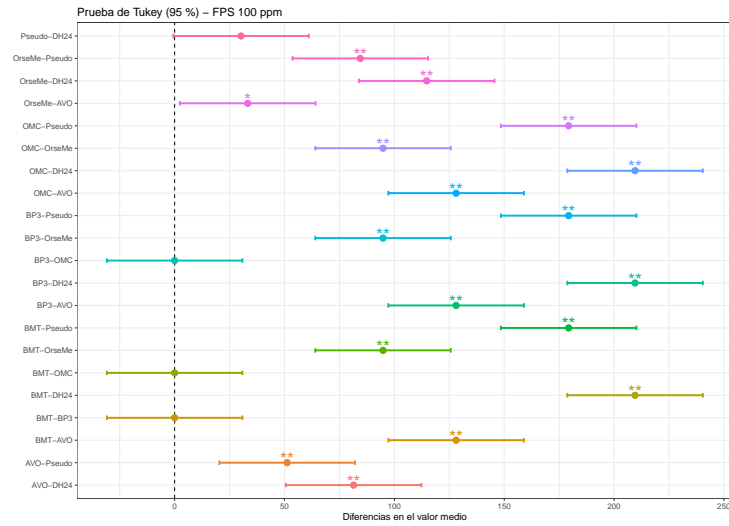
Tabla E-18: Resultados del ANOVA a una vía para los parámetros de fotoprotección de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* y los patrones **BMT**, **BP3** y **OMC - EHMC** a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Parámetro Fotoprotección	GL	GL Residual	Suma de Cuadrados	Residual	Error Cuadrado Medio	Residual	Valor F	Prob > F
λ_{crit}	6	14	7617	6	1269,4	0,5	2788	$< 2 \times 10^{-16}$
FPS	6	14	144011	1714	24002	122	196,1	$1,1 \times 10^{-12}$
UV- r^*	6	14	27,629	2,616	4,605	0,187	24,64	$1,1 \times 10^{-6}$
R UVA/UVB	6	14	3,882	0,367	0,6470	0,0262	24,65	$1,1 \times 10^{-6}$
R UVA-I	6	14	2,1579	0,0068	0,3597	0,0005	740,3	$< 2 \times 10^{-16}$

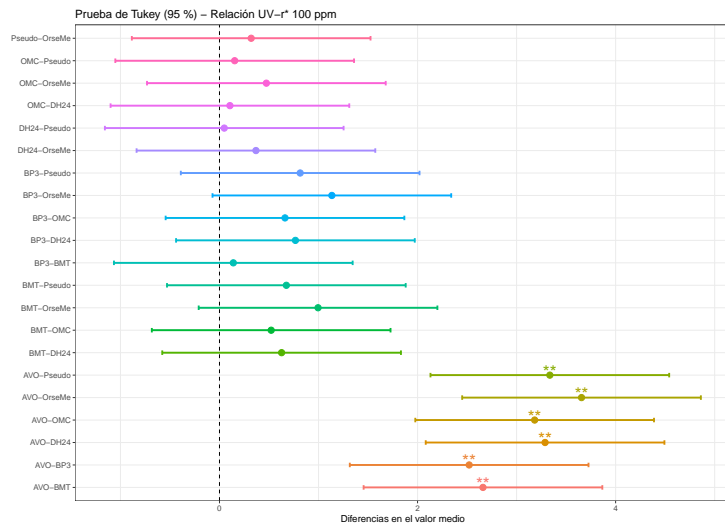
A



B



C



D

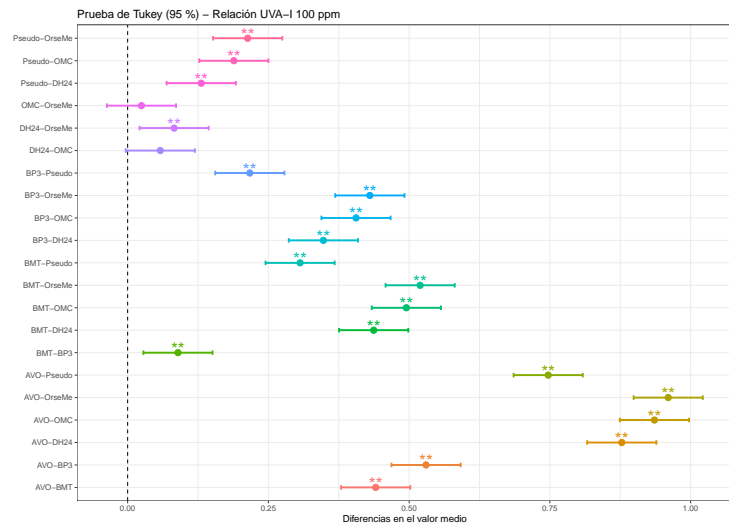


Figura E-20: Diagramas de Tukey para los parámetros de fotoprotección de los compuestos obtenidos de *Lobariella sipmanii* y los patrones BMT, BP3 & OMC - EPMC. **A.** Longitud de onda crítica (λ_{crit}) **B.** Factor de protección solar (FPS) **C.** Relación UV-r* **D.** Relación UVA-I

Referencias Bibliográficas

- Abbas, A.; Lichtman, A. & Pillai, S.: , 2017; *Cellular and Molecular Immunology*; Elsevier; 9^a edición; ISBN 9780323479783; URL <https://www.elsevier.com/books/cellular-and-molecular-immunology/abbas/978-0-323-47978-3>.
- Abla, M. J. & Banga, A. K.: , 2013; Quantification of skin penetration of antioxidants of varying lipophilicity; *International Journal of Cosmetic Science*; **35** (1): 19--26; doi:10.1111/j.1468-2494.2012.00728.x.
- Afonso, S.; Horita, K.; Sousa E Silva, J. P.; Almeida, I. F.; Amaral, M. H.; Lobão, P. A.; Costa, P. C.; Miranda, M. S.; Esteves Da Silva, J. C. & Sousa Lobo, J. M.: , 2014; Photodegradation of avobenzone: Stabilization effect of antioxidants; *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; **140**: 36--40; doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.07.004; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.004>.
- Aguirre, J.: , 2010; Diversidad y riqueza de los líquenes en la región natural andina o sistema cordillerano; en *Colombia Diversidad Biótica VI* (Editado por Rangel, J. O.); capítulo 6; Universidad Nacional de Colombia, Bogotá DC, Colombia; 1^a edición; págs. 337--391.
- Amorati, R.; Baschieri, A.; Morroni, G.; Gambino, R. & Valgimigli, L.: , 2016; Peroxyl Radical Reactions in Water Solution: A Gym for Proton-Coupled Electron-Transfer Theories; *Chemistry - A European Journal*; **22** (23): 7924--7934; doi:10.1002/chem.201504492.
- Angulo Castro, J. d. P.: , 2020; *Actividad fotoprotectora de Lobariella pallida, un líquen del páramo de Sumapaz*; Bsc tesis; Universidad Nacional de Colombia.
- Antolovich, M.; Prenzler, P. D.; Patsalides, E.; McDonald, S. & Robards, K.: , 2002; Methods for testing antioxidant activity.; *The Analyst*; **127** (1): 183--198; doi:10.1039/b009171p.
- Apak, R.: , 2019; Current Issues in Antioxidant Measurement; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **67** (33): 9187--9202; doi:10.1021/acs.jafc.9b03657; URL <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.9b03657>.
- Aptula, A. O.; Patlewicz, G. & Roberts, D. W.: , 2005; Skin sensitization: Reaction mechanistic applicability domains for structure-activity relationships; *Chemical Research in Toxicology*; **18** (9): 1420--1426; doi:10.1021/tx050075m.
- Atalay, F.; Halici, M. B.; Mavi, A.; Cakir, A.; Odabaşoğlu, F.; Kazaz, C.; Aslan, A. & Küfrevioğlu, Ö. I.: , 2011; Antioxidant phenolics from Lobaria pulmonaria (L.) Hoffm. and Usnea longissima Ach. Lichen species; *Turkish Journal of Chemistry*; **35**; doi:10.3906/kim-1008-847.
- Axelstad, M.; Boberg, J.; Hougaard, K. S.; Christiansen, S.; Jacobsen, P. R.; Mandrup, K. R.; Nellemann, C.; Lund, S. P. & Hass, U.: , 2011; Effects of pre- and postnatal exposure to the UV-filter Octyl Methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring; *Toxicology and Applied Pharmacology*; **250** (3): 278--290; doi:10.1016/j.taap.2010.10.031.
- Baby, A. R.; Balogh, T. S.; Pedriali, C. A.; Kaneko, T. M. & Velasco, M. V. R.: , 2009; UVA I-protection effectiveness of bioactive compound and organic UV filters: an in vitro assessment; *Química Nova*; **32** (5): 1321--1323; doi:10.1590/S0100-40422009000500039.
- Bačkorová, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J.; Jendželovský, R. & Fedoročko, P.: , 2011; Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid and gyrophoric acid; *Toxicology in Vitro*; **25** (1): 37--44; doi:10.1016/j.tiv.2010.09.004.
- Bačkorová, M.; Jendželovský, R.; Kello, M.; Bačkor, M.; Mikeš, J. & Fedoročko, P.: , 2012; Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines; *Toxicology in Vitro*; **26** (3): 462--468; doi:10.1016/j.tiv.2012.01.017.

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

- Baran, R. & Maibach, H.**, (Eds.): , 2010; *Textbook of Cosmetic Dermatology*; CRC Press; 4^a edición; ISBN 9780429110962; doi:10.3109/9781841847641; URL <https://www.taylorfrancis.com/books/9781841847641>.
- Berker, K. I.; Güçlü, K.; Tor, I. & Apak, R.**: , 2007; Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents; *Talanta*; **72** (3): 1157--1165; doi:10.1016/j.talanta.2007.01.019.
- Bernath, P. F.**: , 2005; *Spectra of Atoms and Molecules*; Oxford University Press, Oxford; 2^a edición; ISBN 978-0195177596.
- Bhattarai, H. D.; Paudel, B.; Hong, S. G.; Lee, H. K. & Yim, J. H.**: , 2008; Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents of lichens from Antarctica; *Journal of Natural Medicines*; **62** (4): 481--484; doi:10.1007/s11418-008-0257-9.
- Bintein, S.; Devillers, J. & Karcher, W.**: , 1993; Nonlinear Dependence Of Fish Bioconcentration On n-Octanol/Water Partition Coefficient; *SAR and QSAR in Environmental Research*; **1** (1): 29--39; doi:10.1080/10629369308028814.
- Björn, L. O.**: , 2008; *Photobiology*; Springer; ISBN 9780387726540; doi:10.1007/978-0-387-72655-7.
- Blois, M. S.**: , 1958; Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical; *Nature*; **181** (4617): 1199--1200; doi:10.1038/1811199a0; URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/1811199a0>.
- Blüthgen, N.; Zucchi, S. & Fent, K.**: , 2012; Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*); *Toxicology and Applied Pharmacology*; **263** (2): 184--194; doi:10.1016/j.taap.2012.06.008; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.06.008>.
- Bonda, C. A.**: , 2005; The photostability of organic sunscreen actives: A review; en *Sunscreens - Regulations and Commercial Development* (Editado por **Shaath, N.**); capítulo 17; CRC Press; 3^a edición; ISBN 9780429191190; págs. 322--349; doi:10.1201/b14170-25.
- Boustie, J. & Grube, M.**: , 2005; Lichens a promising source of bioactive secondary metabolites; *Plant Genetic Resources*; **3** (2): 273--287; doi:10.1079/PGR200572; URL <http://journals.cambridge.org/abstract/S1479262105000328>.
- Boustie, J.; Tomasi, S. & Grube, M.**: , 2011; Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source; *Phytochemistry Reviews*; **10** (3): 287--307; doi:10.1007/s11101-010-9201-1; URL <http://link.springer.com/10.1007/s11101-010-9201-1>.
- 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; doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5; URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>.
- CAC**: , 2016; Melanoma; en *Situación del cáncer en Colombia - 2015* (Editado por **González Díaz, J.; Lopes Junior, G. & Suarez Mattos, A.**); capítulo 18; Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, Bogotá DC; págs. 317 -- 330.
- Calcott, M. J.; Ackerley, D. F.; Knight, A.; Keyzers, R. A. & Owen, J. G.**: , 2018; Secondary metabolism in the lichen symbiosis; *Chemical Society Reviews*; **47** (5): 1730--1760; doi:10.1039/C7CS00431A; URL [http://feeds.rsc.org/\\$\sim\\$r/rss/CS/\\$\sim\\$3/u8G1EHLJrBU/C7CS00431Ahttp://xlink.rsc.org/?DOI=C7CS00431A](http://feeds.rsc.org/\simr/rss/CS/\sim3/u8G1EHLJrBU/C7CS00431Ahttp://xlink.rsc.org/?DOI=C7CS00431A).
- Carocho, M. & Ferreira, I. C.**: , 2013; A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives; *Food and Chemical Toxicology*; **51** (1): 15--25; doi:10.1016/j.fct.2012.09.021.
- Carve, M.; Nuggeoda, D.; Allinson, G. & Shimeta, J.**: , 2021; A systematic review and ecological risk assessment for organic ultraviolet filters in aquatic environments; *Environmental Pollution*; **268**: 115894; doi:10.1016/j.envpol.2020.115894; URL <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115894>.
- Castaño Uribe, C.**: , 2002; *Páramos y ecosistemas alto-andinos de Colombia en condición de Hot spot & Global Climatic Tensor*; IDEAM, Bogotá DC, Colombia; 1^a edición.
- Cernava, T.; Aschenbrenner, I. A.; Soh, J.; Sensen, C. W.; Grube, M. & Berg, G.**: , 2019; Plasticity of a holobiont: desiccation induces fasting-like metabolism within the lichen microbiota; *The ISME Journal*; **13** (2): 547--556; doi:10.1038/s41396-018-0286-7; URL <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-018-0286-7https://www.nature.com/articles/s41396-018-0286-7>.
- Chaparro de Valencia, M. & Aguirre, J.**: , 2002; *Hongos liquenizados*; Universidad Nacional de Colombia, Bogotá DC, Colombia; 1^a edición.
- Chapin III, F. S.; Matson, P. A. & Mooney, H. A.**: , 2002; *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*; Springer-Verlag, New York; 1^a edición.
- Chittiboyina, A. G.; Avonto, C.; Rua, D. & Khan, I. A.**: , 2015; Alternative Testing Methods for Skin Sensitization: NMR Spectroscopy for Probing the Reactivity and Classification of Potential Skin Sensitizers; *Chemical Research in Toxicology*; **28** (9): 1704--1714; doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00098.

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

- Cho, S.; Lee, M. J.; Kim, M. S.; Lee, S.; Kim, Y. K.; Lee, D. H.; Lee, C. W.; Cho, K. H. & Chung, J. H.: , 2008; Infrared plus visible light and heat from natural sunlight participate in the expression of MMPs and type I procollagen as well as infiltration of inflammatory cell in human skin in vivo; *Journal of Dermatological Science*; **50** (2): 123--133; doi:10.1016/j.jdermsci.2007.11.009.
- Cho, S.; Shin, M. H.; Kim, Y. K.; Seo, J.-E.; Lee, Y. M.; Park, C.-H. & Chung, J. H.: , 2009; Effects of Infrared Radiation and Heat on Human Skin Aging in vivo; *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*; **14** (1): 15--19; doi: 10.1038/jidsymp.2009.7; URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087002415305049>.
- Cockell, C. S. & Knowland, J.: , 1999; Ultraviolet radiation screening compounds.; *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*; **74** (3): 311--345; doi:10.1017/s0006323199005356.
- Corrales, J.; Kristofco, L. A.; Steele, W. B.; Saari, G. N.; Kostal, J.; Williams, E. S.; Mills, M.; Gallagher, E. P.; Kavanagh, T. J.; Simcox, N.; Shen, L. Q.; Melnikov, F.; Zimmerman, J. B.; Voutchkova-Kostal, A. M.; Anastas, P. T. & Brooks, B. W.: , 2017; Toward the Design of Less Hazardous Chemicals: Exploring Comparative Oxidative Stress in Two Common Animal Models; *Chemical Research in Toxicology*; **30** (4): 893--904; doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00246.
- Crawford, S. D.: , 2015; Lichens Used in Traditional Medicine; en *Lichen Secondary Metabolites - Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential* (Editado por Ranković, Branislav); capítulo 2; Springer, Heidelberg; págs. 27 -- 80.
- Craythorne, E. & Al-Niami, F.: , 2017; Skin cancer; *Medicine (United Kingdom)*; **45** (7): 431--434; doi:10.1016/j.mpmed.2017.04.003; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.04.003><https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357303917300932>.
- Cuatrecasas, J.: , 1958; Aspectos de la vegetación natural de Colombia; *Revista académica Colombiana de Ciencias Exactas*; **10**: 221--264; URL <https://books.google.com.co/books?id=xLPHMAAACA>J.
- Culverson, C. F. & Kristinsson, H.-D.: , 1970; A standardized method for the identification of lichen products; *Journal of Chromatography*; **46**: 85 -- 93; doi:10.1016/S0021-9673(00)83967-9.
- Davies, A. M. C. & Grant, A.: , 1987; Review: Near infra-red analysis of food; *International Journal of Food Science & Technology*; **22** (3): 191--207; doi:10.1111/j.1365-2621.1987.tb00479.x; URL <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1987.tb00479.x>.
- De Gálvez, M. V.: , 2010; Antioxidants in Photoprotection: Do They Really Work?; *Actas Dermo-Sifiligráficas (English Edition)*; **101** (3): 197--200; doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S1578-2190\(10\)70617-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1578-2190(10)70617-X); URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S157821901070617X>.
- DeVito, S. C.: , 2016; On the design of safer chemicals: a path forward; *Green Chem.*; **18**: 4332--4347; doi:10.1039/C6GC00526H; URL <http://dx.doi.org/10.1039/C6GC00526H>.
- Dias-Ferreira, J.; Fernandes, A. R.; Soriano, J. L.; Naveros, B. C.; Severino, P.; da Silva, C. F. & Souto, E. B.: , 2020; Skin rejuvenation: Biopolymers applied to UV sunscreens and sheet masks; *Biopolymer Membranes and Films: Health, Food, Environment, and Energy Applications*: 309--330; doi:10.1016/B978-0-12-818134-8.00013-4.
- Diffey, B. & Cadars, B.: , 2016; An appraisal of the need for infrared radiation protection in sunscreens; *Photochemical & Photobiological Sciences*; **15** (3): 361--364; doi:10.1039/c5pp00451a; URL www.rsc.org/ppshttps://link.springer.com/10.1039/c5pp00451a.
- Diffey, B. L.: , 1994; A method for broad-spectrum classification of sunscreens; *Int J Cosmet Sci*; **16**: 47--52.
- Divkovic, M.; Pease, C. K.; Gerberick, G. F. & Basketter, D. A.: , 2005; Hapten-protein binding: From theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization; *Contact Dermatitis*; **53** (4): 189--200; doi:10.1111/j.0105-1873.2005.00683.x.
- Duarte, A. F.; Sousa-Pinto, B.; Freitas, A.; Delgado, L.; Costa-Pereira, A. & Correia, O.: , 2018; Skin cancer healthcare impact: A nation-wide assessment of an administrative database; *Cancer Epidemiology*; **56** (August): 154--160; doi:10.1016/j.canep.2018.08.004; URL <https://doi.org/10.1016/j.canep.2018.08.004>.
- Dutra, E. A.; Almança, D.; Kedor, E. R. M.; Inês, M. & Miritello, R.: , 2004; Determination of sun protection factor (SPF) of sunscreens by ultraviolet spectrophotometry; *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas*; **40** (1): 381--385.
- Federal Drug Administration: , 2019; Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use; URL <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2019-02-26/pdf/2019-03019.pdf>.
- Fernández-Moriano, C.; Gómez-Serranillos, M. P. & Crespo, A.: , 2016; Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review; *Pharmaceutical Biology*; **54** (1): 1--17; doi:10.3109/13880209.2014.1003354; URL <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2014.1003354>.
- Garoli, D.; Pelizzo, M. G.; 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; doi:10.1016/j.jdermsci.2008.06.010.

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

- Gaspar, L. R.; Tharmann, J.; Maia Campos, P. M. & Liebsch, M.:** , 2012; Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate; *Toxicology in Vitro*; **27** (1): 418--425; doi:10.1016/j.tiv.2012.08.006; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.006>.
- Gasparro, F. P.:** , 2000; Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: The need for UVA protection and evaluation of efficacy; *Environmental Health Perspectives*; **108** (SUPPL. 1): 71--78; doi:10.1289/ehp.00108s171.
- GBIF:** , 2022; Genus *Lobariella* - Yoshimura, 2002; URL <https://www.gbif.org/species/2601533>.
- Gilbert, E.; Piro, F.; Bertholle, V.; Roussel, L.; Falson, F. & Padois, K.:** , 2013; Commonly used UV filter toxicity on biological functions: Review of last decade studies; *International Journal of Cosmetic Science*; **35** (3): 208--219; doi:10.1111/ics.12030.
- Gómez Serranillos, M. P.; Fernández Moriano, C.; González Burgos, E.; Divakar, P. K. & Crespo, A.:** , 2014; Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features; *RSC Advances*; **4** (103): 59017--59047; doi:10.1039/C4RA09104C; URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA09104C>.
- Gonzalez, S. & Gilaberte-Calzada, Y.:** , 2008; Oral and other non-sunscreen photoprotective agents; en *Clinical Guide to Sunscreens and Photoprotection* (Editado por Lim, H. W. & Draeos, Z. D.); capítulo 16; Informa Healthcare, New York, USA; 1ª edición; págs. 207--222.
- Gorouhi, F. & Maibach, H. I.:** , 2009; Role of topical peptides in preventing or treating aged skin; *International Journal of Cosmetic Science*; **31** (5): 327--345; doi:10.1111/j.1468-2494.2009.00490.x.
- Grether-Beck, S. & Krutmann, J.:** , 2009; Involvement of Lipid Rafts and Caveolins in UVA Signaling; *The Open Dermatology Journal*; **3** (1): 166--172; doi:10.2174/1874372200903010166; URL <http://benthamopen.com/ABSTRACT/TODJ-3-166>.
- Grether-Beck, S.; Marini, A.; Jaenicke, T. & Krutmann, J.:** , 2014; Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation; *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*; **30** (2-3): 167--174; doi:10.1111/phpp.12111.
- Grice, H. C.:** , 1988; Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium; *Food and Chemical Toxicology*; **26** (8): 717--723; doi:10.1016/0278-6915(88)90072-5.
- Gritzner, C. F.:** , 2007; *Polar Regions*; Chelsea House Publishers.
- Gutteridge, J. M. & Halliwell, B.:** , 1990; The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems; *Trends in Biochemical Sciences*; **15** (4): 129--135; doi:10.1016/0968-0004(90)90206-Q; URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/096800049090206Q>.
- Guy, R. H. & Hadgraft, J.:** , 2002; *Transdermal Drug Delivery*; CRC Press; ISBN 9780429221996; doi:10.1201/9780203909683; URL <https://www.taylorfrancis.com/books/9780203909683>.
- Halliwell, B.:** , 1995; Antioxidant characterization. Methodology and mechanism; *Biochemical Pharmacology*; **49** (10): 1341--1348; doi:10.1016/0006-2952(95)00088-H.
- Halliwell, B. & Chirico, S.:** , 1993; Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance; *The American Journal of Clinical Nutrition*; **57** (5): 715S--725S; doi:10.1093/ajcn/57.5.715S; URL <https://academic.oup.com/ajcn/article/57/5/715S/4715946>.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M.:** , 1990; Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview; *Methods in Enzymology*; **186** (C): 1--85; doi:10.1016/0076-6879(90)86093-B.
- Helfrich, Y. R.; Sachs, D. L. & Voorhees, J. J.:** , 2008; Overview of skin aging and photoaging; *Dermatology nursing / Dermatology Nurses' Association*; **20** (3): 177--184.
- Herrmann, K. & Trinkkeller, U.:** , 2015; *Dermatologie und medizinische Kosmetik*; Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg; ISBN 978-3-662-45115-1; doi:10.1007/978-3-662-45116-8; URL <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-45116-8>.
- Heurung, A. R.; Raju, S. I. & Warshaw, E. M.:** , 2014; Adverse reactions to sunscreen agents: Epidemiology, responsible irritants and allergens, clinical characteristics, and management; *Dermatitis*; **25** (6): 289--326; doi:10.1097/DER.000000000000079.
- 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; doi:10.1016/j.ijpharm.2011.01.040.
- Horton, L.; Brady, J.; Kincaid, C. M.; Torres, A. E. & Lim, H. W.:** , 2023; The effects of infrared radiation on the human skin; *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*; **00** (March): 1--7; doi:10.1111/phpp.12899.
- Huang, D.; Boxin, O. U. & Prior, R. L.:** , 2005; The chemistry behind antioxidant capacity assays; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **53** (6): 1841--1856; doi:10.1021/jf030723c.

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

- Huang, Y.; Law, J. C. F.; Lam, T. K. & Leung, K. S. Y.: , 2021; Risks of organic uv filters: a review of environmental and human health concern studies; *Science of The Total Environment*; **755**: 142486; doi:10.1016/J.SCITOTENV.2020.142486.
- Hüneck, S.: , 1973; Nature of lichen substances; en *The lichens* (Editado por Ahmadjian, V.); capítulo 15; Academic Press, New York; 1ª edición; ISBN 0120449501; págs. 495 -- 522.
- Hüneck, S.: , 1984; Pseudocyphellarins A and B two fully substituted depsides from the lichen Pseudocyphellaria endochrysea; *Phytochemistry*; **23** (2): 431--434; doi:10.1016/S0031-9422(00)80346-5; URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942200803465>.
- Hüneck, S.: , 1999; The significance of lichens and their metabolites; *Naturwissenschaften*; **86** (12): 559--570; doi:10.1007/s001140050676.
- Hüneck, S. & Yoshimura, I.: , 1996; *Identification of lichen substances*; Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Stuttgart; 1ª edición.
- Huong, S. P.; Andrieu, V.; Reynier, J. P.; Rocher, E. & Fourneron, J. D.: , 2007; The photoisomerization of the sunscreen ethylhexyl p-methoxy cinnamate and its influence on the sun protection factor; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*; **186** (1): 65--70; doi:10.1016/j.jphotochem.2006.07.012.
- IDEAM: , 2014; Atlas IDEAM - Mapa de Radiación UV de Colombia; URL <http://atlas.ideam.gov.co/visorAtlasRadiacion.html>.
- IDEAM - UPME: , 2005; *Atlas de Radiación Solar de Colombia*; IDEAM - UPME, Bogotá DC, Colombia; 1ª edición.
- Ismed, F.; Lohezic-Le Devehat, F.; Delalande, O.; Sinbandhit, S.; Bakhtiar, A. & Boustie, J.: , 2012; Lobarin from the Sumatran lichen, *Stereocaulon halei*; *Fitoterapia*; **83** (8): 1693--1698; doi:10.1016/j.fitote.2012.09.025; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2012.09.025>.
- Işıl Berker, K.; Güçlü, K.; Tor, I.; Demirata, B. & Apak, R.: , 2010; Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method; *Food Analytical Methods*; **3** (3): 154--168; doi:10.1007/s12161-009-9117-9; URL <http://link.springer.com/10.1007/s12161-009-9117-9>.
- Jakupovic, J. & Hüneck, S.: , 1989; Zuordnung der 1H-NMR-Spektren von Depsiden, Depsidonen, Depsonen und Dibenzofuranen aus Flechten durch NOE-Differenzspektroskopie; *Zeitschrift für Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*; **44** (9): 1117--1123; doi:10.1515/znb-1989-0920.
- Jayaprakasha, G. K. & Jaganmohan Rao, L.: , 2000; Phenolic constituents from the lichen *parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity; *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*; **55** (11-12): 1018--1022; doi:10.1515/znc-2000-11-1227.
- Juliano, C.; Magrini, G.; Tsui, M. M.; Lam, J. C.; Ng, T. Y.; Ang, P. O.; Murphy, M. B.; Lam, P. K.; Sarkany, R.; Singer, S.; Karrer, S. & Berneburg, M.: , 2017; Occurrence, Distribution, and Fate of Organic UV Filters in Coral Communities; *Environmental Science and Technology*; **51** (8): 4182--4190; doi:10.1021/acs.est.6b05211; URL <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.12.006http://dx.doi.org/10.1016/j.mpm.2017.04.009>.
- Kaiser, D.; Sieratowicz, A.; Zielke, H.; Oetken, M.; Hollert, H. & Oehlmann, J.: , 2012; Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters; *Environmental Pollution*; **163**: 84--90; doi:10.1016/j.envpol.2011.12.014; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.12.014>.
- Kammeyer, A. & Luiten, R.: , 2015; Oxidation events and skin aging; *Ageing Research Reviews*; **21**: 16--29; doi:10.1016/j.arr.2015.01.001; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2015.01.001https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568163715000033>.
- Kar, S.; Sanderson, H.; Roy, K.; Benfenati, E. & Leszczynski, J.: , 2020; Ecotoxicological assessment of pharmaceuticals and personal care products using predictive toxicology approaches; *Green Chemistry*; **22** (5): 1458--1516; doi:10.1039/C9GC03265G; URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C9GC03265G>.
- Karlberg, A. T.; Bergström, M. A.; Börje, A.; Luthman, K. & Nilsson, J. L. G.: , 2008; Allergic contact dermatitis - Formation, structural requirements, and reactivity of skin sensitizers; *Chemical Research in Toxicology*; **21** (1): 53--69; doi:10.1021/tx7002239.
- Karu, T. I.: , 2008; Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation; *Photochemistry and Photobiology*; **84** (5): 1091--1099; doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00394.x.
- Kaufman, B. P.; Kailas, A. & Alexis, A. F.: , 2023; Photoprotection (Polypodium leucotomos, UV, and IR Blockers); en *Cosmeceutical Science in Clinical Practice*; CRC Press, Boca Raton; págs. 127--138; doi:10.1201/9781315165905-11; URL <https://www.taylorfrancis.com/books/9781315165905/chapters/10.1201/9781315165905-11>.
- Kekuda, T. R. P.; Vinayaka, K. S.; Swathi, D.; Suchitha, Y.; Venugopal, T. M. & Mallikarjun, N.: , 2011; Mineral composition, total phenol content and antioxidant activity of a macrolichen *everniastrum cirrhatum* (Fr.) Hale (Parmeliaceae); *E-Journal of Chemistry*; **8** (4): 1886--1894; doi:10.1155/2011/420673; URL <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80055081905&partnerID=40&md5=2c8e00a1d1e70d2e7c79e7dd9b16402e>.

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

- Kim, M. S.; Kim, Y. K.; Cho, K. H. & Chung, J. H.: , 2006; Infrared exposure induces an angiogenic switch in human skin that is partially mediated by heat; *British Journal of Dermatology*; **155** (6): 1131--1138; doi:10.1111/j.1365-2133.2006.07510.x.
- Kolbe, L.: , 2012; How much sun protection is needed?: Are we on the way to full-spectrum protection?; *Journal of Investigative Dermatology*; **132** (7): 1756--1757; doi:10.1038/jid.2012.148; URL <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.148>.
- Kosanić, M. & Ranković, B.: , 2011; Antioxidant and Antimicrobial Properties of Some Lichens and Their Constituents; *Journal of Medicinal Food*; **14** (12): 1624--1630; doi:10.1089/jmf.2010.0316; URL <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/jmf.2010.0316>.
- Kosanić, M. & Ranković, B.: , 2015; Studies on antioxidant properties of lichen secondary metabolites; en *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential* (Editado por Ranković, B.); capítulo 4; Springer, Switzerland; págs. 105--125.
- Kosanić, M.; Ranković, B. & Vukojević, J.: , 2011; Antioxidant properties of some lichen species; *Journal of Food Science and Technology*; **48** (5): 584--590; doi:10.1007/s13197-010-0174-2; URL <http://link.springer.com/10.1007/s13197-010-0174-2>.
- Kosanić, M.; Ranković, B. & Stanojković, T.: , 2013; Investigation of Selected Serbian Lichens for Antioxidant , Antimicrobial and Anticancer Properties; *The Journal of Animal & Plant Sciences*; **23** (6): 1628--1633; URL <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-23-6/24.pdf>.
- Koshy, J. C.; Sharabi, S. E.; Jerkins, D.; Cox, J.; Cronin, S. P. & Hollier, L. H.: , 2010; Sunscreens: Evolving aspects of sun protection; *Journal of Pediatric Health Care*; **24** (5): 343--346; doi:10.1016/j.pedhc.2010.01.002; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedhc.2010.01.002>.
- Kranner, I. & Birtic, S.: , 2005; A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance; *Integrative and Comparative Biology*; **45** (5): 734--740; URL <http://icb.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/45/5/734>.
- Kranner, I.; Cram, W. J.; Zorn, M.; Wornik, S.; Yoshimura, I.; Stabentheiner, E. & Pfeifhofer, H. W.: , 2005; Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners.; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **102** (8): 3141--3146; doi:10.1073/pnas.0407716102.
- Krutmann, J.: , 1997; Human photoimmunology.; *Photochemistry and photobiology*; **65** (4): 607--608; doi:10.1111/j.1751-1097.1997.tb01900.x.
- Krutmann, J. & Schroeder, P.: , 2009; Role of mitochondria in photoaging of human skin: The defective powerhouse model; *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*; **14** (1): 44--49; doi:10.1038/jidsymp.2009.1; URL <http://dx.doi.org/10.1038/jidsymp.2009.1>.
- Krutmann, J.; Schalka, S.; Watson, R. E. B.; Wei, L. & Morita, A.: , 2021; Daily photoprotection to prevent photoaging; *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*; **37** (6): 482--489; doi:10.1111/phpp.12688.
- Krysa, M.; Szymańska-Chargot, M. & Zdunek, A.: , 2022; FT-IR and FT-Raman fingerprints of flavonoids – A review; doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133430.
- Kumar KC, S. & Müller, K.: , 1999; Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth; *Journal of Natural Products*; **62** (6): 821--823; doi:10.1021/np980378z.
- Leftell, D. J. & Brash, D. E.: , 1996; Sunlight and Skin Cancer; *Scientific American*; **275** (1): 55--59; URL <https://www.jstor.org/stable/24993269>.
- Liebel, F.; Kaur, S.; Ruvolo, E.; Kollias, N. & Southall, M. D.: , 2012; Irradiation of skin with visible light induces reactive oxygen species and matrix-degrading enzymes; *Journal of Investigative Dermatology*; **132** (7): 1901--1907; doi:10.1038/jid.2011.476; URL <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2011.476>.
- Lodén, M.; Beitner, H.; Gonzalez, H.; Edström, D. W.; Åkerström, U.; Austad, J.; Buraczewska-Norin, I.; Matsson, M. & Wulf, H. C.: , 2011; Sunscreen use: Controversies, challenges and regulatory aspects; *British Journal of Dermatology*; **165** (2): 255--262; doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10298.x.
- Logan, S. R.: , 2000; *Fundamentos de Química*; Addison Wesley Iberoamericana; 1^a edición; ISBN 84-7829-030-3.
- Lohezic-Le Devehat, F.; Tomasi, S.; Elix, J. A.; Bernard, A.; Rouaud, I.; Uriac, P. & Boustie, J.: , 2007; Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities; *Journal of Natural Products*; **70** (7): 1218--1220; doi:10.1021/np070145k.
- Lohezic-Le Devehat, F.; Legouin, B.; Couteau, C.; Boustie, J. & Coiffard, L.: , 2013; Lichenic extracts and metabolites as uv filters.; *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; **120**: 17--28; doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.01.009; URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134413000158>.

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

- Lopes, T. I. B.; Coelho, R. G.; Yoshida, N. C. & Honda, N. K.: , 2008; Radical-scavenging activity of orsellinates.; *Chemical & pharmaceutical bulletin*; **56** (11): 1551--1554; doi:10.1248/cpb.56.1551.
- Lorigo, M.; Mariana, M. & Cairrao, E.: , 2018; Photoprotection of ultraviolet-B filters: Updated review of endocrine disrupting properties; *Steroids*; **131** (September 2017): 46--58; doi:10.1016/j.steroids.2018.01.006; URL <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.01.006>.
- Lumbsch, H. T.; Ahti, T.; Altermann, S.; Amo de Paz, G.; Aptroot, A.; Arup, U.; Bárcenas Peña, a.; Bawingan, P. a.; Benatti, M. N. & Betancourt, L.: , 2011; *One hundred new species of lichenized fungi: a signature of undiscovered global diversity*; tomo 127; Magnolia Press; ISBN 9781869776497; doi:10.11646/phytotaxa.18.1.1.
- Luo, H.; Ren, M.; Lim, K. M.; Koh, Y. J.; Wang, L. S. & Hur, J. S.: , 2006; Antioxidative Activity of Lichen *Thamnomia vermicularis* in vitro.; *Mycobiology*; **34** (3): 124--7; doi:10.4489/MYCO.2006.34.3.124; URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3769559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Luo, H.; Yamamoto, Y.; A Kim, J.; Jung, J. S.; Koh, Y. J. & Hur, J. S.: , 2009; Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island); *Polar Biology*; **32** (7): 1033--1040; doi:10.1007/s00300-009-0602-9; URL <http://link.springer.com/10.1007/s00300-009-0602-9>.
- Luo, H.; Yamamoto, Y.; Liu, Y.; Jung, J. S.; Kahng, H. Y.; Koh, Y. J. & Hur, J. S.: , 2010; The in vitro antioxidant properties of chinese highland lichens; *Journal of Microbiology and Biotechnology*; **20** (11): 1524--1528; doi:10.4014/jmb.1003.03029.
- MacManus-Spencer, L. A.; Tse, M. L.; Klein, J. L. & Kracun, A. E.: , 2011; Aqueous photolysis of the organic ultraviolet filter chemical octyl methoxycinnamate; *Environmental Science and Technology*; **45** (9): 3931--3937; doi:10.1021/es103682a.
- Malhotra, S.; Subban, R. & Singh, A.: , 2007; Lichens-Role in Traditional Medicine and Drug Discovery; *The Internet Journal of Alternative Medicine*; **5** (2): 1--6.
- Manzur, J. S.; Breder, M. N. R.; Manzur, M. C. A. & Azulay, R. D.: , 1986; Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria.; *Anais Brasileiros de Dermatologia*; **61**: 121 -- 124.
- Masaki, H.: , 2010; Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects; *Journal of Dermatological Science*; **58** (2): 85--90; doi:10.1016/j.jdermsci.2010.03.003; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.03.003>.
- Masuch, G.: , 1993; *Biologie der Flechten*; UTB für Wissenschaft, Heidelberg; 1^a edición; ISBN 3-494-02167-8.
- Matsui, M. S.; Hsia, A.; Miller, J. D.; Hanneman, K.; Scull, H.; Cooper, K. D. & Baron, E.: , 2009; Non-sunscreen photoprotection: Antioxidants add value to a sunscreen; *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*; **14** (1): 56--59; doi:10.1038/jidsymp.2009.14; URL <http://dx.doi.org/10.1038/jidsymp.2009.14>.
- Mayo-Bean, K.; Moran, K.; Meylan, B. & Ranslow, P.: , 2012; *ECOSAR Methodology Document*; May 2012; US Environmental Protection Agency; ISBN 2025647662; URL <http://www2.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/ecosartechfinal.pdf>.
- McEvoy, M.; Nybakken, L.; Solhaug, K. A. & Gauslaa, Y.: , 2006; UV triggers the synthesis of the widely distributed secondary lichen compound usnic acid; *Mycological Progress*; **5** (4): 221--229; doi:10.1007/s11557-006-0514-9.
- Meinhardt, M.; Krebs, R.; Anders, A.; Heinrich, U. & Tronnier, H.: , 2008; Wavelength-dependent penetration depths of ultraviolet radiation in human skin; *Journal of Biomedical Optics*; **13**: 044030; doi:10.1117/1.2957970; URL <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.2957970>.
- Melgarejo, L. M.: , 2003; Bioprospección: Plan Nacional y aproximación al estado actual en Colombia; *Acta Biológica Colombiana*; **8** (2): 73--86.
- Melgarejo, L. M.; Chaparro Giraldo, A.; Sanchez Nieves, J.; Reyes Blandón, C. & Valencia Zapata, H. A.: , 2002; *Aproximación al estado actual de la bioprospección en Colombia*; Ministerio del Medio Ambiente, Bogotá.
- Melnikov, F.; Kostal, J.; Voutchkova-Kostal, A.; Zimmerman, J. B. & Anastas, P. T.: , 2016; Assessment of predictive models for estimating the acute aquatic toxicity of organic chemicals; *Green Chemistry*; **18** (16): 4432--4445; doi:10.1039/c6gc00720a.
- Mesaik, A. M.: , 2015; Immunomodulatory activities of some common lichen metabolites; *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; **7** (November): 144--147.
- 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; doi:10.1016/j.jphotobiol.2012.03.005; URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134412000462>.
- Minsalud, M. d. S. y. P. S.: , 2015; *Observatorio Nacional de Cáncer - ONC Colombia*; Ministerio de Salud y Protección Social, Bogotá DC, Colombia; 1^a edición.

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

- Mishra, A. K.; Mishra, A. & Chattopadhyay, P.: , 2011; Herbal cosmeceuticals for photoprotection from ultraviolet B radiation: A review; *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*; **10** (3): 351--360; doi:10.4314/tjpr.v10i3.7.
- Mishra, K.; Ojha, H. & Chaudhury, N. K.: , 2012; Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH - assay: A critical review and results; *Food Chemistry*; **130** (4): 1036--1043; doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.127; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>.
- Mitrović, T.; Stamenković, S.; Cvetković, V.; Nikolić, M.; Tošić, S. & Stojičić, D.: , 2011; Lichens as source of versatile bioactive compounds; *Biologica Nyssana*; **2** (1): 1--6; URL <http://biologicanyssana.com/pdf/2-september/BN-AA-0201-00-Mitrovic-et-al.pdf>.
- Molles Jr, M. C.: , 2008; *Ecology - Concepts and Applications*; Mc Graw Hill; 4^a edición.
- Molnár, K. & Farkas, E.: , 2010; Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: A review; *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*; **65** (3-4): 157--173.
- Molyneux, P.: , 2004; The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity; *Songklanakarín Journal of Science and Technology*; **26** (December 2003): 211--219; doi:10.1287/isre.6.2.144.
- Moncada, B.; Lüicking, R. & Betancourt-Macuase, L.: , 2013; Phylogeny of the *Lobariaceae* (lichenized Ascomycota: Peltigerales), with a reappraisal of the genus *Lobariella*; *The Lichenologist*; **45**: 203--263; doi:10.1017/S0024282912000825.
- Moore, K. & Roberts, L. J.: , 1998; Measurement of lipid peroxidation; *Free Radical Research*; **28** (6): 659--671; doi:10.3109/10715769809065821.
- Mosbach, K.: , 1969; Biosynthesis of Lichen Substances, Products of a Symbiotic Association; *Angewandte Chemie - International Edition*; **8** (4): 240--250; doi:10.1002/anie.196902401.
- Muggia, B. L.; Schmitt, I. & Grube, M.: , 2009; Lichens as treasure chests of natural products.; *Sim news*; **59** (3): 85--97.
- Müller, K.: , 2001; Pharmaceutically relevant metabolites from lichens; *Applied Microbiology and Biotechnology*; **56** (1-2): 9--16; doi:10.1007/s002530100684; URL <http://link.springer.com/10.1007/s002530100684>.
- Nash, J. F.; Tanner, P. R. & Matts, P. J.: , 2006; Ultraviolet a radiation: Testing and labeling for sunscreen products; *Dermatologic Clinics*; **24** (1): 63--74; doi:10.1016/j.det.2005.08.005.
- Nash III, T.: , 2010; *Lichen Biology*; Cambridge University Press, Cambridge, UK; 2^a edición.
- National Cancer Institute: , 2024; Diccionario de Cáncer del NCI; URL <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/farmaco>.
- Nguyen, K. H.; Chollet Krugler, M.; Gouault, N. & Tomasi, S.: , 2013; UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners; *Natural Product Reports*; **30** (12): 1490; doi:10.1039/c3np70064j; URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=c3np70064j>.
- Nomelin-Ballen, L. Y.: , 2020; *Búsqueda de antioxidantes y/o fotoprotectores en un hongo liquenizado del páramo de Sumapaz, Colombia, como posibles agentes preventivos de cáncer de piel*; Master; Universidad Nacional de Colombia.
- Norlén, L.: , 2003; Molecular skin barrier models and some central problems for the understanding of skin barrier structure and function; *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*; **16** (4): 203--211; doi:10.1159/000070842.
- Notov, A.: , 2014; Fruticose lichens: structural diversity, taxonomic characteristics and evolution; *Wulfenia*; **21**: 21--31.
- Nybakken, L.; Solhaug, K. A.; Bilger, W. & Gauslaa, Y.: , 2004; The lichens *Xanthoria elegans* and *Cetraria islandica* maintain a high protection against UV-B radiation in Arctic habitats.; *Oecologia*; **140**: 211--216; doi:10.1007/s00442-004-1583-6.
- Oksanen, I.: , 2006; Ecological and biotechnological aspects of lichens; *Applied Microbiology and Biotechnology*; **73** (4): 723--734; doi:10.1007/s00253-006-0611-3; URL <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0611-3>.
- Ozáez, I.; Martínez-Guitarte, J. L. & Morcillo, G.: , 2014; The UV filter benzophenone 3 (BP-3) activates hormonal genes mimicking the action of ecdysone and alters embryo development in the insect *Chironomus riparius* (Diptera); *Environmental Pollution*; **192**: 19--26; doi:10.1016/j.envpol.2014.04.038; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.04.038>.
- Ozenda, P.; Clauzade, G. & Collection, G.: , 1970; *Les lichens: étude biologique et flore illustrée*; Masson & Cie; URL <https://books.google.com.co/books?id=iMaHnQAACAAJ>.
- Pai, V. V.; Shukla, P. & Kikkeri, N. N.: , 2014; Antioxidants in dermatology.; *Indian dermatology online journal*; **5** (2): 210--4; doi:10.4103/2229-5178.131127; URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4030358&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

- Parlamento Europeo**: , 2001; REGLAMENTO (CE) No 1223/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO por la que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE; URL <https://www.boe.es/doue/2001/331/L00001-00005.pdf>.
- Parlamento Europeo**: , 2009; REGLAMENTO (CE) No 2455/2001 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO SOBRE LOS PRODUCTOS COSMETICOS; URL <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R1223&from=EN>.
- Pecoraro, B.; Tutone, M.; Hoffman, E.; Hutter, V.; Almerico, A. M. & Traynor, M.**: , 2019; Predicting Skin Permeability by Means of Computational Approaches: Reliability and Caveats in Pharmaceutical Studies; *Journal of Chemical Information and Modeling*; **59** (5): 1759--1771; doi:10.1021/acs.jcim.8b00934.
- Pedraza-Peñalosa, P.; Betancur, J. & Franco-Roselli, P.**: , 2004; *Chisacá, Un recorrido por los páramos andinos*; Instituto Alexander von Humboldt, Bogotá DC; 1^a edición; ISBN 8151-33-3.
- Pennisi, E.**: , 2016; A lichen menage à trois; *Science*; **353** (6297): 337--338.
- Perico Franco, L. S.; Rojas, J. L.; Cerbón, M. A.; González Sánchez, I. & Valencia Islas, N. A.**: , 2015a; Antioxidant Activity and Protective Effect on Cell and DNA Oxidative Damage of Substances isolated from Lichens of Colombian páramo; *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*; **3** (4): 9--17.
- Perico Franco, L. S.; Soriano García, M.; Cerbón, M. A.; González Sánchez, I. & Valencia Islas, N. A.**: , 2015b; Secondary metabolites and cytotoxic potential of *Lobariella pallida* and *Stereocaulon strictum* var . *compressum* , two lichens from Colombian páramo region; *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*; **3** (4): 31--38.
- Pisoschi, A. M. & Pop, A.**: , 2015; The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review; *European Journal of Medicinal Chemistry*; **97**: 55--74; doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.
- Pozzobon, F. C.; Acosta, Á. E. & Castillo, J. S.**: , 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; doi:10.29176/2590843X.25; URL <https://revista.asocolderma.org.co/index.php/asocolderma/article/view/25>.
- Raad, H.; Serrano-Sanchez, M.; Harfouche, G.; Mahfouf, W.; Bortolotto, D.; Bergeron, V.; Kasraian, Z.; Dousset, L.; Hosseini, M.; Taieb, A. & Rezvani, H. R.**: , 2017; NADPH Oxidase-1 Plays a Key Role in Keratinocyte Responses to UV Radiation and UVB-Induced Skin Carcinogenesis; *Journal of Investigative Dermatology*; **137** (6): 1311--1321; doi:10.1016/j.jid.2016.12.027; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.12.027>.
- Raggio, J.; Pintado, A.; Ascaso, C.; De La Torre, R.; De Los Ríos, a.; Wierzchos, J.; Horneck, G. & Sancho, L. G.**: , 2011; Whole lichen thalli survive exposure to space conditions: results of Lithopanspermia experiment with *Aspicilia fruticulosa*.; *Astrobiology*; **11** (4): 281--92; doi:10.1089/ast.2010.0588; URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21545267>.
- Rancan, F.; Rosan, S.; Boehm, K.; Fernández, E.; Hidalgo, M. E.; Quihot, W.; Rubio, C.; Boehm, F.; Piazena, H. & Oltmanns, U.**: , 2002; Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens; *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; **68** (2-3): 133--139; doi:10.1016/S1011-1344(02)00362-7.
- Ranković, B. R.; Kosanić, M. M. & Stanojković, T. P.**: , 2011; Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*; *BMC Complementary and Alternative Medicine*; **11** (1): 97; doi:10.1186/1472-6882-11-97; URL <http://bmccomplementaltermmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-11-97>.
- Ravanat, J. L.; Douki, T. & Cadet, J.**: , 2001; Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components; *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; **63** (1-3): 88--102; doi:10.1016/S1011-1344(01)00206-8.
- Rodríguez, N.; Armenteras, D.; Morales, M. & Romero, M.**: , 2006; *Ecosistemas de los Andes Colombianos*; Instituto de Investigación de Recursos Biológicos - Alexander von Humbolt, Bogotá DC, Colombia; 1^a edición.
- Rojas, J. L.; Díaz Santos, M. & Valencia Islas, N. A.**: , 2015; Metabolites with antioxidant and photo-protective properties from *Usnea roccellina* Motyka , a lichen from Colombian Andes; *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*; **3** (4): 18--26.
- Romanhole, R. C.; Ataide, J. A.; Cefali, L. C.; Moriel, P. & Mazzola, P. G.**: , 2016; Photostability study of commercial sunscreens submitted to artificial UV irradiation and/or fluorescent radiation; *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; **162**: 45--49; doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.06.011; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.06.011>.
- Samarasinghe, V. & Madan, V.**: , 2012; Nonmelanoma skin cancer; *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*; **5** (1): 3; doi:10.4103/0974-2077.94323; URL <http://www.jcasonline.com/text.asp?2012/5/1/3/94323>.
- Sánchez, G.; Nova, J.; De La Hoz, F. & Castañeda, C.**: , 2011; Incidencia de cáncer de piel en Colombia, años 2003-2007; *Piel*; **26** (4): 171--177; doi:10.1016/j.piel.2010.10.028.
- Sarkany, R.**: , 2017; Sun protection strategies; *Medicine (United Kingdom)*; **45** (7): 444--447; doi:10.1016/j.mpmed.2017.04.009; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.04.009>.

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

- Sayre, L. M.; Perry, G. & Smith, M. A.: , 2008; Oxidative Stress and Neurotoxicity; *Chemical Research in Toxicology*; **21** (1): 172--188; doi:10.1021/tx700210j; URL <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx700210j>.
- Schalka, S. & Silva dos Reis, V. M.: , 2011; Sun protection factor: meaning and controversies.; *Anais Brasileiros de Dermatologia*; **86** (3): 507--515; doi:10.1590/S0365-05962011000300013.
- Schieke, S. M.; Stege, H.; Kürten, V.; Grether-Beck, S.; Sies, H. & Krutmann, J.: , 2002; Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts; *Journal of Investigative Dermatology*; **119** (6): 1323--1329; doi:10.1046/j.1523-1747.2002.19630.x.
- Schieke, S. M.; Schroeder, P. & Krutmann, J.: , 2003; Cutaneous effects of infrared radiation: From clinical observations to molecular response mechanisms; *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*; **19** (5): 228--234; doi:10.1034/j.1600-0781.2003.00054.x.
- Schlumpf, M.; Schmid, P.; Durrer, S.; Conscience, M.; Maerkel, K.; Henseler, M.; Gruetter, M.; Herzog, I.; Reolon, S.; Ceccatelli, R.; Faass, O.; Stutz, E.; Jarry, H.; Wuttke, W. & Lichtensteiger, W.: , 2004; Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - An update; *Toxicology*; **205** (1-2 SPEC. ISS.): 113--122; doi:10.1016/j.tox.2004.06.043.
- Schroeder, P.; Haendeler, J. & Krutmann, J.: , 2008a; The role of near infrared radiation in photoaging of the skin; *Experimental Gerontology*; **43** (7): 629--632; doi:10.1016/j.exger.2008.04.010.
- Schroeder, P.; Lademann, J.; Darvin, M. E.; Stege, H.; Marks, C.; Bruhnke, S. & Krutmann, J.: , 2008b; Infrared radiation-induced matrix metalloproteinase in human skin: Implications for protection; *Journal of Investigative Dermatology*; **128** (10): 2491--2497; doi:10.1038/jid.2008.116; URL <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2008.116>.
- Shanbhag, S.; Nayak, A.; Narayan, R. & Nayak, U. Y.: , 2019; Anti-aging and Sunscreens: Paradigm Shift in Cosmetics; *Advanced Pharmaceutical Bulletin*; **9** (3): 348--359; doi:10.15171/apb.2019.042; URL <http://dx.doi.org/10.15171/jcvtr.2015.24https://apb.tbzmed.ac.ir/Abstract/apb-24144>.
- Sharma, B. C. & Kalikotay, S.: , 2012; Screening of antioxidant activity of lichens *Parmotrema reticulatum* and *Usnea* sp . from Darjeeling hills , India; *IOSR Journal of Pharmacy*; **2** (6): 54--60.
- Shrestha, G. & St. Clair, L. L.: , 2013; Lichens: A promising source of antibiotic and anticancer drugs; *Phytochemistry Reviews*; **12** (1): 229--244; doi:10.1007/s11101-013-9283-7.
- Siesler, H. W.; Ozaki, Y.; Kawata, S. & Heise, H. M., (Eds.): , 2001; *Near-Infrared Spectroscopy*; Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany; ISBN 9783527612666; doi:10.1002/9783527612666; URL [http://doi.wiley.com/10.1002/9783527612666](http://doi.wiley.com/10.1002/9783527612666.ch12http://doi.wiley.com/10.1002/9783527612666).
- Sipman, H. J. M.: , 1989; Zonación de líquenes en el Transecto Parque los Nevados; en *Estudios de ecosistemas tropoandinos* (Editado por Van der Hammen, T.); capítulo 9; J Cramer, Berlin, Stuttgart; págs. 461 -- 483.
- Sipman, H. J. M.: , 2002; The Significance of the Northern Andes for Lichens; *The Botanical Review*; **68** (1): 88 -- 99; doi: 10.1663/0006-8101(2002)068[0088:TSOTNA]2.0.CO;2.
- Sipman, H. J. M.; Hekking, W. & Aguirre, J.: , 2008; *Checklist of lichenized and lichenicolous fungi from Colombia*; ICN - Universidad Nacional de Colombia, Bogotá; 1^a edición; ISBN 9789587190694.
- Sklar, L. R.; Almutawa, F.; Lim, H. W. & Hamzavi, I.: , 2013; Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review.; *Photochemical & Photobiological Sciences*; **12** (1): 54--64; doi:10.1039/c2pp25152c; URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23111621>.
- Solár, P.; Hrčková, G.; Koptašíková, L.; Velebný, S.; Solárová, Z. & Bačkor, M.: , 2016; Murine breast carcinoma 4T1 cells are more sensitive to atranorin than normal epithelial NMuMG cells in vitro: Anticancer and hepatoprotective effects of atranorin in vivo; *Chemico-Biological Interactions*; **250**: 27--37; doi:10.1016/j.cbi.2016.03.012; URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279716300758>.
- Solhaug, K. a. & Gauslaa, Y.: , 1996; Parietin, a photoprotective secondary product of the lichen *Xanthoria parietina*; *Oecologia*; **108** (3): 412--418; doi:10.1007/BF00333715.
- Sondenheimer, K. & Krutmann, J.: , 2018; Novel means for photoprotection; *Frontiers in Medicine*; **5** (MAY): 1--5; doi: 10.3389/fmed.2018.00162.
- Springsteen, A.; Yurek, R.; Frazier, M. & Carr, K. F.: , 1999; In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance; *Analytica Chimica Acta*; **380** (1): 155--164; doi:10.1016/S0003-2670(98)00577-7.
- Stiefel, C. & Schwack, W.: , 2015; Photoprotection in changing times - UV filter efficacy and safety, sensitization processes and regulatory aspects; *International Journal of Cosmetic Science*; **37** (1): 2--30; doi:10.1111/ics.12165.

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

- Stocker-Wörgötter, E.; Cortes Cordeiro, L. M. & Lacomini, M.: , 2013; Accumulation of potential pharmaceutically relevant lichen metabolites in lichens and cultured lichen symbionts; en *Studies in Natural Products Chemistry*, tomo 39 (Editado por Rahman, A.); capítulo 10; Elsevier, Amsterdam; págs. 337--380.
- Tewari, A.; Grage, M. M. L.; Harrison, G. I.; Sarkany, R. & Young, A. R.: , 2013; UVA1 is skin deep: molecular and clinical implications; *Photochem. Photobiol. Sci.*; **12** (1): 95--103; doi:10.1039/C2PP25323B; URL <http://xlink.rsc.org/?DOI=C2PP25323B>.
- Thadhani, V. M.; Choudhary, M. I.; Ali, S.; Omar, I.; Siddique, H. & Karunaratne, V.: , 2011; Antioxidant activity of some lichen metabolites; *Natural Product Research*; **25** (19): 1827--1837; doi:10.1080/14786419.2010.529546.
- Thiele, J. J.; Schroeter, C.; Hsieh, S. N.; Podda, M. & Packer, L.: , 2001; The antioxidant network of the stratum corneum; *Current Problems in Dermatology: Oxidants and Antioxidants in Cutaneous Biology*: 26--42.
- Thomas, G. J.; Herranz, P.; Cruz, S. B. & Parodi, A.: , 2019; Treatment of actinic keratosis through inhibition of cyclooxygenase-2: Potential mechanism of action of diclofenac sodium 3% in hyaluronic acid 2.5%; *Dermatologic Therapy*; **32** (3): 1--7; doi:10.1111/dth.12800.
- Toledo Marante, F. J.; García Castellano, A.; Estévez Rosas, F.; Quintana Aguiar, J. & Bermejo Barrera, J.: , 2003; Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: Phytotoxicity and antioxidative activity; *Journal of Chemical Ecology*; **29** (9): 2049--2071; doi:10.1023/A:1025682318001.
- Torres, O. D. & Velho, L.: , 2009; La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia; *Ciencia da Informacao*; **38** (3): 96--110; doi:10.1590/S0100-19652009000300007.
- Ureña-Vacas, I.; González-Burgos, E.; Divakar, P. K. & Gómez-Serranillos, M. P.: , 2022; Lichen Depsidones with Biological Interest; *Planta Medica*; **88** (11): 855--880; doi:10.1055/a-1482-6381; URL <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-1482-6381>.
- Van der Hammen, T. & Rangel-Ch, J. O.: , 1997; El estudio de la vegetación en Colombia; en *Colombia Diversidad Biótica II* (Editado por Rangel, J. O.); capítulo 1; Universidad Nacional de Colombia, Bogotá DC, Colombia; 1ª edición; págs. 17--57.
- Van der Hammen, T.; Pabón Caicedo, J. D.; Gutierrez, H. & Alarcón, J. C.: , 2002; El Cambio Global y los Ecosistemas de Alta Montaña de Colombia; en *Páramos y Ecosistemas Alto Andinos de Colombia en Condición HotSpot & Global Climatic Tensor* (Editado por Castaño Uribe, Carlos); capítulo 3; IDEAM, Bogotá; págs. 163 -- 209.
- Varol, M.; Tay, T.; Candan, M.; Turk, A. & Koparal, A. T.: , 2015; Evaluation of the sunscreen lichen substances usnic acid and atranorin; *Biocell*; **39** (1): 25--31.
- Velasco, M. V. R.; Sarruf, F. D.; Salgado-Santos, I. M. N.; Haroutiounian-Filho, C. A.; Kaneko, T. M. & Baby, A. R.: , 2008; Broad spectrum bioactive sunscreens; *International Journal of Pharmaceutics*; **363** (1-2): 50--57; doi:10.1016/j.ijpharm.2008.06.031.
- Velazquez, P.: , 2020; Cáncer de piel - Cómo está Colombia en esta materia; URL <https://consultorsalud.com/cancer-de-piel-como-esta-colombia-en-esta-materia>.
- Vinayaka, K. S.; Kumar, S. V. P.; Kekuda, T. R. P.; Krishnamurthy, Y. L.; Mallikarjun, N. & Swathi, D.: , 2009; Proximate Composition, Antioxidant, Anthelmintic and Insecticidal Activity of a Macrolichen *Ramalina conduplicans* Vain. (Ramalinaceae); *Journal of Applied Sciences*; **1** (3): 40--46.
- Vouchkova-Kostal, A. M.; Kostal, J.; Connors, K. A.; Brooks, B. W.; Anastas, P. T. & Zimmerman, J. B.: , 2012; Towards rational molecular design for reduced chronic aquatic toxicity; *Green Chemistry*; **14** (4): 1001--1008; doi:10.1039/c2gc16385c.
- Walker, S. L. & Young, A. R.: , 1997; Sunscreens offer the same UVB protection factors for inflammation and immunosuppression in the mouse; *Journal of Investigative Dermatology*; **108** (2): 133--138; doi:10.1111/1523-1747.ep12332362.
- Wang, J.; Pan, L.; Wu, S.; Lu, L.; Xu, Y.; Zhu, Y.; Guo, M. & Zhuang, S.: , 2016; Recent advances on endocrine disrupting effects of UV filters; *International Journal of Environmental Research and Public Health*; **13** (8): 1--11; doi:10.3390/ijerph13080782.
- Wang, L.-s.; Narui, T.; Harada, H.; Culberson, C. F. & Culberson, W. L.: , 2001; Ethnic Uses of Lichens in Yunnan, China; *The Bryologist*; **104** (3): 345--349; doi:10.1639/0007-2745(2001)104[0345:EUOLY]2.0.CO;2.
- Watanabe, Y.; Emori, C.; Uramaru, N.; Fujimoto, N. & Kitamura, S.: , 2018; Study of metabolic activation of the UV-filter octyl methoxycinnamate for endocrine-disrupting activity; *Fundamental Toxicological Sciences*; **5** (6): 185--193; doi:10.2131/fts.5.185.
- Wen, Y.; He, J.; Liu, X.; Li, J. & Zhao, Y.: , 2012; Linear and non-linear relationships between bioconcentration and hydrophobicity: Theoretical consideration; *Environmental Toxicology and Pharmacology*; **34** (2): 200--208; doi:10.1016/j.etap.2012.04.001; URL <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2012.04.001>.

Bioprospección de hongos liquenizados del páramo de Sumapaz como fuente prometedora de fármacos duales con actividad antioxidante y fotoprotectora

- White, P.; Oliveira, R.; Oliveira, A.; Serafini, M.; Araújo, A.; Gelain, D.; Moreira, J.; Almeida, J.; Quintans, J.; Quintans-Junior, L. & Santos, M.: , 2014; Antioxidant Activity and Mechanisms of Action of Natural Compounds Isolated from Lichens: A Systematic Review; *Molecules*; **19** (9): 14496--14527; doi:10.3390/molecules190914496; URL <http://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14496/>.
- Witschi, H. P.: , 1986; Enhanced tumour development by butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastro-intestinal tract; *Food and Chemical Toxicology*; **24** (10-11): 1127--1130; doi:10.1016/0278-6915(86)90298-X.
- Workman, J. & Shenk, J.: , 2004; Understanding and Using the Near-Infrared Spectrum as an Analytical Method; en *Near Infrared Spectroscopy in Agriculture*; 44; capítulo 1; American Society of Agronomy; ISBN 1892769298; págs. 1--10; doi:10.2134/agronmonogr44.c1; URL <http://doi.wiley.com/10.2134/agronmonogr44.c1>.
- Xu, X.; Liu, A.; Hu, S.; Ares, I.; Martínez-Larrañaga, M. R.; Wang, X.; Martínez, M.; Anadón, A. & Martínez, M. A.: , 2021; Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action; *Food Chemistry*; **353** (March); doi:10.1016/j.foodchem.2021.129488.
- Zambare, V. P. & Christopher, L. P.: , 2012; Biopharmaceutical potential of lichens; *Pharmaceutical Biology*; **50** (6): 778--798; doi:10.3109/13880209.2011.633089.
- Zastrow, L.; Groth, N.; Klein, F.; Kockott, D.; Lademann, J.; Renneberg, R. & Ferrero, L.: , 2009; The missing link - Light-induced (280-1,600 nm) free radical formation in human skin; *Skin Pharmacology and Physiology*; **22** (1): 31--44; doi:10.1159/000188083.
- Zhou, L.; Fan, D.; Yin, W.; Gu, W.; Wang, Z.; Liu, J.; Xu, Y.; Shi, L.; Liu, M. & Ji, G.: , 2021; Comparison of seven in silico tools for evaluating of daphnia and fish acute toxicity: case study on Chinese Priority Controlled Chemicals and new chemicals; *BMC Bioinformatics*; **22** (1): 1--31; doi:10.1186/s12859-020-03903-w; URL <https://doi.org/10.1186/s12859-020-03903-w>.
- Zhou, R.; Yang, Y.; Park, S. Y.; Nguyen, T. T.; Seo, Y. W.; Lee, K. H.; Lee, J. H.; Kim, K. K.; Hur, J. S. & Kim, H.: , 2017; The lichen secondary metabolite atranorin suppresses lung cancer cell motility and tumorigenesis; *Scientific Reports*; **7** (1): 1--13; doi:10.1038/s41598-017-08225-1; URL <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08225-1>.