UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (Stereocaulaceae) y *Lobariella pallida* (Lobariaceae) y determinación de su potencial citotoxicidad

Litta Samari Perico Franco

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2011

Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (Stereocaulaceae) y *Lobariella pallida* (Lobariaceae) y determinación de su potencial citotoxicidad

Litta Samari Perico Franco

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctora en Ciencias Farmacéuticas

Directora

Doctora Norma Angélica Valencia Islas
Profesora Asociada, Departamento de Farmacia

Línea de Investigación:
Principio activos de líquenes
Grupo de Investigación:
Estudios biológicos y fisicoquímicos de líquenes colombianos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2011

A mi esposo, mis padres y mis hermanos por su continua comprensión y apoyo incondicional, los amo con toda mi alma…

Agradecimientos

Realizar esta investigación ha sido un reto personal que no hubiera sido posible sin la presencia de personas e instituciones maravillosas que me han acompañado en esta experiencia y a las cuales deseo expresar mi enorme agradecimiento.

En primer lugar y muy especialmente, expreso mi profundo agradecimiento a la Directora de Tesis la Doctora Norma Valencia por su excelente dirección, su gran ejemplo como profesional y sus enseñanzas académicas y personales.

Agradezco el apoyo económico brindado por los siguientes organismos para la realización de esta tesis doctoral: a la Dirección de Investigación Sede Bogotá (proyecto 20101007573), a la Unidad de Gestión de Proyectos de la Dirección de Bienestar (DB-UGP-1462 y DB-UGP-1141) y al comité de posgrado del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

Al Programa de Becas de estudiantes sobresalientes de posgrado por la beca que garantizó mi permanencia exitosa en el Doctorado.

Al Maestro en Ciencias Roberto Dávila, de la fundación Funbiocol por la recolección e identificación de *S. strictum*, y a la Msc Bibiana Moncada de la Universidad Distrital, por la identificación de *L. pallida*

Al Doctor José Rojas, profesor del departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia (UN) por la disposición del espacio, equipos y reactivos para la realización de los ensayos de actividad antioxidante que efectué en su laboratorio.

Al Doctor Luis Enrique Cuca, profesor del departamento de Química de la UN, por su asesoría, sus enseñanzas a nivel profesional y personal, su guía en momentos decisivos y su colaboración en las determinaciones de punto de fusión.

Al Maestro en ciencias Ignacio González por su inmensa generosidad, su enseñanza, asesoría y amistad durante mi estancia de investigación en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Doctor Marco Antonio Cerbón y a la Doctora Adriana Mendoza del Grupo de Investigación en Endocrinología de la Reproducción y Muerte Celular, de la Facultad Química de la UNAM (laboratorio 206 del Edificio F), por su apoyo, asesoría y facilidades proporcionadas para la realización de los ensayos de citotoxicidad, protección de ADN, citoprotección y protección de células beta pancreáticas en su laboratorio y por el apoyo económico para la realización de algunos de los ensayos espectroscópicos.

Al Doctor Manuel Soriano García, investigador del Instituto de Química de la UNAM, por su apoyo para la realización de los ensayos de cristalografía de rayos X y espectroscopia efectuados para algunas de las sustancias liquénicas aisladas.

Al Doctor José Pedraza de la UNAM, por facilitarme el equipo de espectroscopia multicanal y por permitirme ingresar como asistente a su clase de "Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en diferentes patologías, enzimas antioxidantes, nutrición, fitoquímicos, hormesis, situinas y edad".

A Isabel Cristina Castellanos y a Liliana Santacruz de la Universidad Nacional de Colombia y a los miembros de la USAI (Unidad de servicio y apoyo a la investigación) UNAM por el registro de los espectros de RMN, masas e IR.

Al Doctor Julio Morán y a la Msc Guadalupe Domínguez de la división de Neurociencias, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por su apoyo para la consecución del cultivo primario de neuronas granulares de rata Wistar.

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

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

A mi mamá Flor Alba Franco Otero por las largas charlas sabias, ejemplares y amorosas.

A mi esposo Q.F. Javier A. Moreno Rivéros, por el registro de los espectros de IR y HPLC y en especial por su paciencia, apoyo, amor y comprensión

A mis hermanos, Ing. Tatiana Perico y MD Hugo Perico por la ayuda en el ensamble y corrección de mi tesis, su confidencia y amistad.

A las señoras Nancy y Nelly Rivéros por su ayuda y corrección ortográfica.

A las Maestras en Ciencias Liliana Martin, Lorena Nuñez, Carolina Leal, Dora Sánchez y Sonia Vegas de la U.N., y Elly Sánchez, Carolina Álvarez, Mónica Rosas y Karina Nava de la UNAM, por su amistad y apoyo incondicional.

A las candidatas a Doctoras Maritza Rojas, Yenny Lozano y Johanna Morantes y a mis compañeros del Laboratorio 302 del departamento de Farmacia de la UN por su ayuda y apoyo en tan diversos ámbitos académicos y personales.

A profesores y auxiliares de laboratorio del Departamento de Farmacia por el apoyo brindado en diferentes etapas de la realización de la presente tesis.

Finalmente, y de manera muy importante a mi "*alma máter*" la Universidad Nacional de Colombia por todo lo que ha aportado a mi vida profesional y personal.

Resumen

La actividad antioxidante de los extractos y compuestos de los líquenes colombianos *Stereocaulon strictum* var. *compressum* (Ss) y *Lobariella pallida* (Lp), se determinó por los métodos de poder captador de radicales libres, poder reductor, inhibición de peroxidación lipídica, efecto protector de ADN y citoprotección frente a estrés oxidativo. Los extractos de *Ss* y *L.p* mostraron actividad antioxidante que no está directamente relacionada con su contenido fenólico total (CFT). Se aislaron, elucidaron y caracterizaron por métodos espectroscópicos, espectrométricos y difracción de rayos X, 5 compuestos de *S strictum:* hematomato de metilo (**I**), β-orcinol carboxilato de metilo (**III**), stereocaulina (**IV**), atranorina (**II**) y ácido porfirílico (**V**), y 3 compuestos de *L. pallida*: lobarielina (**VI**), orselinato de metilo (**VII**) y un polihidroxialcohol (**VIII**), de los cuales **IV y VI** son novedosos productos naturales, **I**, **III,** y **VII** son reportados por primera vez para las especies, mientras **II** y **V** son confirmados para las mismas. Los resultados indican que los compuestos **I**, **V** y **VI** son prometedores como agentes antioxidantes, neuroprotectores y citoprotectores novedosos y útiles para aplicación industrial y medica. Los compuestos liquénicos de *Ss* y *Lp* resultaron ser inocuos para células normales HaCaT a concentraciones que resultan efectivos como antioxidantes. Así mismo, se determinó que tanto los extractos metanólicos como los compuestos evaluados no presentan un potencial antitumoral contra HeLa, Mcf-7, k562 y PC-3 a las concentraciones estudiadas.

Palabras clave: sustancias liquénicas, citoprotección, estrés oxidativo, neuroprotección, protección del ADN.

Abstract

We determined the antioxidant activity of extracts and compounds from colombian lichens *Stereocaulon strictum* var. compressum (Ss) and *Lobariella pallida* (Lp) by free radical scavenger power, reducing power, inhibition of lipid peroxidation, and DNA protective effect and cytoprotection against oxidative stress methods. *Ss* and *Lp* extract showed antioxidant activity not directly related to their total phenolic content (TFC). We isolated, characterized and elucidated by spectroscopic, spectrometric and X-ray diffraction, 5 compounds from *S strictum*: methyl haematommate (I), methyl β-orcinol carboxylate (III), stereocaullin (IV), atranorin (II) and porphyrilic acid (V), and 3 compounds from L. pallida: lobariellin (VI), methyl orsellinate (VII) and a polihydroxy-alcohol (VIII). IV and VI are novel natural products, I, III and VII are reported for the first time for these species, II and V are confirmed for them. The results indicate that compounds I, V and VI are promising as novel and useful antioxidants, neuroprotective and cytoprotective for industrial and medical application. Lichen compounds of *Ss* and *Lp* were found to be harmless to normal cells HaCaT at concentrations that are effective as antioxidants. Likewise, it was determined that both methanol extracts and compounds evaluated not show potential antitumor against HeLa, MCF-7, K562 and PC-3 at the concentrations studied.

Keywords: lichen substances, cytoprotection, oxidative stress, neuroprotection, protection of DNA.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIV**

Lista de gráficas ..... **XV**

Lista de tablas ..... **XVI**

Introducción **1**

Objetivos **1**

Capítulo 1. Marco Conceptual y Antecedentes **3**
1.1 Radicales Libres y Antioxidantes 3
1.2 Citotoxicidad como medida de inocuidad y/o de potencial antitumoral 5
1.3 Líquenes y sus metabolitos secundarios 6
1.4 Actividades biológicas y usos de los Líquenes 8
1.5 Propiedades antioxidantes de extractos y metabolitos secundarios de líquenes 11
1.6 Los líquenes como fuente de agentes citotóxicos 12
1.7 *Lobariella pallida* (Lobariaceae) 14
1.7.1 Taxonomía 14
1.7.2 Hábitat y distribución en Colombia 14
1.7.3 Química 14
1.7.4 Etnobotánica 15
1.7.5 Actividad biológica de *L. pallida* 15
1.8 *Stereocaulon strictum* var. *compressum* (Stereocaulaceae) 15
1.8.1 Taxonomía 15
1.8.2 Hábitat y distribución en Colombia 15
1.8.3 Química 16
1.8.4 Etnobotánica 16
1.8.5 Actividad biológica de *Stereocaulon strictum* var. *compressum* 16

Capítulo 2 Sección Experimental **17**
2.1 Estudio Químico 17
2.1.1 Procedimientos experimentales generales 17
2.1.2 Estudio químico de *Stereocaulon strictum* var. *compressum* 18
2.1.2.1 Colecta e identificación de *S. strictum* var. *compressum* 18
2.1.2.2 Extracción y fraccionamiento de *S. strictum* var. *compressum* 19
2.1.2.3 Obtención de sustancias liquénicas a partir de las fracciones primarias de *S. strictum* var. *compressum* 20

2.1.3 Estudio químico de *Lobariella pallida* 24
2.1.3.1 Colecta e identificación de *L. pallida* 24
2.1.3.2 Extracción y fraccionamiento de *L. pallida* 24
2.1.3.3 Obtención de sustancias liquénicas a partir de las fracciones primarias de *L. pallida* 25
2.2 Ensayos Biológicos 27
2.2.1 Procedimientos experimentales generales 27
2.2.1.1 Bioautografía directa para la determinación de la actividad antioxidante en las fracciones 27
2.2.1.2 Cuantificación del poder captador del radical libre DPPH de extractos y compuestos puros aislados 27
2.2.1.3 Determinación de la reactividad de los compuestos a partir de su estudio cinético frente al radical libre DPPH• 28
2.2.1.4 Determinación del poder reductor férrico de extractos y compuestos puros 29
2.2.1.5 Determinación de la inhibición de la peroxidación lipídica de extractos y compuestos puros 29
2.2.1.6 Determinación del efecto protector de las sustancias liquénicas sobre el ADN sometido a estrés oxidativo por el radical hidroxilo 30
2.2.1.7 Determinación del efecto citoprotector de los compuestos aislados frente al estrés oxidativo causado por el radical hidroxilo (OH•) 30
2.2.2 Cuantificación del contenido fenólico total en los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum* 31
2.2.3 Determinación de la actividad citotóxica de extractos y compuesto puros 32

Capítulo 3 Resultados y Discusión 33
3.1 Preselección y selección de especies *S. strictum* y *L. pallida* 33
3.2 Estudio químico bioguiado de *S. strictum* var. *compressum* 36
3.2.1 Determinación estructural de los compuestos aislados de *S. strictum* var. *compressum* 38
3.2.1.1 Determinación estructural del Ácido porfirílico (V) 38
3.2.1.2 Determinación estructural de la stereocaulina: 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV). 41
3.3 Estudio químico bioguiado de *L. pallida* 43
3.3.1 Determinación estructural de los compuestos aislados de *L. pallida* 44
3.3.1.1 Determinación estructural de la lobarielina: 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoato de metilo (VI). 46
3.3.1.2 Determinación estructural del polihidroxialcohol. 49
3.4 Cuantificación de la actividad antioxidante de los compuestos puros de *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum* 52
3.4.1 Cuantificación del poder captador del radical libre DPPH de los compuestos 52
3.4.2 Determinación de la reactividad de los compuestos a partir de su estudio cinético frente al radical libre DPPH• 56
3.4.3 Determinación del poder reductor férrico de extractos y compuestos puros 58
3.4.4 Determinación de inhibición de la peroxidación lipídica de extractos y compuestos puros 61

3.4.5 Determinación del efecto protector de las sustancias liquénicas sobre el ADN sometido a estrés oxidativo por el radical hidroxilo 65
3.4.6 Determinación del efecto citoprotector de los compuestos aislados frente al estrés oxidativo causado por el radical hidroxilo 69
3.5 Cuantificación del contenido fenólico total en los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum* y correlación con la actividad antioxidante presentada por los mismos 73
3.6 Determinación de la actividad Citotóxica de extractos y compuestos aislados de *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum* 76

Conclusiones y recomendaciones 79
4.1 Conclusiones 79
4.2 Recomendaciones 81

ANEXOS 83

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 169

Lista de figuras

Pág.

Figura 3-1. Bioautografía de las fracciones primarias del extracto metanólico de *S. strictum* var. *compressum*..... 36
Figura 3-2. Vista estereoscópica de la estructura molecular del β-orcinol carboxilato de metilo (III), obtenida por difracción de rayos X..... 38
Figura 3-3. Vista estereoscópica de la estructura molecular del ácido profirílico (V), obtenida por difracción de rayos X..... 39
Figura 3-4. Estructura cristalina para ácido porfirílico (V), proyectada a lo largo del eje *c*40
Figura 3-5. Bioautografía de las fracciones primarias del extracto metanólico de *L. pallida* 44
Figura 3-6. Vista estereoscópica de la estructura molecular del orselinato de metilo (VII), obtenida por difracción de rayos X..... 45
Figura 3-7. Vista estereoscópica de la estructura molecular de la lobarielina (VI), obtenida por difracción de rayos X..... 48
Figura 3-8. Estructura cristalina de la lobarielina (VI), proyectada a lo largo del eje α..... 49
Figura 3-9. Mecanismo de autooxidación de los lípidos..... 62
Figura 3-10. Efecto de la lobarielina (VI) en la protección del ADN derivado del plásmido pUC18 sometido a estrés oxidativo por el radical hidroxilo..... 66
Figura 3-11. Efecto de los extractos de *S. strictum* (ESs) y *L. pallida* (ELp) y de la lobarielina (VI) en la protección del ADN derivado del plásmido pUC18 sometido a estrés oxidativo por el radical hidroxilo..... 67
Figura 3-12. Efecto de los extractos de *S. strictum* (ESs) y *L. pallida* (ELp), del hematomato de metilo (I), de la atranorina (II) y de la lobarielina (VI) en la protección del ADN derivado del plásmido pUC18 sometido a estrés oxidativo por el radical hidroxilo.. 68

Lista de gráficas

Pág.

Gráfica 3-1. Poder reductor férrico de extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum* . 35
Gráfica 3-2. Inhibición de peroxidación lipídica ejercida por los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum.* 35
Gráfica 3-3. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones de ácido porfirílico - V (ppm) / DPPH• (ppm) 52
Gráfica 3-4. Determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) del ácido porfirílico (V). 53
Gráfica 3-5. Poder reductor férrico del extracto metanólico y compuestos puros de *S. strictum* var *compressum* y *L. pallida* (5 a 1000 ppm) 59
Gráfica 3-6. Poder reductor férrico del extracto metanólico y compuestos puros de *S. strictum* var *compressum* y *L. pallida* (ampliación de 5 a 100 ppm)..... 60
Gráfica 3-7. Efecto citoprotector del hematomato de metilo (I), el β-orcinol carboxilato de metilo (III), el ácido porfirílico (V) y la lobarielina (VI) sobre células HaCat sometidas a daño oxidativo generado por OH•. 71
Gráfica 3-8. Efecto citoprotector del hematomato de metilo (I) y la lobarielina (VI) sobre cultivo primario de neuronas sometido a daño oxidativo generado por OH•. 72
Gráfica 3-9. Efecto citoprotector del hematomato de metilo (I), y la lobarielina (VI) sobre células HeLa sometidas a daño oxidativo generado por OH•. 73

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Categorías estructurales de los metabolitos secundarios biosintetizados por los líquenes 7
Tabla 1-2: Ejemplos de sustancias liquénicas bioactivas 9
Tabla 1-3: Propiedades antioxidantes de extractos y metabolitos secundarios de líquenes 11
Tabla 1-4: Propiedades citotóxicas de extractos y metabolitos secundarios de líquenes 12
Tabla 1-5: Propiedades antiproliferativas de extractos y metabolitos secundarios de líquenes 14
Tabla 1-6: Compuestos reportados para *L. pallida* 15
Tabla 1-7: Compuestos reportados para *S. strictum* var. *compressum* 16
Tabla 2-1: Sistemas de elución en CCD para sustancias de líquenes. 17
Tabla 2-2: Reactivos de coloración para talo con fines de identificación taxonómica 18
Tabla 2-3: Datos de colecta y clasificación taxonómica de S.*strictum* var. *compressum* 19
Tabla 2-4: Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *S. strictum* var. *compressum* 20
Tabla 2-5: Fraccionamiento de la fracción D2 de *S. strictum* var. *compressum* 21
Tabla 2-6: Fraccionamiento del sólido M2 de S. *strictum* var. *compressum* 22
Tabla 2-7: Fraccionamiento del sólido M3 de S. *strictum* var. *compressum* 23
Tabla 2-8: Colecta y clasificación taxonómica de *L. pallida* 24
Tabla 2-9: Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *L. pallida* 25
Tabla 2-10: Líneas celulares del ensayo de citoprotección de extractos y compuestos . 30
Tabla 2-11: Panel de líneas celulares del ensayo de citotoxicidad 32
Tabla 3-1: Poder captador de radical DPPH• de los extractos 34
Tabla 3-2: Sustancias liquénicas obtenidas de *S. strictum* var. *compressum* 37
Tabla 3-3: Datos de RMN para el compuesto V 39
Tabla 3-4: Datos de RMN para el compuesto 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV) 41
Tabla 3-5: Sustancias liquénicas obtenidas de *L. pallida* 45
Tabla 3-6: Datos de RMN para la lobarielina 46
Tabla 3-7: Datos de RMN para el polihidroxialcohol VIII 49
Tabla 3-8: Poder captador del radical DPPH• (CE_{50}) de extractos y compuestos de*S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida* 54
Tabla 3-9: Constantes de velocidad, (k_2), de los compuestos de *S. strictum* var. *compressum* y *L.pallida* a 25.00 ± 0.01 ºC 57
Tabla 3-10: Comparación de las estructuras químicas (k_2) de los compuestos de *S. strictum* var. *compressum* y *L.pallida* 57

Tabla 3-11: Mecanismo de autooxidación de los lípidos 63
Tabla 3-12: Porcentaje de Inhibición de la peroxidación lipídica de extractos y compuestos 64
Tabla 3-13: Contenido Fenólico Total de los extractos metanólicos de *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida* 74
Tabla 3-14: Correlación entre la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum* y el contenido fenólico total de los mismos 74
Tabla 3-15: Citotoxicidad (CI_{50}) del extracto metanólico y compuestos aislados de *S. strictum var. compressum* y *L. pallida* 77
Tabla 3-16: Índice de selectividad (IS) del Cisplatino y del hematomato de metilo 77

Introducción

En las últimas décadas ha existido un creciente interés científico y tecnológico por los antioxidantes, desde el punto de vista medicinal e industrial, por una parte, por ser un tratamiento viable para muchas patologías asociadas con el estrés oxidativo y los radicales libres; y por otra, por su aplicabilidad como agentes antioxidantes útiles como auxiliares de formulación, agentes antienvejecimiento e ingredientes funcionales. (Johnson & Gu, 1995; Menéndez, 2001; Polachira *et al*., 2004; Sinko, 2006; Morales *et al*., 2009; Masaki, 2010; Halliwell, 2011).

Las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de agentes antioxidantes novedosos principalmente de origen natural, que sean menos tóxicos que los de origen sintético y más potentes que los empleados comercialmente. (Haraguchi, 2001; Denisov & Afana.s'ev, 2005; Krishnaiah *et al*., 2010).

En esta búsqueda de nuevas fuentes de origen natural, Colombia, tiene una posición privilegiada, al ser un país megadiverso, que ofrece gran cantidad de hábitats para el desarrollo y establecimiento de la más alta riqueza, diversidad y distribución tanto en plantas superiores, como en criptógamas (líquenes, musgos y hepáticas). (Aguirre, 2006). De estos organismos, los líquenes (LQ) son un recurso casi inexplorado, cuya investigación abarca principalmente aspectos taxonómicos que han permitido estudiar alrededor del 50 % de las especies potencialmente esperadas para el país (Chaparro & Aguirre, 2002; Aguirre, 2006). A la fecha, queda mucho por descubrir respecto a los posibles usos de los LQ colombianos, por lo que su estudio como una fuente original para la obtención de agentes antioxidantes novedosos, permite también contribuir al conocimiento de este importante recurso natural colombiano.

Los estudios químicos y biológicos realizados a nivel mundial sobre los líquenes, han mostrado que estos organismos son una fuente potencial y novedosa de agentes biológicamente activos. (Huneck, 1999; Müller, 2001, Shukla, 2010, entre otros). Estos hechos, condujeron a la realización de esta tesis doctoral encaminada a investigar la composición química y la actividad antioxidante de los líquenes colombianos *Lobariella pallida* y *Stereocaulon strictum* var. *compressum*, con el fin de obtener agentes antioxidantes naturales novedosos con potencia igual o superior a los existentes y menor toxicidad potencial, que constituyan alternativas de moléculas con aplicación terapéutica e industrial.

Así mismo, los resultados de este trabajo se suman a la emergente investigación de la flora liquénica del país, contribuyendo además al conocimiento y valoración de nuestra megadiversidad biológica, dado que las especies de líquenes objeto de estudio, se colectaron a una altura superior a 3000 m s.n.m., en la que se encuentra la biota de los páramos que son exclusivos de la región andina (Colombia, Venezuela, Perú, Ecuador, Costa Rica y Panamá) ubicándose discontinuamente en el neotrópico, desde altitudes de aproximadamente 2900 m s.n.m., hasta la línea de nieves perpetuas (5000 m s.n.m.); por lo tanto se espera que los hallazgos de esta investigación contribuyan al conocimiento de estos ecosistemas poco estudiados.

Objetivos

Objetivo general

Obtener principios antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (Stereocaulaceae) y *Lobariella pallida* (Lobariaceae) y establecer de manera preliminar el potencial citotóxico del extracto metanólico y de los compuestos aislados, con la finalidad de contribuir al conocimiento de las propiedades bioactivas de estos organismos y a la generación de prototipos de antioxidantes y de agentes citotóxicos de origen natural.

Objetivos específicos

- Determinar el potencial antioxidante *in vitro* de los extractos metanólicos de las especies *Stereocaulon strictum* y *Lobariella pallida* mediante la evaluación del poder antioxidante, el poder reductor y el poder captador de radicales libres.
- Determinar el contenido fenólico de los extractos metanólicos y correlacionar éste con la actividad antioxidante presentada.
- Someter a estudio químico bioguiado los extractos metanólicos de las especies de líquenes seleccionadas, con la finalidad de aislar metabolitos secundarios responsables de la actividad antioxidante.
- Verificar la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios aislados por medio de los métodos empleados a nivel del extracto.
- Caracterizar e identificar los principios activos aislados, mediante la determinación de sus constantes físicas, la aplicación de técnicas espectroscópicas (IR, RMN, UV), espectrométricas (EMIE), métodos quiroópticos, la preparación de derivados químicos, y métodos de difracción de rayos X, en caso necesario.
- Determinar la citotoxicidad de los extractos metanólicos y los metabolitos secundarios aislados, sobre líneas celulares tumorales y normales con la finalidad de determinar el potencial antitumoral y la selectividad de la actividad citotóxica presentada.
- Establecer posibles correlaciones entre la actividad antioxidante y la actividad citotóxica determinadas.

Capítulo 1. Marco Conceptual y Antecedentes

1.1 Radicales Libres y Antioxidantes

Un radical libre (RL) es un átomo o compuesto que tiene electrones desapareados, químicamente muy inestable y reactiva dada su tendencia a atrapar un electrón de moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el RL ha conseguido sustraer el electrón que necesita para aparear su electrón libre, la molécula estable que se lo cede, se oxida y se convierte a su vez en un radical libre, iniciándose así, una reacción en cadena. (Menéndez, 2001).

Los radicales libres más comunes son originados a partir de las especies oxígeno reactivo (EOR) y nitrógeno reactivo (ENR). El oxígeno molecular (O_2) se encuentra en la atmósfera en su estado basal como birradical estable y es poco reactivo, sin embargo por reacciones químicas, enzimáticas o por efecto de radiaciones ionizantes, puede producir especies químicas pro-oxidantes, que son moléculas o radicales libres altamente reactivos, capaces de dar lugar a múltiples reacciones con moléculas presentes tanto en organismos vivos, como en los productos farmacéuticos, cosméticos y alimenticios.

En los organismos vivos existen fuentes endógenas y exógenas de RL. Las principales fuentes endógenas están relacionadas con procesos como la respiración aeróbica, la regulación de la presión sanguínea, la inflamación, el metabolismo y la peroxidación lipídica. Así mismo, existen fuentes externas, como los óxidos de nitrógeno (NOx) provenientes del humo del tabaco, las sales férricas contenidas en las carnes rojas, una dieta hipercalórica, ciertas grasas con isomería *trans*, el ejercicio extenuante, los pesticidas, algunos disolventes orgánicos y las radiaciones ionizantes. (Yildirim *et al*., 2001; Avello & Suwalsky, 2006). Los oxidantes más reactivos son el anión peroxinitrilo (ONOO-) que puede generar nitrosación de proteínas, y el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) que causa daño a proteínas, ADN y lípidos. (Menéndez, 2001, Polachira *et al*., 2004).

Desde la década de los 90' se han acumulado evidencias suficientes que permiten afirmar que los RL y las EOR juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático; por ejemplo, las células de los mamíferos los fabrican en condiciones fisiológicas y en cantidades moderadas para luchar contra bacterias, virus, parásitos y células anormales, debido a su potencial efecto destructivo. El cuerpo humano utiliza mecanismos homeostáticos potentes, como defensa, para evitar la acumulación de las formas radicalarias, enfrentar el daño oxidativo y proteger a las células; de forma tal, que el estado constante de formación de pro-oxidantes es balanceado por un porcentaje similar de antioxidantes endógenos enzimáticos o no enzimáticos. (Yildirim *et al*., 2001; Avello & Suwalsky, 2006; Conte & Silva, 2007; Hidalgo, 2007).

El “estrés oxidativo” resulta del desbalance en el equilibrio pro-oxidante–antioxidante a favor de los agentes pro-oxidantes. Durante éste, los RL inducen reacciones en cadena, que pueden dañar moléculas de importancia biológica, como lípidos, proteínas y ácidos nucléicos, (Yildirim *et al.*, 2001; Avello & Suwalsky, 2006; Hidalgo, 2007), conduciendo a una disminución en la fluidez de las membranas biológicas, a la pérdida en la funcionalidad de las enzimas y receptores, a daños en proteínas y mutaciones, que conducen a la muerte celular. (Rodríguez *et al*., 2001; Zhenbaoa *et al*., 2007).

Se ha determinado que el daño oxidativo de las moléculas biológicas en el cuerpo humano está involucrado en procesos patológicos y degenerativos como las enfermedades cardiovasculares, pulmonares, y autoinmunes; en la producción de cataratas, la diabetes tipo 2, la esclerosis múltiple, el cáncer y algunas enfermedades inflamatorias crónicas y neurodegenerativas como el Alzheimer y el Párkinson. (Noguchi & Nikki, 2000; Rodríguez *et al*., 2001; Zhenbaoa *et al*., 2007).

La generación de RL también es importante en la tecnología de productos farmacéuticos como los medicamentos, cosméticos y alimentos, debido a que una de sus principales causas de inestabilidad es la oxidación de los componentes químicos de la formulación, tales como, los compuestos fenólicos, las olefinas, las aminas aromáticas, los aldehídos, los dioles, los éteres, los alcaloides y los compuestos alifáticos insaturados, los cuales son oxidados por RL en reacciones catalizadas frecuentemente por iones metálicos, bajo condiciones de calor y en presencia de oxígeno. Los compuestos de degradación generados bajo estas condiciones, además de deteriorar las características organolépticas de los productos, pueden ser tóxicos; y si adicionalmente provienen de la degradación de los principios activos de la formulación pueden causar la disminución de la actividad biológica del producto. (Johnson & Gu, 1995; Sinko, 2006).

Con el propósito de contrarrestar el efecto del estrés oxidativo sobre los organismos vivos, y de lograr la estabilización de las formulaciones ante los procesos oxidativos, se emplean agentes antioxidantes, los cuales son compuestos que inhiben o debilitan los procesos de oxidación bloqueando la inicialización y/o propagación de las reacciones en cadena. Se puede definir como antioxidante a “toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a la de una molécula oxidable, retarda o previene la oxidación de este sustrato”. (Halliwell & Gutteridge, 2007). Los antioxidantes pueden interferir con los procesos de oxidación mediante la reacción con RL, la quelación de metales y la captación de RL (scavengers). (Denisov & Afanas’ev, 2005).

De acuerdo al origen, los antioxidantes pueden ser naturales y sintéticos. Desde inicios de la década del 2000 el uso de antioxidantes de origen sintético se ha ido restringiendo como consecuencia de su hepatotoxicidad y carcinogenicidad, (Zainol *et al*., 2003); por lo que es deseable el desarrollo de antioxidantes alternativos, de preferencia de origen natural, que sean más efectivos y menos tóxicos, y que puedan tener mayor aplicabilidad en la industria de alimentos, medicamentos y cosméticos. (Haraguchi, 2001; Denisov & Afana.s’ev, 2005).

1.2 Citotoxicidad como medida de inocuidad y/o de potencial antitumoral

La investigación y descubrimiento de nuevos compuestos biológicamente activos requiere en sus primeras fases la identificación de su seguridad y eficacia. La incursión de pruebas *in vitro* ha logrado la disminución del uso de animales en las primeras fases de investigación, permitiendo identificar los compuestos candidatos que podrán pasar a fases más avanzadas, en las que los modelos *in vivo* son fundamentales para confirmar su seguridad y eficacia.

La determinación de la toxicidad *in vitro* sobre cultivos celulares, ejercida por un compuesto determinado es uno de los mecanismos preliminares para determinar la inocuidad de una molécula en sistemas biológicos. Así mismo, la cuantificación del potencial citotóxico de una sustancia sobre líneas tumorales, es útil en la búsqueda de sustancias antitumorales, antiproliferativas y anticancerígenas.

Una de las metas más importantes de las ciencias médicas y farmacéuticas en los últimos tiempos es la búsqueda de agentes quimioterapéuticos más seguros para el tratamiento de tumores en etapas avanzadas de cáncer que presenten bajos índices de toxicidad y en consecuencia una alta selectividad. (NCI, 2010). Con el fin de determinar la selectividad de una sustancia por tejidos tumorales, se compara su toxicidad sobre líneas celulares tumorales frente a la presentada sobre líneas celulares normales (no transformadas). (Bezivin *et al*., 2003).

Hoy en día los productos naturales juegan un papel relevante en la terapia contra el cáncer, las investigaciones sistemáticas conducentes a la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales a partir de materias primas de origen natural, han permitido el hallazgo de agentes quimioterapéuticos y moléculas prototipo para el desarrollo de productos anticancerígeno, que proceden de diversas fuentes, como plantas, animales y microorganismos. (Nobili *et al*., 2009).

En Colombia, el cáncer es un problema prioritario de salud pública por lo que el Instituto Nacional de Cancerología definió en el 2007 las “prioridades de investigación para el control del cáncer en Colombia”, encontrando entre muchas otras medidas, la necesidad de “Identificar alternativas de tratamiento del cáncer a partir de la biodiversidad nacional”. (Arias *et al*., 2007).

La etiología de varios tipos de cáncer se ha relacionado con procesos de estrés oxidativo, por lo que en años recientes se ha considerado enfocar los esfuerzos para que la población en general aumente su consumo de alimentos y suplementos dietarios con capacidad antioxidante que puedan prevenir el estrés oxidativo causante de daños sobre biomoléculas (ADN, lípidos y proteínas), células y tejidos del organismo, que se relaciona con la formación de células anormales, de alta proliferación.

1.3 Líquenes y sus metabolitos secundarios

Los líquenes (LQ), son organismos simbióticos constituidos por la asociación entre un micobionte u hongo (generalmente ascomiceto) y uno o más fotobiontes (alga verde o cianobacteria). La relación entre los organismos que constituyen el cuerpo liquénico o talo es tan íntima, que se comportan y reproducen como una entidad única y diferente (morfológica, fisiológica, y bioquímicamente) a los organismos independientes. En esta simbiosis, el hongo genera los mecanismos necesarios para la protección del alga; mientras el organismo fotosintético proporciona al hongo alimento y vitaminas. (Nash, 2008; Brodo *et al*., 2001; Chaparro & Aguirre, 2002).

Los LQ se encuentran en todos los hábitat terrestres, son capaces de prosperar en diversos ecosistemas y presentan un alto grado de tolerancia a circunstancias ambientales desfavorables como iluminación extrema, períodos de frío intenso, cambios de temperatura y desecación, lo que les ha permitido adaptarse, diversificarse y colonizar territorios variados en el planeta. (Durán, 1997; Chaparro & Aguirre, 2002).

En Colombia, se tiene registro de alrededor de 1515 especies de líquenes, de las veinte mil descubiertas en el mundo, (Hernández, 2010), pertenecientes a 73 familias, 253 géneros y 15 órdenes, de grupos foliosos y fruticosos en su gran mayoría; siendo las familias mejor representadas: Parmeliaceae, Physciaceae, Thelotremataceae, Graphidaceae y Cladoniaceae y a su vez los géneros con mayor número de especies registradas son *Cladonia*, *Usnea, Hypotrachyna* y *Parmotrema*. (Aguirre 2006).

Para clasificar taxonómicamente un líquen e identificar inequívocamente una especie, es necesario revisar su morfología, anatomía y de manera cualitativa sus constituyentes químicos mediante reacciones de coloración en el talo y análisis en cromatografía en capa fina de sus extractos. (Chaparro & Aguirre, 2002; Sipman, 2002). La investigación sobre LQ Colombianos ha confirmado la existencia de una gran diversidad de estos organismos en el país, constituyéndose en uno de los más ricos en este recurso después de Brasil. (Aguirre, 2006). Lo anterior, sin tener en cuenta que aún falta colectar, identificar y clasificar una gran cantidad de material liquénico, al que no ha sido posible asignarle nombre alguno, dada la escasez de investigación química de estos organismos.

Los líquenes producen diversos metabolitos secundarios (Tabla 1-1), que son biosintetizados por varias vías metabólicas; entre ellas, la del acetato polimalonato que da origen a compuestos ácidos y ésteres de tipo alifático, fenoles simples, derivados de ácido hidroxibenzóico, dépsidos, depsidonas, depsonas, antraquinonas, naftoquinonas y derivados de dibenzofurano. Por la vía del ácido mevalónico, los LQ biosintetizan terpenos, terpenoides, esteroides y carotenoides; y por la vía del ácido shiquímico, producen derivados de ácido pulvínico, ciclopéptidos, derivados quinolínicos y otros compuestos fenólicos. (Huneck, 1999; Müller, 2001).

Tabla 1-1: Categorías estructurales de los metabolitos secundarios biosintetizados por los líquenes

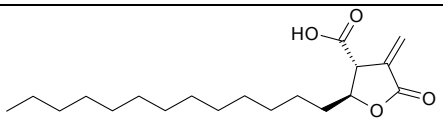
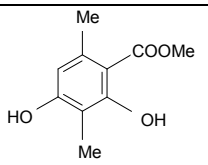
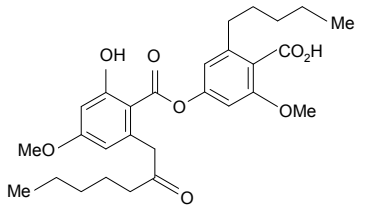
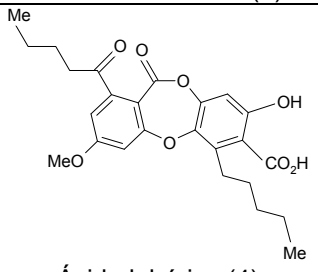
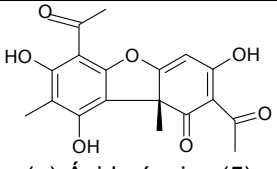
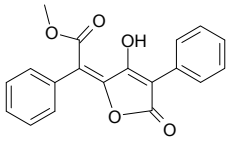
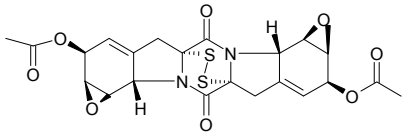
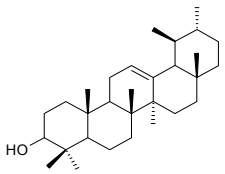
Categoría	Ejemplo	Referencia
VIA ACETATO-POLIMALONATO		
Ácidos organicos	 Ácido protoliquesterínico (1)	Müller, 2001
Derivados de ácidos benzóicos	 β -orcinol carboxilato de metilo (2)	Müller, 2001
Dépsidos	 Ácido confluéntico (3)	Müller, 2001
Depsidonas	 Ácido lobárico (4)	Müller, 2001
Ácidos usnicos	 (+)-Ácido úsnico (5)	Huneck, 1999
VIA ACETATO-POLIMALONATO		
Derivados del ácido pulvínico	 Éster metílico del ácido vulpínico (8)	Müller, 2001
Epiditiopiperazindionas	 Escabrosina (9)	Huneck, 1999

Tabla 1-1: (Continuación)

Categoría	Ejemplo	Referencia
VIA ÁCIDO MEVALÓNICO		
Terpenoides	 Amirina (10)	Huneck & Yoshimura, 1996

Los metabolitos secundarios, localizados en la membrana celular o extracelular en forma de masas amorfas o cristales tienen un rol biológico fundamental para el establecimiento de la simbiosis, y para la protección del líquen, pues actúan como fotoprotectores, antimicrobianos, insecticidas, antiherbívoros y fitotóxicos, entre otros. (Brodo *et al*., 2001; Chaparro & Aguirre, 2002).

Actualmente se conoce que se han aislado más de 700 metabolitos secundarios de diversas especies de líquenes y se considera que la mayoría de estos son únicos a estos organismos. (Bungartz, 2002). El grupo más diverso y abundante entre estas sustancias liquénicas, es el de los policétidos, destacando los de tipo aromático, denominados dépsidos, depsidonas y tridépsidos, que generalmente se forman por la unión de dos o tres unidades fenólicas de tipo orcinol o β-orcinol, a través de enlaces éster, éter y carbono-carbono. Este tipo de sustancias generalmente son las consideradas para la identificación y clasificación taxonómica de estos organismos. (Huneck & Yoshimura, 1996; Lumbsch, 2002; Sipman, 2002).

1.4 Actividades biológicas y usos de los Líquenes

Los líquenes se han utilizado desde la antigüedad, especialmente en las culturas china y egipcia, para diversos propósitos. (Huneck, 1999; Müller, 2001; Brodo *et al*., 2001; Chaparro & Aguirre, 2002). Como alimento *Cetraria islandica* fue el líquen más importante en Europa, empleándose para la nutrición humana, (Airaksinen *et al*., 1986), mientras que *Lecanora esculenta* es reconocido como el "mana" bíblico. (Evans, 2002). A nivel industrial, *Xanthoparmelia chlorochroa* se emplea comercialmente para la extracción del litmus, un tinte azul de aplicación en ropas, bebidas y como indicador de pH en química (Müller, 2001; Brodo *et al*., 2001); por otro lado los líquenes *Evernia prunastri* y *Pseudoevernia furfuracea* se usan como fijadores de perfumes, empleándose desde el antiguo Egipto en el embalsamiento de momias. El uso de los LQ ha trascendido los tiempos, pues en la actualidad siguen siendo fuente de sustancias para la industria de tintes, cosméticos y medicamentos. (Müller, 2002; Joulain & Tabacchi, 2009; IQB, 2011)

En medicina tradicional, algunos LQ se emplean como remedios para trastornos renales, respiratorios, estomacales, dermatológicos, cardíacos, inflamaciones, infecciones bacterianas y tumores, entre otros. (Huneck, 1999; Müller, 2001; Brodo *et al*., 2001; Chaparro & Aguirre, 2002; Gülcin *et al*., 2002; Agelet & Valles, 2003; Odabasoglu *et al*., 2005).

Por otro lado, la industria cosmética en Canadá, Alemania e Islandia se ha visto beneficiada por el desarrollo y fabricación de productos cosméticos como cremas, champús, desodorantes, jabones, perfumes y pastas dentales, con base en líquenes. (Müller, 2001; Brodo *et al*., 2001; Chaparro & Aguirre, 2002; Rancan *et al*., 2002; NTP, 2005; Kuncheva *et al*., 2007).

Adicionalmente, algunos LQ son empleados como biomonitores de contaminación ambiental, dada su capacidad de acumulación de diversos contaminantes y su resistencia o sensibilidad ante muchos de éstos. (Müller, 2001; Kirchner & Daillant, 2002; Zambrano *et al*., 2002; Adamo *et al*., 2004; Backor & Fahselt, 2005; Nyarko *et al*., 2006; Blasco *et al*., 2006; Kuang *et al*., 2007).

Las investigaciones mundiales sobre las propiedades bioactivas de los LQ han logrado identificar que muchos de los metabolitos que producen estos organismos presentan gran variedad de actividades biológicas, tales como antibacterianas, antimicóticas, antivirales, antitumorales, analgésicas, antipiréticas, antiinflamatorias, antioxidantes, antiproliferativas y gastroprotectoras, entre otras. (Huneck, 1999; Perry *et al*., 1999; Ingólfsdóttir *et al*., 2000; Müller, 2001; Chaparro & Aguirre, 2002; Gülcin *et al*., 2002; Lumbsch, 2002; Agelet & Valles, 2003; Behera *et al*., 2005; Choudhary *et a.l*, 2005; Aslan *et al*., 2006; Gulluce *et al*., 2006; Odabasoglu *et al*., 2006; Valencia-Islas *et al*., 2007). En la tabla 1-2 se presentan algunos ejemplos de sustancias liquénicas con actividad biológica confirmada.

Tabla 1-2: Ejemplos de sustancias liquénicas bioactivas

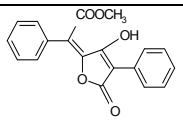
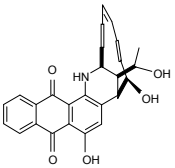
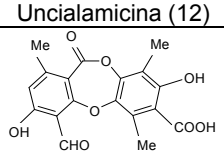
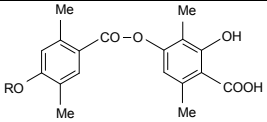
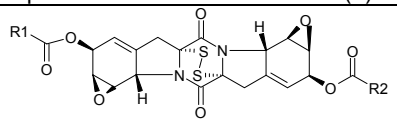
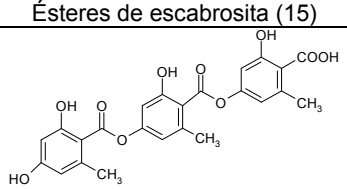
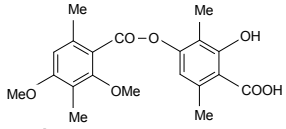
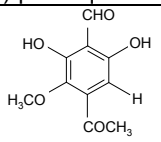
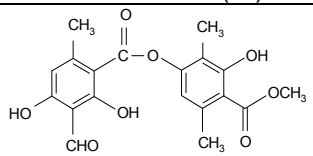
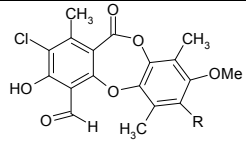
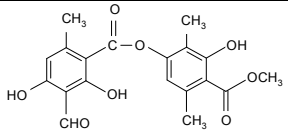
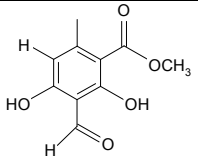
Actividad biológica	Compuesto	Referencia
Antibacteriana	Ácido úsnico (5)	Lauterwein *et al*., 1995 Ingolfsdottir *et al*., 1998 Cocchieto *et al*., 2002
	 Ácido vulpínico (11)	Lauterwein *et al*., 1995
	 Uncialamicina (12)	Davies *et al*., 2005
Antiviral	 Ácido virénsico (13)	Müller, 2001
	Hipericina (7)	Müller, 2001
Antifúngica	β-orcinol carboxilato de metilo (2)	Khanuja *et al*., 2004
Antitumoral	 Ácido barbático (14)	Huneck, 1999

Tabla 1-2: (Continuación)

Actividad biológica	Compuesto	Referencia
Antitumoral	β-orcinol carboxilato de metilo (2)	Khanuja et al., 2004
	 Ésteres de escabrosita (15)	Huneck, 1999
Antiproliferativa	 Ácido girofórico (16)	Müller, 2001 Kumar & Müller, 1999b
Analgésica y antipirética	 Ácido difractáico (17)	Okuyama *et al*., 1995
	Ácido úsnico (5)	Huneck, 1999
Antiinflamatoria	Ácido (+)-protoliquesterínico (1)	Müller, 2001
	 Longissiminona A (18)	Choudhary *et al*., 2005
	Ácido barbático (14)	Müller, 2001
Fotoprotectora	 Atranorina (19)	Müller, 2001 Toledo et al., 2003 Valencia-Islas et al., 2007
	 Pannarina-1 R=H (20) Cloropannarina R=Cl (21)	Müller, 2001
	 Cloratranorina (22)	Valencia-Islas et al., 2007
	 Hematomato de metilo (23)	Toledo et al., 2003
	Ácido lobárico (4)	Müller, 2001

1.5 Propiedades antioxidantes de extractos y metabolitos secundarios de líquenes

Los líquenes constituyen una fuente original de moléculas bioactivas, entre ellas de compuestos antioxidantes. La tabla 1-3 resume algunos estudios que han comprobado propiedades antioxidantes en extractos y sustancias liquénicas de varias especies de LQ.

Tabla 1-3: Propiedades antioxidantes de extractos y metabolitos secundarios de líquenes

Especie	Extracto /Metabolito	Propiedad antioxidante			Referencia
		PCRL	IPL	PRF	
Cetraria islándica	Acuoso	X	X	X	Gulcin *et al*., 2002
Lethariella canariensis	Metanólico		X		Toledo *et al*., 2003
	Atranol		X		
	Cloroatranol				
	Hematomato de metilo				
Lobaria pulmonaria	Metanólico		X	X	Odabasoglu *et al*., 2004
Usnea longissima	Metanólico		X	X	
	Acuoso		X	X	Halicia *et al*., 2005
Usnea ghattensis	Metanólico	X	X		Behera *et al*., 2005
Peltigera rufescens	Acuoso, metanólico		X	X	Odabasoglu *et al*., 2005
Pseudevernia furfuracea			X	X	
Umbilicaria nylanderiana	Metanólico	X	X		Gulluce *et al*., 2006
Dermatocarpon miniatum	Metanólico	X		X	Aslan *et al*., 2006
Lethariella canariensis *Parmotrema stuppeum*	Atranorina	X			Valencia *et al*., 2007
Parmotrema stuppeum	Cloroatranorina	X			
	Ácido salazínico	X			
Ramalina asahineae	Ácido úsnico	X			
Usnea roccellina	Á. descarboxi-tamnólico	X	X	X	Díaz, 2008
Cladonia furcata *Umbilicaria antártica*	Metanólico, acetónico	X	X		Luo *et al*., 2009
Ramalina conduplicans	Metanólico	X	X	X	Luo *et al*., 2010
Cetraria pinastri, *Cladonia fimbriata*, *Fulgensia fulgens*, *Parmelia crinita*	Metanólico		X	X	Rankovič *et al.,* 2010
Hypogymnia physodes, Lasallia pustulata	Acuoso, metanólico, acetónico	X	X		Kosanić *et al.,* 2010
Cetraria islándica, Lecanora atra, Parmelia pertusa, Pseudoevernia furfuraceae, Umbilicaria cylindrica	Acuoso, metanólico, acetónico	X	X		Kosanić & Ranković, 2011

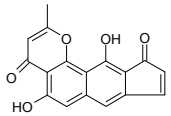
PCRL Poder captador radicales libre; IPL Inhibición peroxidación lipídica; PRF Poder reductor férrico

1.6 Los líquenes como fuente de agentes citotóxicos

Los LQ, constituyen una respuesta potencial a las necesidades mundiales en investigación de productos naturales como posibles fuentes de agentes anticancerígenos y a las necesidades particulares de Colombia en cuanto a la Identificación de alternativas de tratamiento a partir de la biodiversidad nacional. En este contexto, la evaluación de los efectos tóxicos de extractos y compuestos en líneas celulares tumorales constituye el primer acercamiento a la posibilidad de hallar agentes anticancerígenos promisorios.

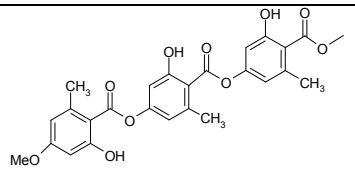
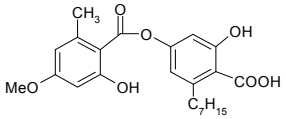
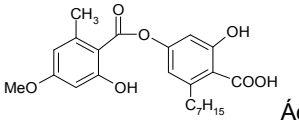
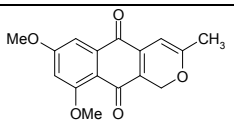
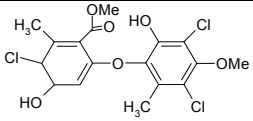
Desde el año 970 D.C., en el libro persa “"Kitabulabnyat an haqa 'iq-uladviyat”, o “Libro de las fundaciones de las verdaderas propiedades de los remedios”, escrito por el médico Abu Mansur, se encuentran los primeros reportes del uso de los líquenes para la el tratamiento del cáncer. (Kupchan & Kooperman, 1975). En décadas recientes, los LQ han sido objeto de diversas investigaciones acerca de su efecto tóxico sobre células tumorales, encontrando que los extractos hexánicos, dietil etéreos y metanólicos de diversas especies de LQ han mostrado actividad citotóxica y antiproliferativa sobre varias líneas celulares (tablas 1-4 y 1-5), ubicando a estos organismos como fuentes potenciales de compuestos anticancerígenos. (Pereira *et al*., 1994; Ögmundsdóttir *et al*., 1998; Ernst-Rusell *et al*., 1999a, 1999b, 2000; Ingólfsdóttir *et al*., 2000; Bézivin *et al*., 2003; Haraldsdóttir *et al*., 2004).

Tabla 1-4: Propiedades citotóxicas de extractos y metabolitos secundarios de líquenes

Fuente	Citotoxicidad en	Metabolito secundario	Referencia
Gyrophora esculenta *Lassallia papulosa* *Lobaria orientalis* *Evernia prunasti*	Sarcoma 180[a]	Polisacáridos	Takahashi *et al*., 1974
Cladonia leptoclada	Carcinoma pulmonar de Lewis[a]	(-) Ácido úsnico (5)	Kupchan *et al*., 1975
Cetraria islándica	Carcinoma epidermal[b]	Naftazarina (6)	Paull *et al*., 1976
Usnea ***fasciata***	Sarcoma 180 [a] Células tumorales de Ehrlich	Ácido úsnico (5)	Pereira *et al*., 1994
Ramalina farinácea	Carcinoma epitelial de pulmón (A549)	(-) y (+) Ácido úsnico (5)	*Koparal et al*., *2006*
Cladina sp, Cladonia sp, Hypogymnia sp, Lecanora sp, Nephroma sp, Leifidium sp, Parmelia sp, Pseudocyphellaria sp., Soroma sp., Stereocaulon, Usnea	Leucemia[b] (P388) Celulas epiteliales de riñón de mono (BS-C-1 – CCL-26)	Extractos	Perry *et al*., 1999
Xantoparmelia scabrosa	Mastocitomia P815[a] Carcinoma de mama[b] (MCF7)	Escabrosina (9)	Ernst-Rusell *et al*., 1999a
Flavoparmelia euplecta	Mastocitoma P815[a]	 Euplectina (26)	Ernst-Rusell *et al*., 1999b

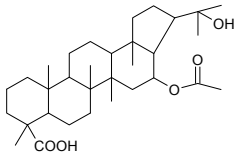
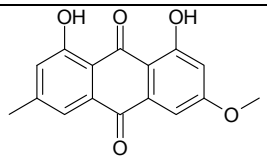
[a]Origen murino; [b]origen humano

Tabla 1-4: (Continuación)

Fuente	Citotoxicidad en	Metabolito secundario	Referencia
Peltigera leucophlebia	Carcinoma de mama[b] (T-47D) Carcinoma de páncreas (PANC-1) Carcinoma de colon (WIDR)	 Tenuiorina (28)	Ingólfsdóttir *et al*., 2002
Cladonia convoluta, C. rangiformis, Parmelia caperata, Platismatia glauca Ramalina cuspidata	Eritroleucemiab (K-562), Glioblastoma (U251), Carcinoma de próstatab (DU145), Carcinoma de mamab (MCF7)	Extractos	Bézivin et al., 2003
Sphaerophorus globosus, Psoroma sp	Cultivo primario de linfocitos[a]	Pannarina-1 (24) Cloropannarina (25)	Correche *et al*., 2004
		 Sfaeroforina (29)	
Psoroma sp.	DU-145	Pannarina-1 (24)	Russo *et al*., 2006
Sphaerophorus globosus, Psoroma sp.	Células de melanoma[b] (M14)	Pannarina-1 (24) Sfaeroforina (29)	Russo *et al*., 2008
Cetraria islandica	Adenocarcinoma de Próstata[b] (PC-3), Carcinoma de mama[b] (T47-D, ZR-75-1), páncreas (Capan-1 y -2, PANC-1), Intestino delgado (NCI-H1417), Ovario (NIH:OVCAR-3), Estomago (AGS), Colorectal (WiDr) Leucemia promielocitica aguda (HL-60), Eritroleucemia (k562), Leucemia de células T (JURKAT)	Ácido protoliquesterínico (1)	Ögmundsdóttir *et al*., 1998; Haraldsdóttir *et al*., 2004
Stereocaulon alpinum		Ácido lobárico (4)	
Thamnolia vermicularis var. *subuliformis*		 Ácido baeomicesico (30)	
Sintético	Carcinoma de mama[b] (MCF7 y MDA-MB-231) Carcinoma pulmonar[b] (H1299)	Ácido úsnico (5)	Mayer *et al*., 2005
Usnea cavernosa	MDA-MB-231; PC-3M	 Dehidroherbarina (31)	Paranagama *et al*., *2007*
Diploicia canescens	Células de melanoma[a] (B16)	 Buelina (32) Ácidos secalónicos (33)	Millot *et al*., 2009

[a]Origen murino; [b]origen humano

Tabla 1-5: Propiedades antiproliferativas de extractos y metabolitos secundarios de líquenes

Fuente	Atiproliferación en	Metabolito secundario	Referencia
Parmelia nepalensis, Parmelia tinctorum	Queratinocitos[b] (HaCaT)	Ácido girofórico (18) Ácido úsnico (5) Ácido difractaico (17)	Kumar *et al*., 1999
Myelochroa aurulenta	Células de leucemia[b] (HL-60)	 Ácido 16-o-acetil leucotilico, (34)	Tokiwano *et al*., 2009
Lethariella zahlbruckneri	Carcinoma de colon[b] (HT-29)	Extracto	Mei *et al*., 2009
Sintético	Carcinoma de ovario[b] (A2780), Carcinoma de cervix[b] (HeLa), Carcinoma de mama (MCF-7 y SK-BR-3), Carcinoma de colon[b] (HT-29, HCT-116), y HL-60	 Parietina (35), Atranorina (21), Ácido úsnico (5), y Ácido girofórico (18)	Backorova *et al*., 2010

[a]Origen murino; [b]origen humano

1.7 *Lobariella pallida* (Lobariaceae)

1.7.1 Taxonomía

Reino: Fungi, Filo: Ascomycota, Clase: Lecanoromycetes, Orden: Lecanoromycetidae, Familia: Lobariaceae. El género *Lobariella*, ha cambiado de nombres en forma sucesiva, por lo que el líquen *Lobariella pallida* presenta una variedad de sinónimos: *Sticta pallida* Hook. in Kunth 1822, *Ricasolia pallida* Hook. in Kunth Nyl. 1857, *Lobaria pallida* Hook. f. Trevis. 1869, y *Durietzia pallida* Hook. in Kunth Yoshim. 1998. (Index fungorum, 2004).

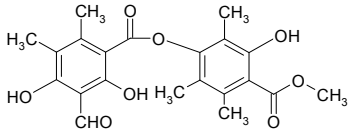
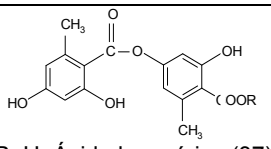
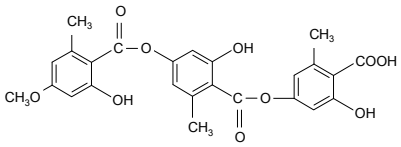
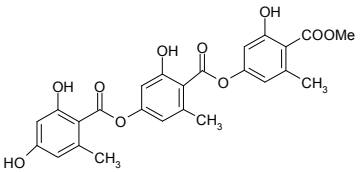
1.7.2 Hábitat y distribución en Colombia

La especie *L. pallida* (Hook. f.) Moncada & Lücking, se desarrolla especialmente sobre cortezas de árboles (sustrato), aunque ocasionalmente en suelo y en los bordes de los caminos. Está distribuida en América tropical desde México, hasta Brasil, incluyendo Perú, Colombia, Ecuador, Costa Rica y Jamaica; se encuentra en la selva de baja montaña, en bosque nublado y en páramo, a una altura entre 1800 m y 4000 m sobre el nivel del mar (m s.n.m.). (Yoshimura, 1984).

1.7.3 Química

En la tabla 1-6 se presentan los compuestos detectados a la fecha por cromatografía en capa delgada (CCD) y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) para *L palllida* (Yoshimura 1971, 1984; Yoshimura & Arvisson, 1994).

Tabla 1-6: Compuestos reportados para *L. pallida*

Categoría Estructural	Compuesto		Referencia
Dépsido	 Pseudocifelarina A (36)	 R=H: Ácido lecanórico (37) R= CH_3: Lecanorato de metilo (38)	Yoshimura 1971, 1984; Yoshimura & Arvidsson, 1994
Tridépsido	 Ácido congirofórico (39)	 Giroforato de metilo (40) Ácido girofórico (16)	

1.7.4 Etnobotánica

A la fecha no se han encontrado reportes etnobotánicos para la especie *L. pallida*.

1.7.5 Actividad biológica de *L. pallida*

A la fecha no se han encontrado reportes de estudios conducentes a identificar propiedades bioactivas en *L. pallida.*

1.8 *Stereocaulon strictum* var. *compressum* (Stereocaulaceae)

1.8.1 Taxonomía

Reino: Fungi, Filo: Ascomicota, Clase: Lecanoromicetos, Orden: Lecanorales, Familia: Stereocaulaceae.

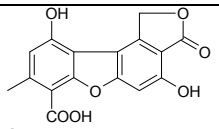
1.8.2 Hábitat y distribución en Colombia

Stereocaulon strictum var. *compressum* se desarrolla en diversos sustratos que incluyen suelo, rocas húmedas y grava, en la vegetación baja y abierta. Habita por encima de los 3000 m s.n.m. (Sipman 2002) y en Colombia esta especie se distribuye principalmente en el páramo. (Aguirre, 2006).

1.8.3 Química

De acuerdo a la quimiotaxonomia (Sipman, 2002), *Stereocaulon stritum* var. *compressum* debe contener, atranorina y ácido porfirílico (Tabla 1-7); sin embargo, no se ha encontrado ningún reporte del aislamiento de compuestos para esta especie.

Tabla 1-7: Compuestos reportados para *S. strictum* var. *compressum*

Tipo estructural	Compuesto	Referencia
Dépsido	Antranorina (19)	Fox *et al*., 1969 Huneck, 1974
Dibenzofurano	 Ácido porfirílico (41)	

1.8.4 Etnobotánica

A la fecha no se han encontrado reportes que evidencien el uso de *Stereocaulon strictum* var. *compressum* en la medicina tradicional a nivel mundial.

1.8.5 Actividad biológica de *Stereocaulon strictum* var. *compressum*

Estudios previos realizados por el Grupo de Investigación en Estudios Biológicos y fisicoquímicos de líquenes Colombianos, dentro del cual se enmarca esta tesis doctoral, se evidenció que el extracto metanólico de *S. strictum* var. *compressum* posee actividad antioxidante. (Robayo, 2008)

Capítulo 2 Sección Experimental

2.1 Estudio Químico

2.1.1 Procedimientos experimentales generales

La cromatografía en columna (CC) para el fraccionamiento primario de extractos se realizó sobre gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm, Merck), por gradiente de polaridad. El fraccionamiento secundario de fracciones de polaridad baja y media se efectuó en CC sobre gel de sílice 60 (0.040-0.063 mm, Merck). La cromatografía en capa delgada (CCD) se desarrolló en cromatofolios de aluminio (gel de sílice 60 F254, 0.25 mm, Merck), revelados con una lámpara de luz ultravioleta (254 y 365 nm), y con una solución de ácido sulfúrico (20 %) con posterior calentamiento (110 °C). En la tabla 2-1 se describen las fases móviles empleadas para la elución de las CCD de las sustancias liquénicas.

Tabla 2-1: Sistemas de elución en CCD para sustancias de líquenes.

Sistema	Disolventes	Relación en volumen
A	Tolueno : dioxano : ácido acético	180:45:5
C	Tolueno : ácido acético	170:30
G	Tolueno : acetato de etilo : ácido fórmico	139:83:8

Huneck & Yoshimura, 1996

Los puntos de fusión (°C) se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros de infrarrojo (IR) fueron registrados según se indica, en un espectrofotómetro Shimadzu FTIR Prestige 21 o en un espectrofotómetro FTIR/FIR Spectrum 400 Perkin-Elmer o en un espectrofotómetro IR Thermo Electron Nicolet IR380 FT-IR, mediante pastilla de KBr. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) se adquirieron en un espectrofotómetro Bruker Avance 400 o Varian 400-MR, o Varian 400S (según se indica en cada espectro), empleando como referencia interna TMS y se procesaron con el programa Mestrec v. 4.8.6.0 (Mestrelab Research, 2006). La espectrometría de Masas (EM) por técnica $FAB^{(+)}$ (bombardeo con átomos rápidos) se llevó a cabo en un espectrómetro de masas DFS (Double Focus Sector) marca Thermo-Electron bombardeando la muestra con iones de Cesio (T° < 50 °C), empleando detección positiva de iones y reabsorción de la muestra en una matriz de alcohol nitrobencílico. En el caso de la EM por IE (impacto electrónico) se empleó un espectrómetro de masas JEOL JMS-AX5058HA y uno DFS (Double Focus Sector) marca Thermo-Electron con sonda para introducción directa, a una velocidad de calentamiento de 100 °C/min. Los espectros de masas por electrospray (ESI) de alta resolución se obtuvieron en un espectrómetro Shimadzu LCMS-IT-TOF. Los análisis de cristalografía de rayos X se realizaron en un difractómetro Bruker Smart APEX AXS CCD equipado con un radiador monocromado de grafito y radicación Mo Kα (λ = 0.71073 Å), usando el

método ω-scan. Las reflexiones observadas fueron corregidas por los efectos de polarización Lorentziana. Las estructuras fueron resueltas usando métodos directos con el paquete software SHELXTL (Siemens, 1997) y refinadas mediante una matriz de mínimos cuadrados F^2, con parámetros de desplazamiento anisotrópico para todos los átomos diferentes a hidrógeno (Sheldrick, 1997). La geometría de las moléculas fue calculada usando los software WinGX (Farrugia, 1997) y PARST (Nardelli, 1983 y 1995).

Los reactivos empleados fueron grado analítico (RA): ácido l(+)ascórbico 99.0 %, hidróxido de sódio 97 % (Carlo Erba); ácido acético, ácido fórmico, ácido oxálico, ácido tricloroacético 99.5 %, cloruro de hierro II 99.0 %, cloruro de hierro III 98 %, ferricianuro de potasio 99 % (Merck); ácido linoléico 95 %, 2,2-difenil-1-picrilhidracilo 90 %, 2,6-di-*ter*-butil-4-metilfenol 99 %, (±)-α-tocoferol 95 % (Sigma-Aldrich); fosfato dihidrógeno de sodio (Mallinckrodt); y tiocianato de amonio 99 % (Panreac). Los disolventes (R.A.) fueron: cloroformo 99.0 %, dioxano 99.2 %, metanol 99.5 % (Merck); acetato de etilo 99.5 %, diclorometano 99.0 %, n-hexano 95.0 %, tolueno 99.5 % (Mallinckrodt). Los disolventes deuterados empleados fueron los siguientes: $CDCl_3$, (99.8 atom % D), Me_2CO-d6 Aldrich (99.9 atom % D), metanol-d_4 (99.8 + atom % D), dimetil sulfóxido DMSO-d_6 (99.9 atom % D) y agua D_2O (99.96 % D). Los reactivos de coloración para determinación taxonómica de las especies de líquenes se indican en la tabla 2-2.

Tabla 2-2: Reactivos de coloración para talo con fines de identificación taxonómica

Reactivo	Composición
C	Solución acuosa saturada de hipoclorito de sodio
K	Solución acuosa de hidróxido de potasio (10-25 %)
PD	*p*-fenilendiamina (1 g), sulfito de sodio (10 g), agua (100 mL) y detergente líquido comercial (40 gotas).

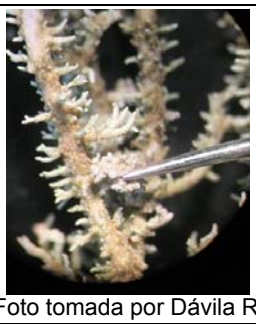
Chaparro & Aguirre, 2002

2.1.2 Estudio químico de *Stereocaulon strictum* var. *compressum*

2.1.2.1 Colecta e identificación de *S. strictum* var. *compressum*

El líquen se colectó bajo el permiso 13 del 24 agosto de 2009 del Ministerio del ambiente, vivienda y desarrollo territorial, en el páramo de Sumapáz, Colombia (tabla 2-3) con la asesoría del liquenólogo Msc. Roberto Dávila, Director de la "Fundación para el Estudio de la Biodiversidad en Colombia" (Funbiocol) quién además llevó a cabo la determinación taxonómica (tabla 2-3) de la especie empleando las claves taxonómicas de Sipman, (2002), consistentes en la evaluación de los caracteres morfológicos, anatómicos y químicos del talo liquénico. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario Nacional del Instituto de Ciencias Naturales de la U. Nacional de Colombia con la clave COL 539476.

Tabla 2-3: Datos de colecta y clasificación taxonómica de S.*strictum* var. *compressum*

<table>
<tr><td colspan="2">
Foto tomada por Perico-Franco L.S</td><td colspan="2"> 
Foto tomada por Dávila R</td></tr>
<tr><td colspan="4">Colecta</td></tr>
<tr><td>Fecha</td><td colspan="3">2 de junio de 2007</td></tr>
<tr><td>Lugar</td><td colspan="3">Parque nacional natural Sumapaz. Localidad 20 Sumapaz, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, Colombia.</td></tr>
<tr><td>Coordenadas geográficas</td><td colspan="3">4° 16.958’ Norte, 74° 11.911’ Oeste</td></tr>
<tr><td>Altitud (m s.n.m.)</td><td colspan="3">3711</td></tr>
<tr><td>Temperatura ambiental promedio</td><td colspan="3">2 a 8 °C</td></tr>
<tr><td>Sustrato</td><td colspan="3">Rocas, arcilla, suelo del talud de caminos</td></tr>
<tr><td>Vegetación asociada</td><td colspan="3">Paramuna</td></tr>
<tr><td>Colectores</td><td colspan="3">Dávila R & Perico-Franco L.S</td></tr>
<tr><td colspan="2">Caracteres morfológicos y anatómicos</td><td colspan="2">Test de coloración</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="3">Liquen epilítico, de talo fruticoso con filocladio cilíndrico, soredio granuloso, soralios individuales aplanados en la parte inferior, pseudopotecio inclinado, cefalodio compuesto de una o más elongaciones, y ramas como dedos. (Huneck, 1974; Sipman, 2002)</td><td>Ensayo</td><td>Resultado</td></tr>
<tr><td>Prueba K</td><td>+ (amarillo)</td></tr>
<tr><td>Prueba PD</td><td>+ (amarillo)</td></tr>
<tr><td>Taxónomo:</td><td>Roberto Davila,</td><td>No COL</td><td>539476</td></tr>
<tr><td>Familia</td><td>Stereocaulaceae</td><td>Especie</td><td>Stereocaulon strictum var. Compressum (Nyl.) I.M. Lamb.</td></tr>
</table>

2.1.2.2 Extracción y fraccionamiento de *S. strictum* var. *compressum*

El liquen limpio, se secó en horno de aire recirculante a una temperatura entre 37 y 50 °C. El material seco y molido (284.5 g) se sometió a un proceso de extracción a temperatura ambiente mediante maceración exhaustiva asistida por ultrasonido (3 x 15 min), empleando metanol como disolvente de extracción. El extracto resultante se filtró y concentró a presión reducida, en evaporador rotatorio, obteniéndose un extracto seco color ámbar (32.916 g).

El extracto *S. strictum* var. *compressum* (30.89 g) se sometió a fraccionamiento primario por CC abierta sobre gel de sílice (300 g) impregnada con ácido oxálico al 1 %, eluyendo por gradiente de polaridad de Hex -$CHCl_3$ (100:0 → 0:100), $CHCl_3$ - AcOEt (100:0 → 0:100) y AcOEt - MeOH (100:0 → 0:100), como se indica en la tabla 2-4, obteniéndose 84 fracciones (130 mL), que se reagruparon en 13 fracciones primarias combinadas (A-M), según su similitud cromatográfica en CCD empleando fase móvil C o G como sistema de elución.

Tabla 2-4: Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *S. strictum* var. *compressum*

Fase móvil	Proporción (%)	Fracciones	Actividad antioxidante*	Fracción combinada	Peso (g)
Hex	100	1-16		A	0.282
Hex - $CHCl_3$	75 : 25	17-22			
Hex - $CHCl_3$	50 : 50	23-32			
Hex - $CHCl_3$	50 : 50	33-36	*	B	1.060
Hex - $CHCl_3$	25: 75	37	*	C	0.289
Hex - $CHCl_3$	25: 75	38-41	*	D	2.155
Hex - $CHCl_3$	25: 75	42	*	E	2.244
Hex - $CHCl_3$	25: 75	43	*	F	0.362
$CHCl_3$	100	44-48	*	G	0.345
$CHCl_3$ - AcOEt	75 :25	49		H	0.479
$CHCl_3$ – AcOEt	50 : 50	50	*	I	0.709
$CHCl_3$ - AcOEt	50 : 50	51-52	*	J	1.132
$CHCl_3$ - AcOEt	25 : 75	53-54	*	K	0.768
AcOEt	100	55-59		L	0.531
AcOEt - MeOH	75 :25	60-67	*	M	5.428
AcOEt - MeOH	50 : 50	68-70	*		
AcOEt - MeOH	25 : 75	71-74	*		
MeOH	100	75-84	*		

*Fracciones activas de acuerdo a ensayo biológico (3.2: figura 3-1)

2.1.2.3 Obtención de sustancias liquénicas a partir de las fracciones primarias de *S. strictum* var. *compressum*

- **Obtención del hematomato de metilo (I) a partir de las fracciones activas B,C,F,G**

  La recristalización sucesiva de las fracciones activas B, C, F y G en las mezclas $CHCl_3$- Me_2CO (50:50) para las fracciones B y C o en $CHCl_3$ - AcOEt (80:20) para las fracciones F y G condujo a la obtención del compuesto **I** (302 mg) como un sólido cristalino en forma de agujas color blanco, soluble en $CHCl_3$, Me_2CO y DMSO; pf (°C) 142-144; **UV** (MeOH) λ_{max} (log ε) 237.5 (3.81) y 336.0 nm (3.62); **IR** (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 2925 (OH), 1644 (C=O), 1623 (C=O), 1575 (C=C), 1478 (C=C o CH_3), 1438 (C=C o CH_3), 1380 (C=C o CH_3), 1324 (C=C o CH_3), 1264 (C-O), 1199 (C-O), 1172 (C-O), 1118 (C-O) (espectro 1a); **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm) 2.50 (3H, s, H-9), 3.94 (3H, s, 7-COOMe), 6.27 (H, t, H-5), 10.31 (1H, s, H-8), 12.39 (1H, s, H-4), 12.88 (1H, s, H-2) (espectro 1b); **^{13}C RMN** ($CDCl_3$, 100 MHz) δ(ppm) 152.3 (C-1), 168.2 (C-2), 108.4 (C-3), 166.6 (C-4), 112.1 (C-5), 103.8 (C-6), 171.9 (C-7), 193.8 (C-8), 25.2 (C-9), 52.3 (7-OMe) (espectro 1c); **EM-IE** *m/z* (% abundancia relativa) 211 ($[M + H]^+$, 5); 210 ($[M]^+$, 43), 182 (16), 178 (25), 150 (100) (espectro 1d).

- **Obtención de atranorina (II) y β-orcinol carboxilato de metilo (III) de la fracción activa D**

  De la fracción D precipitó de manera espontánea un sólido amorfo color amarillo claro (2155 mg), cuyo análisis por CCD en el sistema A evidenció la presencia de dos constituyentes. La recristalización de dicho sólido, en la mezcla Hex - $CHCl_3$ (50:50) permitió obtener el compuesto **II** bajo la forma de un sólido cristalino de color blanco (567 mg), soluble en $CHCl_3$ y DMSO; pf (°C) 194-195; **UV** (MeOH) λ_{max} (log ε) 242.0 nm (4.08); **IR** (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 2954 (OH), 1654 (C=O), 1583 (C=C), 1452 (C=C o

CH_3), 1411 (C=C o CH_3), 1354 (C=C o CH_3), 1286 (C-O), 1199 (C-O), 1166 (C-O), 1107 (C-O), 1076 (C-O), 987, 823 (espectro 2a); **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 400 MHz) *δ* (ppm) 2.09 (3H, s, Me-9'), 2.54 (3H, s, Me-8'), 2.68 (3H, s, Me-9), 3.96 (3H, s, 7'-COOMe), 6.40 (H, s, H-5), 6.52 (1H, s, H-5'), 10.35 (1H, s, CHO-8), 11.96 (1H, s, HO-2'), 12.51 (1H, s, HO-2), 12.55 (1H, s, HO-4) (espectro 2b); **^{13}C RMN** ($CDCl_3$, 100 MHz) *δ*(ppm) 102.8 (C-1), 169.1 (C-2), 108.5 (C-3), 167.5 (C-4), 112.8 (C-5), 152.4 (C-6), 169.7 (C-7), 193.8 (C-8), 25.5 (C-9), 116.8 (C-1'), 162.9 (C-2'), 110.3 (C-3'), 152.0 (C-4'), 116.0 (C-5'), 139.8 (C-6'), 172.2 (C-7'), 24.0 (C-8'), 9.4 (C-9'), 52.3 (C-7'-COOMe) (espectro 2c); **EM-IE** *m/z* (% abundancia relativa) 374 ([M], 4); 196 (62), 179 (33), 164 (100), 150 (17), 136 (83) (espectro 2d); **EMHRESI** [IT-TOF (modo ión negativo)] *m/z* 373.0888 $[M-H]^-$, (calculado para $C_{19}H_{18}O_8$ 373.0929) (espectro 2e).

De manera adicional, las aguas madres de recristalización (D2, 869 mg) se sometieron a fraccionamiento secundario por cromatografía en columna sobre gel de sílice (20 g) obteniéndose 90 fracciones (8 mL) (tabla 2-5), que se reunieron de acuerdo a su similitud, por CCD, en 7 fracciones combinadas D2a a D2g. A partir de la fracción D2d precipitó el compuesto **III** (583 mg) como un sólido cristalino de color naranja, soluble en $CHCl_3$ y DMSO; pf (°C) 143-144; **UV** (MeOH) λ_{max} (log ε) 279.5 (3.60) y 303.0 nm (3.53); **FTIR** (reflectancia ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3400, 2929 (OH), 1624 (C=O), 1603 (C=O), 1500 (C=C), 1443 (C=C), 1308 (C=C), 1271 (C-O), 1196 (C-O), 1160 (C-O), 1110 (C-O), 1033 (C-O) (espectro 3a); **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 400 MHz) *δ* (ppm) 2.10 (3H, s, Me-8), 2.45 (3H, s, Me-9), 3.90 (3H, s, -COOMe), 5.36 (1H, s, HO-4), 6.20 (H, s, H-5), 12.03 (1H, s, HO-2) (espectro 3b); **^{13}C RMN** ($CDCl_3$, 100 MHz) *δ*(ppm) 140.1 (C-1), 158.1 (C-2), 108.6 (C-3), 163.1 (C-4), 110.6 (C-5), 105.2 (C-6), 172.6 (C-7), 7.6 (C-8), 24.1 (C-9), 51.8 (-COOMe) (espectro 3c).

Tabla 2-5: Fraccionamiento de la fracción D2 de *S. strictum* var. *compressum*

Fase móvil	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones Combinadas
Hex	100	1-10	D2a
Hex - $CHCl_3$	90 : 10	11-15	
Hex - $CHCl_3$	80 : 20	16-20	D2b
Hex - $CHCl_3$	70 : 30	21-30	
Hex - $CHCl_3$	60 : 40		
Hex - $CHCl_3$	50: 50	31-40	D2c
Hex - $CHCl_3$	40: 60		
Hex - $CHCl_3$	35: 65	41-54	D2d
Hex - $CHCl_3$	30: 70		
Hex - $CHCl_3$	20: 80		
Hex - $CHCl_3$	10: 90	55-63	D2e
$CHCl_3$	100		
$CHCl_3$	100	64-65	D2f
$CHCl_3$ - AcOEt	75 :25	66-71	D2g
$CHCl_3$ - AcOEt	50 : 50	72-73	
$CHCl_3$ - AcOEt	50 : 50	74-80	
$CHCl_3$ - AcOEt	25 : 75		
AcOEt	100	81-85	
MeOH	100	86-90	

- **Obtención del stereocaulina (IV) de la fracción activa E**

La recristalización de la fracción E (2.244 mg) de la mezcla $CHCl_3$- AcOEt (80:20) y posteriormente de AcOEt condujo al compuesto 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**) denominado stereocaulina (68 mg) como un sólido cristalino color blanco, soluble en Me_2CO, acetonitrilo y DMSO; pf (°C) 102-104; **UV** (MeOH) λ_{max} (log ε) 200.5 nm (3.21); **FTIR** (reflectancia ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 1649 (C=O), 1579, (C=C), 1453 (C=C o CH_3), 1443 (C=C o CH_3), 1416 (C=C o CH_3), 1300 (C=C o CH_3), 1248 (C-O), 1154 (C-O), 1113 (C-O), 1078 (C-O) (espectro 4a); **^{1}H RMN** (Me_2CO-d_6, 400 MHz) δ (ppm) 2.53 (3H, s, Me-8), 2.66 (3H, s, Me-9), 4.00 (3H, s, MeO-2), 6.49 (H, s, H-3), 6.74 (H, s, H-6), 10.32 (1H, s, 7-CHO) (espectro 4b); **^{13}C RMN** (Me_2CO-d_6, 100 MHz) δ(ppm) 24.7 (C-8), 25.7 (C-9), 53.9 (2-OMe), 106.7 (C-4), 112.3 (C-5), 113.6 (C-3), 118.3 (C-6), 141.5 (C-1), 154.3 (C-2), 195.6 (C-7) (espectro 4c); **EM-IE** *m/z* (% abundancia relativa) 196 (8); 180 (9), 164 (9), 136 (6), 45 (100) (espectro 4d).

- **Obtención del ácido porfirílico (V) y del hematomato de metilo (I) de la fracción activa M**

A partir de la fracción M precipitó un sólido amorfo (M2) de color rosado y un sólido amorfo (M3) de color crema.
El sólido M2 (2.474 g) se sometió a fraccionamiento (tabla 2-6) por CC sobre gel de sílice (0.040-0.063 mm) (50 g), obteniendo 111 fracciones totales (20 mL) que de acuerdo a su perfil por CCD se reunieron en 7 fracciones combinadas (M2a a M2g).

Tabla 2-6: Fraccionamiento del sólido M2 de S*. strictum* var. *compressum*

Fase móvil	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones Combinadas
$CHCl_3$	100	1-9	M2a
$CHCl_3$ – AcOEt	90 : 10	10-15	M2b
$CHCl_3$ – AcOEt	80 : 20	26-23	M2c
$CHCl_3$ – AcOEt	70 : 30		
$CHCl_3$ – AcOEt	70 : 30	24-30	M2d
$CHCl_3$ – AcOEt	60 : 40		
$CHCl_3$ – AcOEt	50 : 50	31-53	M2e
$CHCl_3$ – AcOEt	40: 60		
$CHCl_3$ – AcOEt	30: 70		
$CHCl_3$ – AcOEt	20: 80		
$CHCl_3$ – AcOEt	10: 90		
$CHCl_3$ – AcOEt	10: 90	54-65	M2f
AcOEt	100		
AcOEt- MeOH	90 : 10		
AcOEt- MeOH	80 : 20	66-73	
AcOEt- MeOH	70 : 30		
AcOEt- MeOH	70 : 30	74-87	
AcOEt- MeOH	60 : 40		
AcOEt- MeOH	50: 50		
AcOEt- MeOH	40: 60		
AcOEt- MeOH	40: 60	88-90	M2g
AcOEt- MeOH	30: 70	91-97	
AcOEt- MeOH	20: 80		
AcOEt- MeOH	20: 80	98-111	
AcOEt- MeOH	10: 90		
MeOH	100		
MeOH : H2O	96 : 4		

A partir de la fracción M2d se obtuvo el ácido porfirílico (304 mg) como un sólido rosado en forma de placas, soluble en DMSO; pf (°C) 280-282; **UV** (MeOH) λ_{max} (log ε) 285 nm (3.94); **FTIR** (reflectancia ATR) ν_{max} (cm^{-1}) 3165 (OH), 1723 (γ-lactona), 1689, 1604(C=O), 1419 (C=C o CH_3), 1281 (C=C o CH_3), 1236 (C-O), 1206 (C-O), 1149 (C-O), 1104 (C-O), 1071 (C-O), 1033 (C-O) (espectro 5a); **^{1}H RMN** (DMSO-d_6, 400 MHz) δ (ppm) 2.43 (3H, s, Me-6), 5.56 (2H, s, CH_2-1), 6.58 (1H, s, H-7), 7.02 (1H, s, H-4) (espectro 5b); **^{13}C RMN** (DMSO-d_6, 100 MHz) δ(ppm) 109.3 (C-1), 142.6 (C-2), 159.8 (C-3), 98.1 (C-4), 139.3 (C-5), 108.6 (C-6), 111.9 (C-7), 152.9 (C-8), 107.9 (C-9,12), 156.6 (C-10), 156.3 (C-11), 168.6 (C-13), 69.1 (C-14), 166.3 (C-15), 21.2 (C-16) (espectro 5c); **EM-IE** *m/z* (% abundancia relativa) 315 ($[M+H]^+$, 15); 314 ($[M]^+$, 40), 285 (35), 270 (100), 241 (100) 213 (13), 185 (10) (espectro 5d).

El sólido M3 (578 mg) se sometió a fraccionamiento (tabla 2-7) por CC sobre gel de sílice (0.040-0.063 mm) (12 g), obteniendo 112 fracciones totales (5 mL), reunidas en 11 fracciones combinadas (M3a a M3k) de acuerdo a su perfil en CCD. La fracción M3a condujo a la obtención del hematomato de metilo (831 mg).

Tabla 2-7: Fraccionamiento del sólido M3 de S. *strictum* var. *compressum*

Fase móvil	Proporción (%)	Fracciones	Fracciones Combinadas
$CHCl_3$	100	1-5	M3a
$CHCl_3$	100	6-9	M3b
$CHCl_3$ – AcOEt	90 : 10	10-15	M3c
$CHCl_3$ - AcOEt	80 : 20	16-20	
$CHCl_3$ - AcOEt	70 : 30	21-25	
$CHCl_3$ - AcOEt	60 : 40	26-28	
$CHCl_3$ - AcOEt	60 : 40	29-30	M3d
$CHCl_3$ - AcOEt	50 : 50	31-35	
$CHCl_3$ – AcOEt	40: 60	36-40	
$CHCl_3$ – AcOEt	30: 70	41-45	
$CHCl_3$ - AcOEt	20: 80	46-50	
$CHCl_3$ - AcOEt	10: 90	51-55	M3e
AcOEt	100	56-60	
AcOEt- MeOH	90 : 10	61-65	
AcOEt- MeOH	80 : 20	66	M3f
AcOEt- MeOH	80 : 20	67-70	M3g
AcOEt- MeOH	70 : 30	71-75	M3h
AcOEt- MeOH	60 : 40	76-80	
AcOEt- MeOH	50: 50	81-85	
AcOEt- MeOH	40: 60	86	M3i
AcOEt- MeOH	40: 60	87-90	M3j
AcOEt- MeOH	30: 70	91-95	M3k
AcOEt- MeOH	20: 80	96-100	
AcOEt- MeOH	20: 80		
AcOEt- MeOH	10: 90	101-105	
MeOH	100	106-110	
MeOH - H2O	96 : 4	111-112	

2.1.3 Estudio químico de *Lobariella pallida*

2.1.3.1 Colecta e identificación de *L. pallida*

El líquen se colectó bajo el permiso 13 del 24 agosto de 2009 del Ministerio del ambiente, vivienda y desarrollo territorial, en el páramo de Sumapaz Colombia, con la asesoría del liquenólogo Msc Roberto Dávila. La liquenóloga Bibiana Moncada realizó la determinación taxonómica (tabla 2-8) de la especie empleando las claves descritas por Yoshimura (1998). Una muestra de referencia se depositó en el Herbario Nacional Colombiano con la clave de colecta COL 539477.

Tabla 2-8: Colecta y clasificación taxonómica de *L. pallida*

<table>
<tr><td colspan="3">
Foto tomada por Perico-Franco L.S</td><td colspan="3">
Foto tomada por Perico-Franco L.S</td></tr>
<tr><td colspan="6">Colecta</td></tr>
<tr><td colspan="2">Fecha</td><td colspan="4">2 de junio de 2007</td></tr>
<tr><td colspan="2">Lugar</td><td colspan="4">Parque nacional natural Sumapaz. Localidad 20 Sumapaz, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, Colombia.</td></tr>
<tr><td colspan="2">Coordenadas geográficas</td><td colspan="4">4°19.210’ Norte, 74°12.404’ Oeste</td></tr>
<tr><td colspan="2">Altitud (m s.n.m)</td><td colspan="4">3627</td></tr>
<tr><td colspan="2">Temperatura ambiental promedio</td><td colspan="4">2 a 8 °C</td></tr>
<tr><td colspan="2">Sustrato</td><td colspan="4">Cortezas de árboles</td></tr>
<tr><td colspan="2">Vegetación asociada</td><td colspan="4">Árboles y otra vegetación paramuna</td></tr>
<tr><td colspan="2">Colectores</td><td colspan="4">Norma Valencia y Leopoldo Rojas</td></tr>
<tr><td colspan="3">Caracteres morfológicos y anatómicos</td><td colspan="3">Test de coloración</td></tr>
<tr><td colspan="3" rowspan="3">Presenta morfogénesis del hongo, talo folioso, lóbulos aplanados, talo laciniado y máculas; sin isidias, soredios y pseudoscifelas.(Yoshimura, 1984, 1994, 1998)</td><td>Ensayo</td><td colspan="2">Resultado</td></tr>
<tr><td>Prueba K</td><td colspan="2">+ (amarillo) tallo; - medula</td></tr>
<tr><td>Prueba KC</td><td colspan="2">+ (rosa)</td></tr>
<tr><td>Taxónomo</td><td colspan="2">M.Sc. Bibiana Moncada</td><td colspan="2">No COL</td><td>539477</td></tr>
<tr><td>Familia</td><td>Lobariaceae</td><td>Especie</td><td colspan="3">Lobariella pallida (Hook. f.) Moncada & Lücking.</td></tr>
</table>

2.1.3.2 Extracción y fraccionamiento de *L. pallida*

El liquen seco y molido (106.75 g) se extrajo con metanol por maceración asistida por ultrasonido, a temperatura ambiente. El extracto resultante se filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose un extracto seco de color verde (18.64 g).

El extracto de *L. pallida* (14.64 g) se fraccionó (tabla 2-9) por CC sobre gel de sílice (250 g) eluyendo con mezclas de Hex - Tol (100:0 → 0:100), Tol - AcOEt (100:0 → 0:100) y AcOEt - MeOH (100:0 → 0:100). Este proceso condujo a la obtención de 148 fracciones (80 mL), las cuales se reunieron en diez fracciones primarias combinadas (A-J) (2-9), de acuerdo a su similitud en CCD con el sistema C.

Tabla 2-9: Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *L. pallida*

Fase móvil	Proporción (%)	Fracciones	Actividad antioxidante*	Fracción combinada	Peso (g)
Hex	100	1-5		A	0.152
Hex - Tol	75 : 25	5-10			
Hex - Tol	50 : 50	11-20			
Hex - Tol	25: 75	21-25	*	B	0.123
Tol	100	26-30	*		
Tol - AcOEt	75 : 25	31-32	*	C	3.139
Tol - AcOEt	75 : 25	33-41	*	D	1.071
Tol - AcOEt	75 : 25	42-52	*	E	0.756
Tol - AcOEt	75 : 25	53-71		F	2.292
Tol - AcOEt	60 : 40	72-75	*		
Tol - AcOEt	25 : 75	76-90		G	1.317
AcOEt	100	91-96	*		
AcOEt - MeOH	75 : 25	97-99	*		
AcOEt - MeOH	75 : 25	100-101		H	2.616
AcOEt - MeOH	50 : 50	102-111	*	I	1.164
AcOEt - MeOH	25 : 75	112-116	*		
MeOH	100	117 – 141	*	J	1.259
MeOH - H2O	96 : 4	142 - 148	*		

*Fracciones activas de acuerdo a ensayo biológico (3.3: figura 3-5)

2.1.3.3 Obtención de sustancias liquénicas a partir de las fracciones primarias de *L. pallida*

El liquen seco y molido (106.75 g) se extrajo con metanol por maceración asistida por ultrasonido, a temperatura ambiente. El extracto resultante se filtró y concentró a presión reducida, obteniéndose un extracto seco de color verde (18.64 g).

El extracto de *L. pallida* (14.64 g) se fraccionó (tabla 2-9) por CC sobre gel de sílice (250 g) eluyendo con mezclas de Hex - Tol (100:0 → 0:100), Tol - AcOEt (100:0 → 0:100) y AcOEt - MeOH (100:0 → 0:100). Este proceso condujo a la obtención de 148 fracciones (80 mL), las cuales se reunieron en diez fracciones primarias combinadas (A-J) (tabla 2-9), de acuerdo a su similitud en CCD con el sistema C.

▪ Obtención de la lobarielina: (VI) a partir de la fracción activa B

De la fracción B, precipitó un sólido cristalino color amarillo (123 mg) que se purificó por recristalizaciones sucesivas en mezcla Hex - $CHCl_3$ (50:50) obteniéndose el compuesto 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoato de metilo (**VI** denominado lobarielina **(**60 mg) como cristales amarillos en forma de agujas, soluble en $CHCl_3$, acetonitrilo y DMSO; pf (°C) 90-92; **UV** (MeOH) λ_{max} (log ε) 255 (3.90) y 350 nm (3.66); **IR** (KBr) ν_{max} 2958 (OH), 1643 (C=O), 1433 (C=C o CH_3), 1338 (C=C o CH_3), 1311 (C=C o CH_3), 1225 (C-O) cm^{-1} (espectro 6a); **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm), 2.10 (3H, s, Me-5), 2.48 (3H, s, Me-6), 3.96 (3H, s, -COOMe), 10.35 (1H, s, -CHO), 12.34 (1H, s, HO-4), 12.88 (1H, s, HO-2) (espectro 6b); **^{13}C RMN** ($CDCl_3$, 100 MHz) δ(ppm) 149.9 (C-1), 165.5 (C-2), 107.7 (C-3), 165.1 (C-4), 117.4 (C-5), 104.3 (C-6), 172.1 (C-7), 193.9 (C-8), 52.3 (C-9), 20.0 (C-10), 10.6 (C-11) (espectro 6d); **EM FAB** *m/z* (% abundancia relativa) 225 ($[M+H]^+$, 63); 224 ($[M]^+$, 58), 209 ($[M–Me]^+$, 6), 194 ($[209–Me]^+$, 12), 193 ($[M\text{-}MeO]^+$, 87), 165 ($[M\text{-}COOMe]^+$,13), 164 ($[193–CHO]^+$, 25), 155 (38), 154 (100), 152 (16), 138 (40), 137 (68), 136 (76) (espectro 6e); **EM HRESI** [IT-TOF (modo ión negativo)] *m*/*z* 223.0585 $[M\text{-}H]^-$, (calculado para $C_{11}H_{12}O_5$, 223.0612) (espectro 6f).

▪ Obtención del orselinato de metilo (VII) a partir de la fracción C

La fracción C (3139 mg) se sometió a recristalizaciones sucesivas en mezcla $CHCl_3$ - AcOEt (90:10) hasta obtener el compuesto **VII** (2008 mg) como cristales transparentes, solubles en metanol, $CHCl_3$ y DMSO; pf (°C) 138-139; **UV** (MeOH) λ_{max} 220 (3.68) y 252 nm (3.69); **IR** (KBr) ν_{max} 3369, 3311 (OH), 1642 (C=O), 1504 (C=C), 1446 (C=C o CH_3), 1381 (C=C o CH_3), 1313 (C=C o CH_3), 1267 (C-O), 1164 (C-O), 1114 (C-O) cm^{-1} (espectro 7a); **^{1}H RMN** ($CDCl_3$, 400 MHz) δ (ppm), 2.45 (3H, s, 9-Me), 3.91 (3H, s, 7-OMe), 6.23 (1H, d, *J*=2.4, H-3), 6.28 (1H, dd, *J*=2.4, H-5), 9.10 (1H, s, HO-4), 11.63 (1H, s, HO-2) (espectro 7b); **^{13}C RMN** ($CDCl_3$, 100 MHz) δ (ppm), 145.3 (C-1), 167.3 (C-2), 102.6 (C-3), 164.2 (C-4), 113.3 (C-5), 106.4 (C-6), 173.9 (C-7), 53.2 (C-8), 25.2 (C-9) (espectro 7c); **EM FAB** *m/z* (% abundancia relativa) 183 ($[M+H]^+$, 77), 182 ($[M]^+$, 49), 167 (20), 155 (29), 154 (90), 137 (65), 136 (82), 107 (41), 91 (40), 71 (38), 69 (60), 57 (100) (espectro 7d).

▪ Obtención del polihidroxialcohol (VIII) a partir de la fracción H

De la fracción H precipitó un sólido cristalino color crema (2140 mg) cuya recristalización sucesiva de metanol permitió obtener al compuesto **VIII** (488 mg) como cristales traslúcidos de color rosado solubles en agua; pf (°C) 100.0 - 101.5; **UV** (MeOH) λ_{max} (log ε) 225 nm (3.68); **IR** (KBr) ν_{max} 3298 (OH alifático), 2937, 2918, 2735 y 2553 (H-C alifático), 1441 1373, 1317, 1258, 1209, 1140, 1099, 1083 y 1049 (C-H o C-C alifático), 1024 (C-O) cm^{-1} (espectro 8a); **^{1}H RMN** (D_2O, 400 MHz) δ (ppm), 3.58 (1H, dd, *J* 2.10, 8.31), 3.67 (2H, m, *J* 6.26, 12.47), 3.75 (1H, m, *J* 2.89, 6.26), 3.84 (2H, dd, *J* 2.89, 11.64), 3.93 (1H, m, *J* 3.95, 6.26), 4.78 (5H, s, -OH) (espectro 8b); **^{13}C RMN** ($CDCl_3$, 100 MHz) δ (ppm), 73.3 (-CH), 65.9 ($-CH_2$), 73.8 (-CH), 65.8 ($-CH_2$), 71.1 (-CH) (espectro 8c); **EM FAB** *m/z* (% abundancia relativa) 156 (10), 155 (35), 154 (100), 137 (57), 136 (54), 107 (30), 97(35), 95 (38), 83 (45), 71 (52), 69 (67), 57 (93) (espectro 8d).

2.2 Ensayos Biológicos

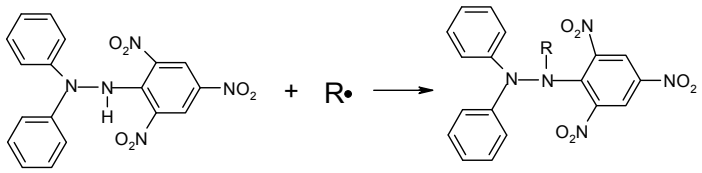
2.2.1 Procedimientos experimentales generales

2.2.1.1 Bioautografía directa para la determinación de la actividad antioxidante en las fracciones

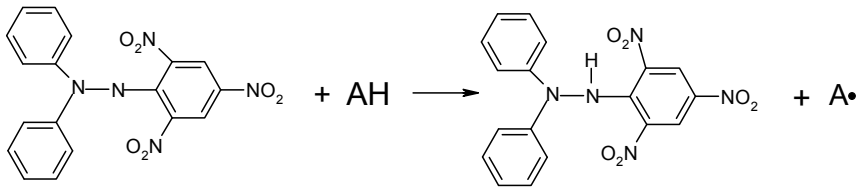
Los ensayos para la determinación cualitativa del poder captador del radical libre DPPH de las fracciones primarias de los líquenes *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida,* se efectuaron siguiendo el método bioautográfico en CCD reportado por Cuendet *et al*., (1997).
Las fracciones primarias liquénicas a evaluar (1 a 3 mg) disueltas en el solvente correspondiente (100 a 200 µL) se aplicaron sobre cromatofolios de gel de sílice. La aplicación de la muestra se realizó en dos placas independientes (placa 1 y 2), la primera utilizada para evaluar la actividad antioxidante y la segunda como control de la elución para evidenciar los componentes de la muestra. Las placas se eluyeron en el sistema C o G de acuerdo a la polaridad de la muestra, permitiendo la evaporación del disolvente una vez concluido el proceso cromatográfico. La placa 1, se asperjó con una solución del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH$^{\bullet}$) en matanol (0.0126 M), mientras que la placa 2, se asperjó con solución acuosa de ácido sulfúrico (20 %) con posterior calentamiento a 110 °C. Como control positivo se empleó el antioxidante comercial butilhidroxitolueno (BHT). El potencial antioxidante de las muestras se evidenció a partir de la aparición de manchas blancas o amarillentas (debidas a la reducción del DPPH por la muestra) sobre un fondo morado en la placa cromatográfica 1 (debido a la no reacción del DPPH y la muestra).

2.2.1.2 Cuantificación del poder captador del radical libre DPPH de extractos y compuestos puros aislados

La cuantificación del poder captador del radical libre DPPH$^{\bullet}$ de los extractos metanólicos y compuestos puros aislados de los líquenes *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum*, se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Brand-Williams *et al.,* (1995), a partir de la determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}), que indica la concentración necesaria de antioxidante para que la concentración inicial del radical libre disminuya en un 50 %, de acuerdo a las siguientes reacciones:



Reacción 1
(R•): **radical**



Reacción 2
(AH): antioxidante, DPPH•, (A•): radical del antioxidante

La reacción se monitoreó a partir de la disminución de la concentración de DPPH• con el tiempo, calculada de acuerdo a la ecuación (1)

$$Abs_{515nm} = 9.55x10^{-3}\,[DPPH^{\bullet}] + 1.21x10^{-2} \qquad \textbf{Ecuación 1}$$

Dicha ecuación corresponde a la curva de calibración establecida a partir de datos de absorbancia vs concentración de DPPH• a una longitud de onda de 515 nm (longitud de máxima absorción del radical DPPH•) y una temperatura controlada de 25.0 ^{o}C ± 0.01 ^{o}C, dentro de un rango de concentración de 10 - 100 μM. Para tal fin se prepararon por triplicado, soluciones stock del DPPH• en metanol leídas a la longitud de onda indicada.
Con el fin de obtener la CE_{50} para los extractos y compuestos puros derivados de estos, se sometió a reacción la muestra a evaluar (metabolito aislado ó patrón: BHT o ácido ascórbico) con el radical DPPH• a diez relaciones de concentración diferentes, [muestra a evaluar] / [DPPH•] en un rango entre: 1- 500 ppm y 70 – 95 μM respectivamente.

La mezcla resultante se agitó y de inmediato se le midió la absorbancia a 515 nm (espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV1700). Esta primera lectura fue considerada como el tiempo inicial de reacción. Los valores de absorbancia obtenidos a lo largo del tiempo de reacción se interpolaron en la ecuación 1 a fin de determinar la [DPPH•]. La reacción se monitoreó hasta obtener un valor constante de [DPPH•], lo cual permitió el cálculo del porcentaje remanente de radical DPPH• (% Rem DPPH•) para cada solución mediante la ecuación 2.

$$\%\,\mathrm{Re}\; mDPPH\bullet = \frac{[DPPH\bullet]}{[DPPH\bullet]i} * 100 \qquad \textbf{Ecuación 2}$$

[DPPH•]: Concentración remanente de DPPH al reaccionar con muestra.
[DPPH•] i: concentración de DPPH inicial en el tiempo cero.

La CE_{50}, se determinó construyendo una gráfica de la relación de concentraciones entre la muestra y el radical libre ([muestra]/[DPPH•]) vs. el % Rem DPPH•, procesando la gráfica a través del programa Table Curve (Windows V.1., Jandel Scientific, 1988-1992). Las CE_{50} de las muestras evaluadas se compararon frente a las CE_{50} de antioxidantes comerciales conocidos (BHT y ácido ascórbico)

2.2.1.3 Determinación de la reactividad de los compuestos a partir de su estudio cinético frente al radical libre DPPH•

La reactividad de los compuestos aislados como captadores del radical libre DPPH•, se evaluó mediante la determinación de la constante de velocidad de reacción (K_2) entre los compuestos y el radical DPPH•, para la reacción entre cada compuesto y el radical DPPH•, (Suja *et al.,* 2004), a una temperatura controlada de 25.00 °C ± 0.01°C, realizando lecturas seguidas una tras otra durante una hora.

Para tal fin se permitió la reacción entre el metabolito y el DPPH• a diferentes relaciones de concentración $[Metabolito]_0/[DPPH•]_0$ en un rango de 10:1 a 100:1, a fin de asegurar que la concentración inicial del radical fuese mucho menor que la de la muestra: $[DPPH•]_0 <<< [muestra]_0$. (Suja *et al.,* 2004). Bajo estas condiciones la reacción sigue una cinética de *pseudo*-primer orden, (Mukai *et al.*, 1993; Shi & Niki, 1998; Logan, 1998; Espin *et al.*, 2000), de acuerdo a las ecuaciones que se describen a continuación:

$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \qquad \textbf{Reacción 2}$$

$$[DPPH•] = [DPPH•]_0 e^{-Kobs\ t} \qquad \textbf{Ecuación 3}$$

$$\ln [DPPH•] = \ln [DPPH•]_0 - K_{obs}\ t \qquad \textbf{Ecuación 4}$$

$$-d[DPPH^{\bullet}]_t / dt = K_{obs} * [DPPH^{\bullet}]_t = k_2 * [AH]_o * [DPPH^{\bullet}] \qquad \textbf{Ecuación 5}$$

La ecuaciones 3 y 4 representan la cinética para la reacción de *pseudo*-primer orden, en donde K_{obs} es la constante de velocidad para la reacción 2, a la temperatura de trabajo.
La constante de velocidad de segundo orden (K_2), se calculó a partir de la constante de velocidad de *pseudo*-primer orden $K_{obs.}$ y de la concentración inicial de metabolito secundario $[AH]_o$, considerada constante bajo las condiciones de la reacción según la ecuación 5. La pendiente K_{obs} se determinó construyendo gráficas de ln DPPH• vs tiempo para la cinética de reacción de cada metabolito con el radical DPPH•.
Cada una de las constantes k2 de los metabolitos, se obtuvo como el promedio de tres determinaciones independientes, y se comparó estadísticamente frente al antioxidante comercial BHT.

2.2.1.4 Determinación del poder reductor férrico de extractos y compuestos puros

La determinación del poder reductor férrico de los extractos y sustancias liquénicas de *S. strictum* var. *compressum y L. pallida*, se realizó de acuerdo a la metodología que se describe a continuación, (Martínez, 2007): soluciones de concentración creciente (5 a 1000 ppm) de extracto, sustancia liquénica o control en metanol (1mL), se mezclaron con buffer de fosfato (2.5 mL, 0.2 M a pH 6.6) y $K_3Fe(CN)_6$ (2.5 mL, 1 %) incubando por 20 min a 50.00 ^oC. Concluído esto, a cada solución se le adicionó ácido tricloroacético (2.5 mL, 10 %) y de la solución resultante se tomó una alícuota (2.5 mL) que se mezcló con agua destilada (2.5 mL) y $FeCl_3$ (0.5 mL, 0.1 %) para posteriormente determinarle la absorbancia a 700 nm. Los aumentos en los valores de absorbancia de la mezcla de reacción indicaron un aumento del poder reductor férrico de la muestra. Como controles se utilizaron los antioxidantes alfa tocoferol, BHT y ácido ascórbico

2.2.1.5 Determinación de la inhibición de la peroxidación lipídica de extractos y compuestos puros

La capacidad de los extractos y compuestos aislados de *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida* para inhibir la peroxidación lipídica de una emulsión de ácido linoléico, se llevó a cabo por el método del tiocianato. (Gulcin *et al*., 2002).
Se prepararon soluciones de concentración creciente (5 a 1000 ppm) de muestra (extracto o sustancia liquénica) o control (alfa tocoferol, BHT y ácido ascórbico) en

metanol. Una alícuota de cada solución (1 mL) se adicionó a una emulsión de ácido linoléico en buffer de fosfatos (2.5 mL, 0.04 M, pH 7.0) incubando a 37.0 °C. Diariamente, 0.1 mL de esta solución se diluyó con metanol (9.7 mL) y se adicionó $FeCl_2$ (0.1 mL, 1 % p/v) y tiocianato de amonio (0.1 mL, 10 % p/v) para medir su absorbancia a 500 nm. La cantidad de peróxido producida en cada muestra a varios intervalos de tiempo de incubación, se determinó hasta el día siguiente, tiempo en el cual el control (libre de muestra) alcanzó el máximo valor de absorción.
El % de inhibición de la peroxidación del ácido linoléico (% IAL) se calculó con base en la ecuación 6.

$$\%IAL = 1 - \frac{[Am]}{[Ac]} * 100 \qquad \textbf{Ecuación 6}$$

Am= Absorbancia muestra, Ac= Absorbancia control

2.2.1.6 Determinación del efecto protector de las sustancias liquénicas sobre el ADN sometido a estrés oxidativo por el radical hidroxilo

La capacidad de las sustancias liquénicas aisladas para proteger al ADN frente al daño oxidativo generado por el radical hidroxilo (OH•) se determinó por el método de "degradación del ADN inducida por fotólisis de peróxido de hidrógeno al UV", (Russo *et al*., 2008), con ligeras modificaciones. En tubos de polietileno se adicionó el plásmido artificial ADN pUC18 (33 µM), los compuestos a evaluar (100 y 200 µM), H_2O_2 (100 mM) y PBS 1x (pH 7.4). Una vez homogenizada la mezcla, las muestras se irradiaron con luz UV (254 nm, 5 min, 22 °C) y acto seguido se adicionó buffer carga (1.0 µL, consistente en azul de bromofenol 0.25 %, xilen cianol FF 0.25 % y glicerol 30 %). Las muestras se analizaron por electroforesis de agarosa (1 %) en buffer de Tris-borato (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA), incluyendo una muestra del plásmido sin tratamiento empleada como control en cada elución electroforética (75 V/cm, 3 horas). Al término de la elución, el gel teñido con bromuro de etidio (1 µg/mL; 30 min) fue fotografiado con un equipo Polaroid 667.

2.2.1.7 Determinación del efecto citoprotector de los compuestos aislados frente al estrés oxidativo causado por el radical hidroxilo (OH•)

El efecto citoprotector de los compuestos aislados frente al estrés oxidativo causado por el radical hidroxilo formado *in situ* (por fotólisis de H_2O_2al UV 254 nm) se determinó de acuerdo a metodología descrita por Russo *et* al., (2008). Para ello, las líneas celulares de la tabla 2-10, se expusieron al daño oxidativo generado por el radical OH•.

Tabla 2-10: Líneas celulares del ensayo de citoprotección de extractos y compuestos

Células	Nombre
HaCat	Queratinocitos humanos inmortalizados
Neuronas	Cultivo primario de neuronas murinas
HeLa	Línea celular de adenocarcinoma de cervix uterino

Las líneas celulares HaCat y HeLa se crecieron en el medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM, Gibco Invitrogen), suplementado con suero fetal bovino (10 % v/v), penicilina G sódica (100 unidades/mL), estreptomicina B (25 ppm), piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales (1x: 0.1 mM) y $NaHCO_3$ con Hepes 1 M.

La suspensión celular de HaCat o HeLa en DMEM se adicionó desde el día anterior al experimento, en placas estériles de 96 pozos, inoculando 7 x 10^3 células adherentes por pozo (200 µL) e incubando a 37 ^oC en atmósfera húmeda, al 5 % de CO_2.

El cultivo de neuronas granulares se preparó según el método descrito por Moran (2010), a partir de la disociación del tejido del cerebelo de ratas wistar de 8 días de nacidas. La suspensión celular (218x10^4 células/mL), en medio basal Eagle's (Sigma-Aldrich), suplementado con suero fetal bovino inactivado (10 % v/v), glutamina (2 mM), KCl (25 mM), penicilina (50 U/mL), y estreptomicina (50 mg/mL), se adicionó en placas de 96 pozos (200 µL) previamente cargadas con poly-L-lysine (5 mg/mL), dejando en incubación por 24 h (37 ^oC atmósfera húmeda, 5 % de CO_2). Concluido este tiempo se adicionó citosina arabinósido (10 µM, Sigma-Aldrich), para frenar el crecimiento de los astrocitos y se permitió que el cultivo de neuronas proliferara por 5 días.

El día del experimento se le adicionó el compuesto (20 a 320 µM) o extracto a evaluar a cada una de las cajas que contenían las células (HaCat, neuronas, HeLa), posteriormente estas fueron expuestas estrés oxidativo por adición de H_2O_2 e irradiación con luz UV (254nm). Acto seguido el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco y se incubó hasta el día siguiente. La viabilidad celular se determinó por el método del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), (Mosmann, 1983, Carmichael *et al*., 1987), midiendo la densidad óptica del formazán generado a 540 nm en un lector multi-modal de microplacas de alto desempeño (BioTek Synergy HT), en el modo de detección absorbancia UV-visible.

A partir de los datos de absorbancia, se calculó el porcentaje el porcentaje de viabilidad celular, comparando frente a una muestra control de células no expuestas a estrés oxidativo, cuya viabilidad se considero del 100%; La actividad citoprotectora de los compuestos se determino al compararlos con el control de células expuestas a estrés oxidativo (OH•) sin previa adición de ninguna de las muestras a evaluar.

2.2.2 Cuantificación del contenido fenólico total en los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum*

El contenido fenólico total de los extractos se cuantificó por el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC). (Martínez, 2007). A mezclas del extracto (500 µL de 200 a 700 mg/mL en MeOH) con el reactivo FC (2.5 mL, diluido 1:10 v/v en agua) se les adicionó solución de Na_2CO_3 (2 mL, 7.5 %) y se sometieron a incubación a 30 °C por 90 min. Transcurrido este tiempo, a cada solución se le determinó la absorbancia a 765 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos de absorbancia de las mezclas se interpolaron en una curva de calibración construida a partir de diferentes concentraciones de ácido gálico (AG) (ecuación 7, anexo 1), para expresar el contenido fenólico total como equivalente de AG (mg EAG / g muestra).

$$\text{Absorbancia mezcla} = 0.0122\,[\text{EAG}] - 0.0156 \quad \textbf{Ecuación 7}$$

2.2.3 Determinación de la actividad citotóxica de extractos y compuesto puros

Según el caso las células se crecieron en el medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), suplementado con $NaHCO_3$ y Hepes 1M o en el medio DMEM (tabla 2-11). El día previo al experimento, se adicionaron suspensiones celulares ($7x10^3$ células adherentes por pozo) a placas estériles de 96 pozos, incubando durante 24 h (37 ^oC en atmósfera húmeda, al 5 % de CO_2). El día del experimento, se adicionaron a las placas, diluciones frescas en serie de los extractos y compuestos de líquenes en medio RPMI o DMEM (2.0 a 80.0 μg/mL) y se incubaron por 48 h. Transcurrido este tiempo, se determinó la viabilidad celular por el método del MTT, (Mosmann, 1983; Carmichael *et al*., 1987), para cada concentración de muestra evaluada Como control positivo se utilizó cisplatino y como negativo DMSO y el medio de cultivo. Los resultados se reportan como el promedio de tres ensayos independientes evaluando cada concentración por sextuplicado.

Tabla 2-11: Panel de líneas celulares del ensayo de citotoxicidad

Línea celular	Nombre	Medio
HaCat	Queratinocitos humanos inmortalizados	DMEM
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	
HeLa	Adenocarcinoma cérvico uterino	
K562	Eritroleucemia	
PC3	Adenocarcinoma de próstata	RPMI

Todas las líneas celulares son de origen humano

La CI_{50} (concentración inhibitoria del crecimiento del 50 % de la población celular) de los extractos y los compuestos puros, se determinó a partir de la construcción de curvas concentración de compuesto vs. % viabilidad celular, obtenidas del promedio de tres experimentos independientes. Con la finalidad de determinar la selectividad del efecto citotóxico de los compuestos por las células tumorales frente a las células normales, se calculó el índice de selectividad (IS), consistente en la relación entre la CI_{50} del tratamiento sobre la línea celular tumoral (MCF-7, HeLa, K562 y PC3) y la CI_{50} del tratamiento sobre la línea celular HaCat, la cual es una línea celular no tumoral. (Bezivin *et al*., 2003)

Capítulo 3 Resultados y Discusión

3.1 Preselección y selección de especies *S. strictum* y *L. pallida*

Los líquenes se han empleado desde la antigüedad con fines curativos, alimenticios y artesanales. La investigación de estos organismos durante el último siglo ha permitido descubrir que son una fuente original de diversas sustancias con estructuras exclusivas que presentan propiedades biológicas relevantes, incluyendo la actividad antioxidante, (Gulcin *et al*., 2002; Toledo *et al*., 2003; Odabasoglu *et al*., 2004; Halicia *et al*., 2005; Behera *et al*., 2005; Odabasoglu *et al*., 2005; Gulluce *et al*., 2006; Aslan *et al*., 2006; Valencia *et al*., 2007; Díaz, 2008; Luo *et al*., 2009, 2010; Rankovič *et al.,* 2010; Kosanić *et al.,* 2010; Kosanić & Ranković*,* 2011), cuya investigación se ha visto intensificada en las últimas décadas dado el papel de los agentes antioxidantes en la protección tanto de sistemas biológicos afectados por estrés oxidativo, como en la preservación de productos farmacéuticos y alimentos también afectados por degradaciones de este tipo. Resulta necesario por lo tanto, encontrar sustancias antioxidantes novedosas, de preferencia de origen natural, que sean más potentes e inócuas que las existentes, ya que muchos antioxidantes comerciales se han restringido como consecuencia de su hepatotoxicidad y carcinogenicidad. (Haraguchi, 2001; Zainol *et al*., 2003; Denisov & Afana.s'ev, 2005). En este sentido, los líquenes resultan candidatos promisorios para subsanar la demanda de agentes antioxidantes novedosos de origen natural. (Menéndez, 2001; Haraguchi, 2001; Polachira *et al*., 2004; Bafna & Mishra, 2005 Denisov & Afana.s'ev, 2005; Sinko, 2006; Morales *et al*., 2009; Masaki, 2010; Krishnaiah *et al*., 2010; Halliwell, 2011)

Con base en lo anterior y dada la gran diversidad liquénica de Colombia, escasamente estudiada desde los puntos de vista químico y biológico, en este trabajo doctoral se llevó a cabo el estudio químico y de actividad antioxidante y citotóxica de los líquenes *Lobariella pallida y Stereocualon strictum* con el fin de aportar al conocimiento de estos organismos.

La presente investigación comenzó con el estudio perliminar de cinco especies de líquenes colombianos: *Lobariella pallida*, *Everniastrum sorochelium, Stereocualon strictum, Stereocualon pomiferum* y *Stereocaulon novogranatensis*, cuya selección se realizó con base en una revisión en el Herbario Nacional Colombiano donde se tomó en cuenta tanto la abundancia de las especies liquénicas en la región de colecta como la facilidad de accesibilidad a la misma. Cabe mencionar que las cinco especies seleccionadas poseen alta distribución en Colombia, abarcando desde las regiones tropicales hasta los páramos.

Una vez seleccionado de forma primaria el material liquénico, se prepararon extractos metanólicos de las cinco especies objeto de estudio y se llevó a cabo la determinación

cuantitativa de su actividad antioxidante, medida por el poder captador de radicales libres, en el modelo del radical DPPH• (Tabla 3-1). Dicho modelo es muy utilizado y recomendado para evaluar esta actividad en productos de diversos orígenes dada su facilidad de realización y la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados. (Amarowicz *et al*., 2004; Behera & Verma, 2006; Siddhuraju & Becker, 2007; Niki, 2010; Özyürek *et al*., 2011).

Tabla 3-1: Poder captador de radical DPPH• de los extractos

Muestra	CE_{50}
	[muestra ppm] / [DPPH pm]
L. Pallida	0.85
E. Sorocheilum	3.45
S. strictum	0.96
S. pomiferum	1.05*
S. novogranatensis	2.00*
BHT	0.15
Ácido ascórbico	0.27

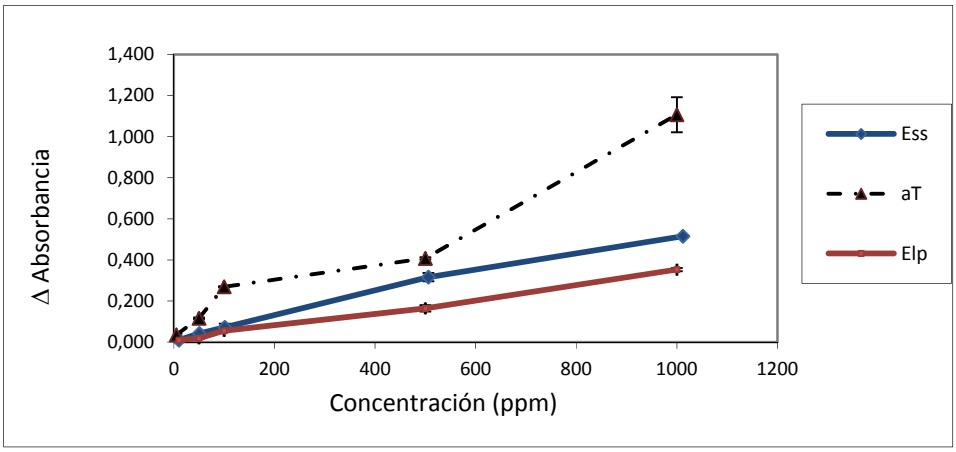
* Robayo *et al*., 2008

De las cinco especies evaluadas *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum*, resultaron ser las más activas en éste modelo indicando que poseen capacidad captadora de radicales libres.

Las especies fueron identificadas taxonómicamente con base en las claves reportadas en la literatura, lo que permitió determinar que *S. strictum* correspondía a la variedad c*ompressum* mientras que el otro especímen objeto de estudio se clasificó como *L. pallida.*

La actividad antioxidante de los extractos se desafió mediante la determinación de su poder reductor férrico (Gráfica 3-1) y su capacidad de inhibir la peroxidación lipídica (Gráfica 3-2), con el primer ensayo se midió la capacidad de los extractos para reducir el ión férrico a ión ferroso, lo que indica que son capaces de donar electrones a especies oxidadas, inactivándolas y convirtiéndolas en especies estables no reactivas, dando fin a la reacción en cadena característica de los procesos oxidativos; por otro lado, a través del ensayo de inhibición de la peroxidación lipídica se determinó la capacidad de los extractos para reducir la cantidad de peróxidos lipídicos.

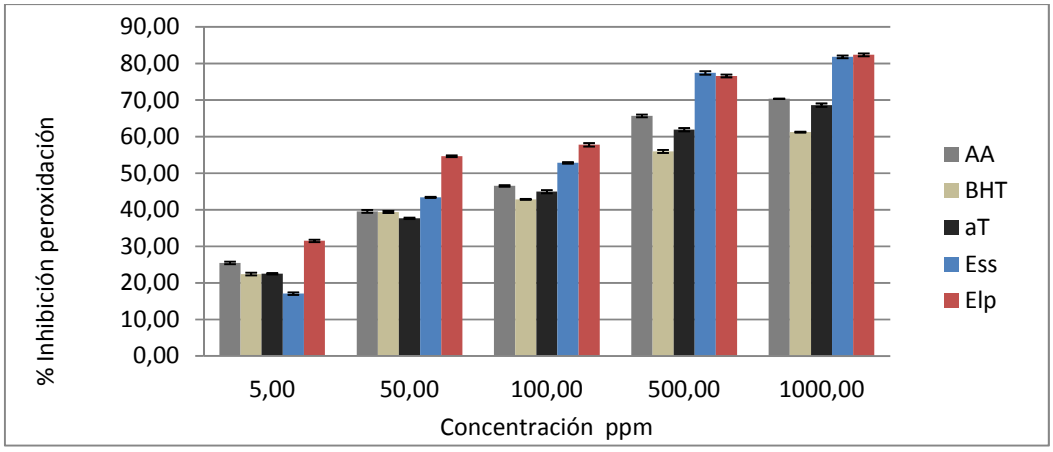
La gráfica 3-1 muestra el comportamiento reductor de los extractos comparado con el efecto del patrón de alfa tocoferol; los resultados evidencian que el patrón de alfa tocoferol es significativamente más activo ($p<0.01$) como agente reductor que los dos extractos y también que el extracto de *S. strictum* (ESs) presenta un poder reductor significativamente mayor que el del extracto de *L. pallida* (ELp), excepto a la concentración de 100 ppm donde los dos extractos mostraron la misma actividad ($p<0.01$).



ESs: extracto de *S. strictum,* ELp: extracto de *L. pallida,* aT: patrón de alfa tocoferol

Gráfica 3-1. Poder reductor férrico de extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum*

En relación a la capacidad de los extractos para reducir la cantidad de peróxidos lipídicos, los resultados (gráfica 3-2) evidencian que a concentraciones crecientes de *L. pallida este extracto* alcanza porcentajes significativamente mayores ($p<0.01$) de inhibición de la peroxidación lipídica de la emulsión del ácido linoléico (% IAL) en comparación con los patrones ácido ascórbico, BHT y α-tocoferol. Por otro lado, el extracto de *L. pallida* (ELp) es significativamente más activo ($p<0.01$) que el de *S. strictum* (ESs) a una concentración de 100 ppm, mientras que los dos extractos presentan la misma actividad ($p<0.01$) a las concentraciones de 500 y 1000 ppm.



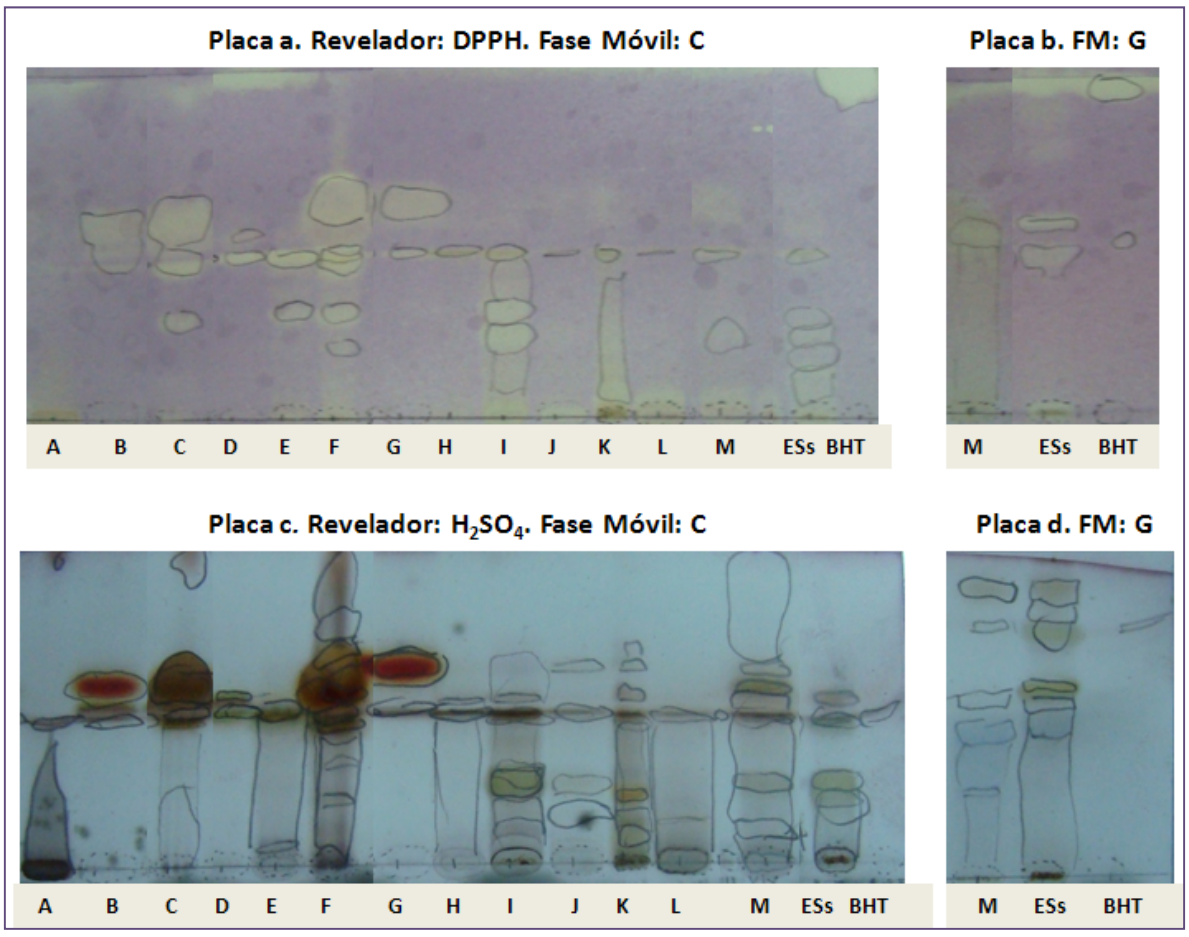
ESs: extracto de *S. strictum,* ELp: extracto de *L. pallida,* aT: patrón de alfa tocoferol, AA: patrón de ácido ascórbico, BHT: patrón de butil hidroxi tolueno

Gráfica 3-2. Inhibición de peroxidación lipídica ejercida por los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum.*

Dada la potencialidad de los extractos metanólicos *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum* como fuente de agentes antioxidantes, se decidió someterlos a estudio químico bioguiado con la finalidad de aislar las sustancias responsables de dicha actividad.

3.2 Estudio químico bioguiado de *S. strictum* var. *compressum*

El extracto activo de *S. strictum* var. *compressum,* se fraccionó por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando el método bioautográfico del DPPH$^{\bullet}$ (Cuendet *et al*., 1997), para monitorear de manera cualitativa la actividad antioxidante de las fracciones primarias. A través del análisis de la placas cromatográficas de prueba, (placas a y b figura 3-1), reveladas con el radical DPPH•, se detectó la actividad captadora de radicales libres en las fracciones B, C, D, E, F, G, I, K y M, lo cual se apreció por el vire de coloración (púrpura a amarillento) del DPPH$^{\bullet}$, como consecuencia de su reducción y estabilización por transferencia de átomos de hidrógeno provenientes de los constituyentes de las fracciones primarias.

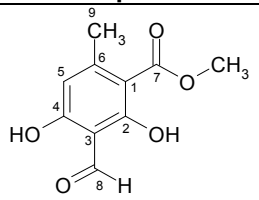
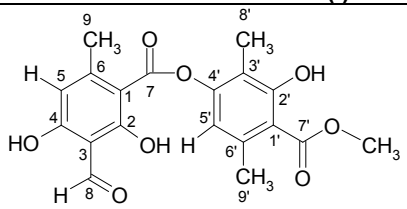
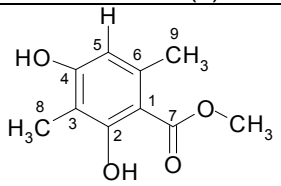
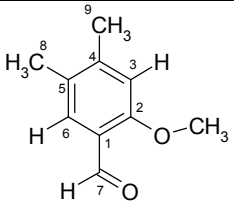
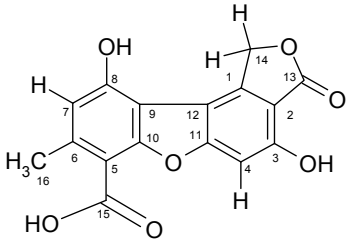


Arriba revelado con radical libre DPPH, abajo CCD testigo revelada con H_2SO_4

Figura 3-1. Bioautografía de las fracciones primarias del extracto metanólico de *S. strictum* var. *compressum*

Las fracciones primarias activas se sometieron a procesos de separación y purificación por cromatografía en columna y/o cristalización, conduciendo a la obtención de 5 compuestos (tabla 3-2), cuya estructura se determinó a través del análisis de sus datos espectroscópicos y espectrómetricos como: hematomato de metilo (**I**), atranorina (**II**), β-orcinol carboxilato de metilo (**III**), 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**), y ácido porfirílico (**V**)**.** Los compuestos **I**, **III** y **IV** son reportados por primera vez para la especie, mientras que la presencia de atranorina y ácido porfirílico se confirma para la misma. (Fox *et al*., 1969; Huneck, 1974).

Tabla 3-2: Sustancias liquénicas obtenidas de *S. strictum* var. *compressum*

Compuesto	Fracción primaria de orígen	Rendimiento (%)*
 Hematomato de metilo **(I)**	B, C, F , G y M	3.67
 Atranorina (**II**)	D	1.84
 β-orcinol carboxilato de metilo (**III**)	D	1.89
 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**)	E	0.22
 Ácido porfirílico (**V**)	M	0.98

*Rendimiento en relación a 30.89 g de material liquénico seco

3.2.1 Determinación estructural de los compuestos aislados de *S. strictum* var. *compressum*

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos conocidos: hematomato de metilo (**I**), atranorina (**II**), β–orcinol carboxilato de metilo (**III**) y ácido porfirílico (**V**), concuerdan con las descritas en la literatura (Huneck & Yoshimura, 1996; Rojas, 2002), a excepción de las señales de RMN para los carbonos C-1 (152.3 ppm), C-6 (103.8 ppm), C-8 (193,8 ppm), y C-9 (25.2 ppm) del hematomato de metilo, cuya asignación se realizó con base en el espectro de ^{13}C RMN en combinación con las correlaciones observadas en sus espectros HMQC y HMBC y resultó diferente de la previamente reportada: C-1 (103.9 ppm), C-6 (152.3 ppm), C-8 (25.1 ppm) y C-9 (193,9 ppm). (Huneck & Yoshimura, 1996; Rojas, 2002).

Para el β-orcinol carboxilato de metilo (2,4-dihidroxi-3,6-dimetilbenzoato de metilo), la asignación de los carbonos C-1 (140.1 ppm) y C-6 (105.2 ppm) también difirió de lo reportado: C-1 (105.3 ppm) y C-6 (140.2 ppm), (Hylands & Ingolfsdottir, 1985; Huneck & Yoshimura, 1996; Rojas, 2002), reasignándose los nuevos valores con base en las correlaciones observadas en los espectros HMQC y HMBC del mismo. De manera adicional, la estructura molecular de **III** se confirmó inequívocamente por análisis de difracción de rayos X (figura 3-2), concordando con lo reportado previamente, (Brehm *et al*., 1983): cristal de tipo monocíclico cuya estructura cristalina es estabilizada por interacciones intermoleculares a través de puentes de hidrógeno (C-H • • • O) y por fuerzas de van der Waals. De acuerdo a la vista esteroscópica proporcionada para la estructura molecular, se aprecia que el grupo OH sobre el C-2 se encuentra formando un puente de hidrógeno intramolecular con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo C-7.

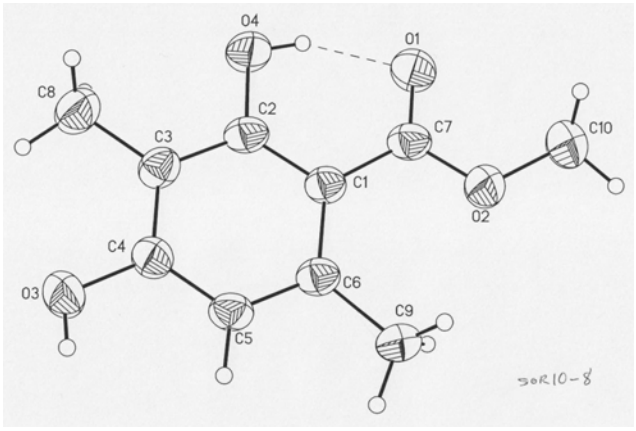


Figura 3-2. Vista estereoscópica de la estructura molecular del β-orcinol carboxilato de metilo (III), obtenida por difracción de rayos X

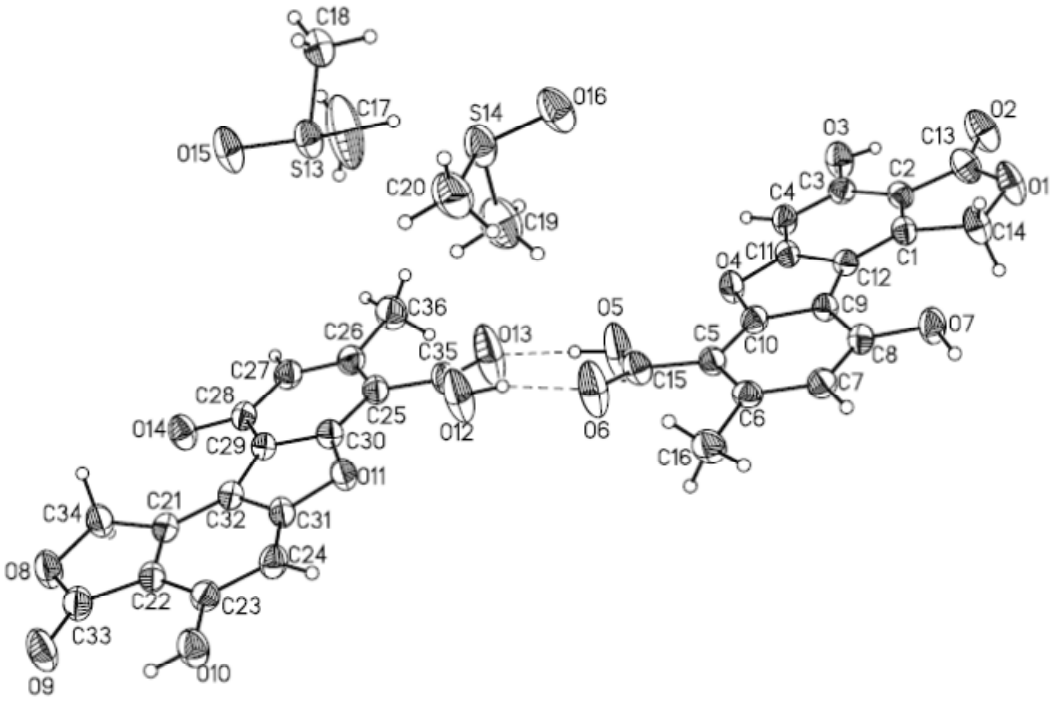
3.2.1.1 Determinación estructural del Ácido porfirílico (V)

A pesar de que el ácido porfirílico resultó un compuesto conocido y reportado para *S. strictum*, los datos espectroscópicos de ^{13}C RMN y la asignación de los mismos, (realizada con base en las correlaciones observadas en los espectros HMQC y HMBC), se reportan por primera vez en esta tesis doctoral (capitulo 2: 2.1.2.3. y tabla 3-3).

Tabla 3-3: Datos de RMN para el compuesto V

Posición	δ_H (m)	δ_C [b]	HMBC C → H
1		109.3	4, 14
2		142.6	14
3		159.8	4, 14
4	6.21 (s)	98.1	14
5		139.3	16
6		108.6	7, 16
7	5.77	111.9	16
8		152.9	7
9, 12		107.9	4, 14
10		156.6	16
11		156.3	4, 14
13		168.6	4, 14
14	4.75 (s)	69.1	
15		166.3	7, 16
16	1.62 (s)	21.2	7

Cabe mencionar que la estructura molecular del ácido porfirílico también se confirmó de manera inequívoca mediante el análisis de difracción de rayos X de sus cristales (figura 3-3).



Desplazamiento elipsoidal en un nivel de probabilidad del 50 %. Los átomos de hidrógeno se dibujan como círculos con un radio arbitrario

Figura 3-3. Vista estereoscópica de la estructura molecular del ácido profirílico (V), obtenida por difracción de rayos X

El sistema cristalino es de tipo triclínico, cuya estructura cristalina está estabilizada por una red tridimensional de puentes de hidrógeno e interacciones C-H· · · O. El ácido profirílico presenta geometría cristalina en el grupo espacial *P-1*. Los parámetros de la celda unitaria son: *a* = 11.0718 (17) Å, *b* = 13.191 (2) Å, *c* = 13.384 (2) Å, □ = 70.219 (3)°, *β* = 89.955 (3)°, □ = 69.626 (2)°, *D*x = 1.5254 Mg/m^3 y *Z* = 4. La posición de todos los átomos de hidrógeno fue calculada de acuerdo a estado de hibridación al átomo de carbono al que se encuentra unido y se empleó un modelo de cabalgata (riding model) en el refinamiento, con distancias C-H en el rango de 0.85 - 0.97 Å y Uiso(H) = 1.2Ueq(C). Los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo se encontraron en diferentes mapas de diferencia de densidad electrónica y se refinaron. La figura 3-4 muestra la disposición del empaquetamiento a lo largo del eje *c*, de la celda unitaria para el ácido porfirílico. La estructura cristalina es estabilizada por doce puentes de hidrógeno y varias interacciones intermoleculares C-H•••O.

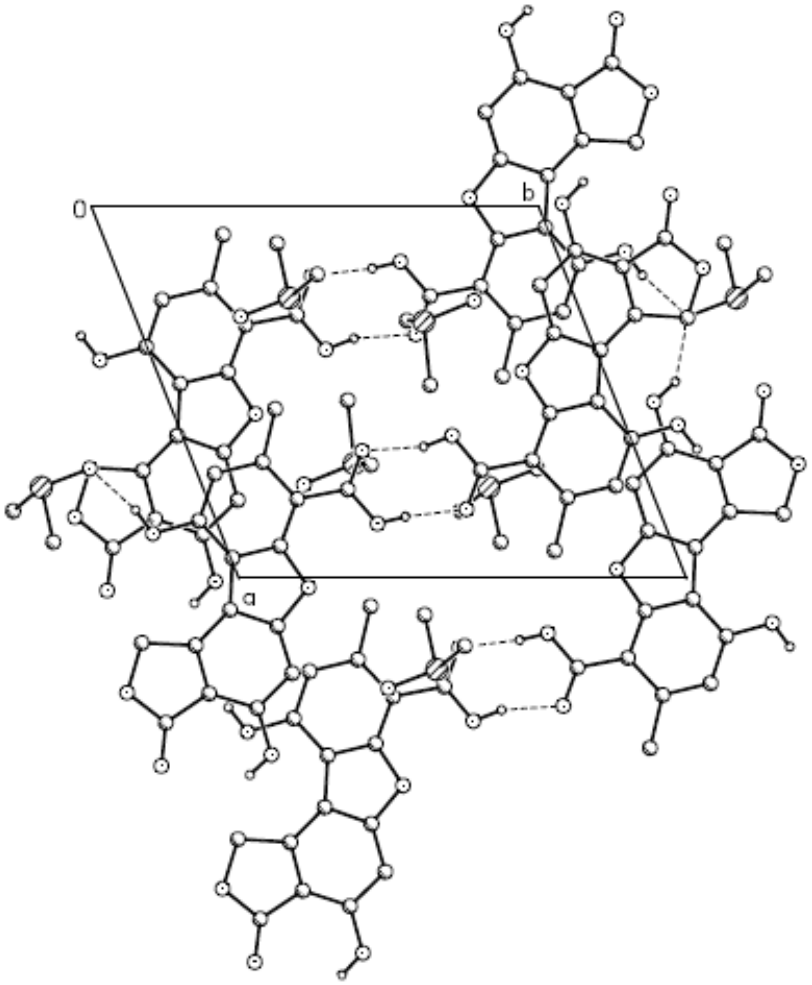


Figura 3-4. Estructura cristalina para ácido porfirílico (V), proyectada a lo largo del eje *c*

3.2.1.2 Determinación estructural de la stereocaulina: 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV).

El espectro de absorción al IR para el compuesto **IV** (espectro 4a), presenta bandas de absorción de tensión =C-H asociadas a su carácter aromático (ν_{max} 3000-2500 cm^{-1}), una banda característica de estiramiento C=O de grupo carbonilo (ν_{max} 1649 cm^{-1}), bandas de mediana intensidad asociadas a estiramiento C=C de dobles enlaces conjugados (ν_{max} 1579-1362 cm^{-1}), bandas de vibración de estiramiento C-O (ν_{max}1300-1000 cm^{-1}) y flexiones fuera del plano correspondientes a anillo aromático sustituido (ν_{max} 900-700 cm^{-1}).

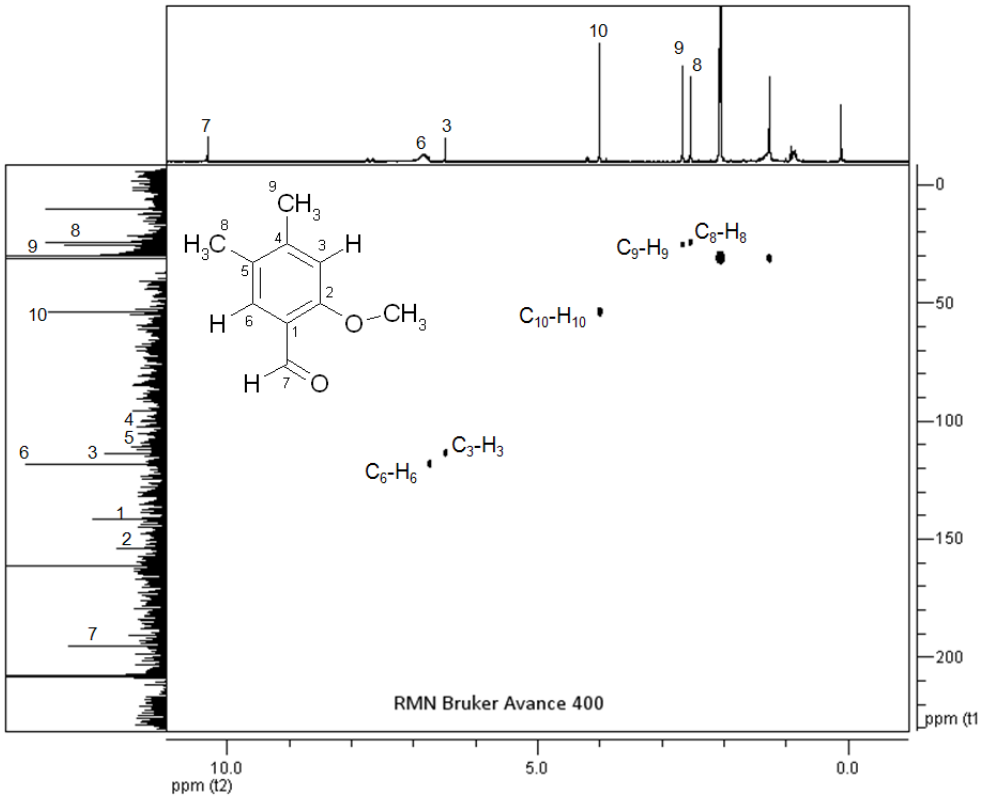
El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear indicó que **IV** es un compuesto aromático sustituido, cuyas señales diagnósticas se detallan en la tabla 3-4. En el espectro de ^{1}H RMN (espectro 4b), se evidencian seis señales simples que integran para un total de 12 hidrógenos, las cuales se asignaron de la siguiente manera: las señales en 2.53 y 2.66 ppm corresponden a dos grupos metilos sobre anillo aromático; la señal en 4.00 ppm corresponde a los hidrógenos de un grupo metoxilo; las señales en 6.49 y 6.74 ppm que integran cada una para un hidrógeno, corresponden a metinos de tipo aromático; y por último, la señal en 10.32 ppm corresponde a un hidrógeno de tipo aldehídico.

Tabla 3-4: Datos de RMN para el compuesto 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV)

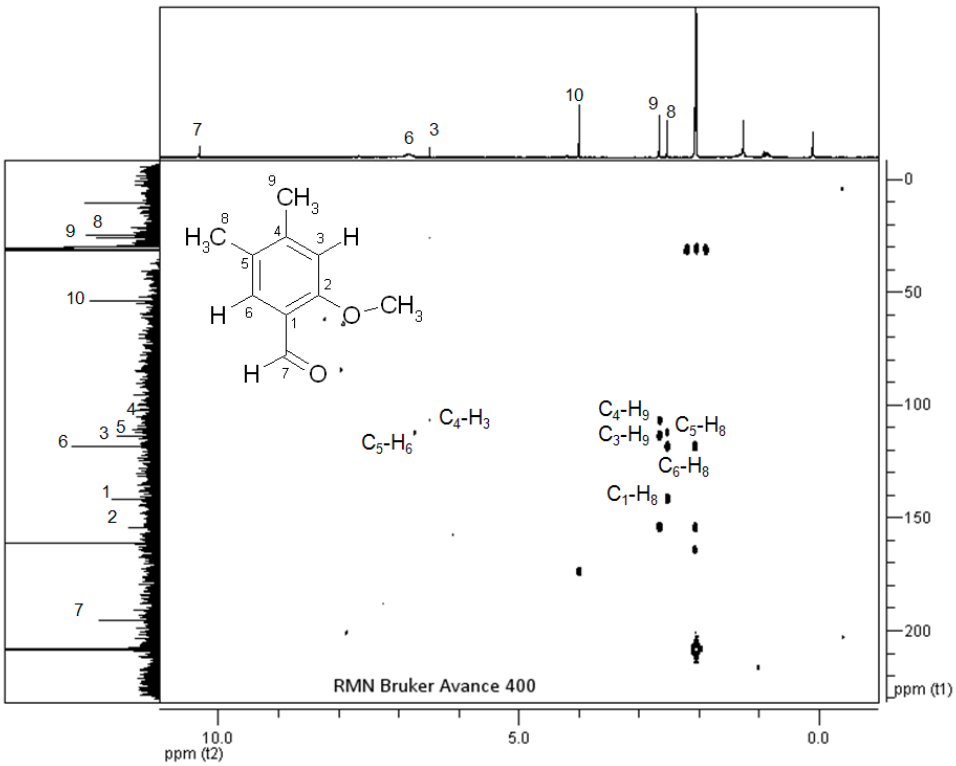
Posición	δ_H (m)	δ_C [b]	HMBC C → H
1		141.5	2.53
2		154.3	2.66
3	6.49 (s)	113.6	2.66
4		106.6	2.66, 6.49
5		112.3	2.53, 6.74
6	6.74 (s)	118.3	2.53
7	10.32 (s)	195.6	
8	2.53 (s)	24.7	
9	2.66 (s)	25.7	
10	4.00 (s)	53.9	

El espectro de ^{13}C RMN (espectro 4-c) presenta señales para diez átomos de carbono en la molécula de **IV**. A través del análisis de las correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMQC a un enlace de distancia, se asignaron las señales en 24.7 y 25.7 ppm para los dos grupos los dos metilos sobre el anillo aromático, mientras que la señal en 53.9 ppm se asignó al metoxilo sobre C-2. Las señales en 113.6 y 118.3 ppm corresponden a dos carbonos de metinos aromáticos y la señal en 195.6 ppm es característica de un grupo carbonilo de aldehído. Las señales de los carbonos restantes en el espectro ^{13}C RMN, se asignaron de acuerdo a las correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC (espectro 4-f)

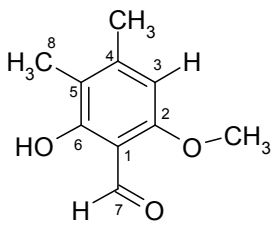
Espectro 4e. Espectro HMQC del compuesto 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV)



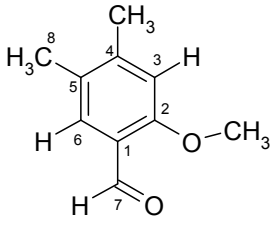
Espectro 4f. Espectro HMBC del compuesto 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV)



El espectro de masas por IE para **IV** (espectro 4-d) presenta dos iones moleculares posibles en 180 y 164 m/z, datos que en conjunto con el análisis espectroscópico realizado conducen a la proposición de dos estructuras probables:



Estructura a
180 g/mol



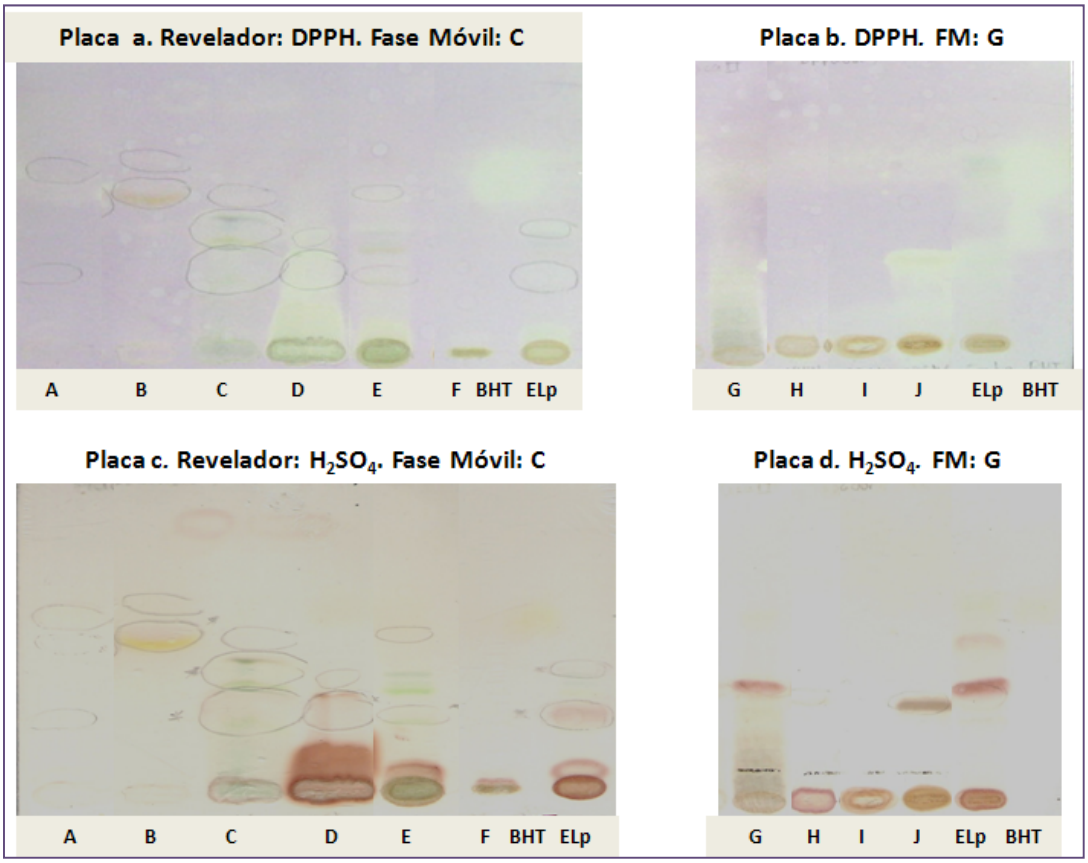
Estructura b
164 g/mol

Como se puede apreciar, en las estructuras propuestas se mantienen correlaciones de los espectros HMQC y HMBC similares dado que las diferencias entre ellas corresponden a la presencia de un grupo fenólico propuesto para la estructura **a**. Dado que muchas de las sustancias liquénicas se caracterizan por poseer grupos hidroxilo o sus derivados en las posiciones 2 y 6 del anillo aromático, como es el caso de la estructura **a**, sin embargo, en vista de que es más coherente que el desplazamiento químico del hidrógeno en 6.74 ppm se trate de un H aromático (estructura **b**) y no de un OH, que en este tipo de estructuras aparece alrededor de 12 ppm, se recurrió a la realización de la prueba de identificación de fenoles con cloruro férrico, con la finalidad de establecer cual estructura de las propuestas era la adecuada. En este caso una prueba positiva se evidencia por la aparición de una coloración azul a violeta característica de la formación de un complejo entre el fenol y el cloruro férrico. (Ahluwalia, 1997). Sin embargo, dicha prueba resultó negativa descartando la presencia de grupo fenol en la estructura de **IV**. A raíz de estos resultados se propuso la estructura **b** del 2-metoxi-4,5-dimetil benzaldehído para el compuesto (**IV** = 164 g/mol) (tabla 3-2). A partir del análisis del espectro de masas (espectro 4-d) para la estructura propuesta se puede apreciar que solamente a partir del ion molecular en 164 se puede observar la pérdida de 29 unidades, característico de un grupo aldehído y en el caso de los otros posibles iones moleculares se aprecian pérdidas de fragmentos de 16 unidades lo cual es poco probable.

3.3 Estudio químico bioguiado de *L. pallida*

El extracto metanólico activo de *L. pallida* se fraccionó por cromatografía en columna sobre gel de sílice empleando el método bioautográfico del DPPH$^{\bullet}$ (Cuendet *et al*., 1997), para monitorear de manera cualitativa la actividad antioxidante de las fracciones primarias. A través del análisis de las placas cromatográficas reveladas con el radical DPPH• (placa a y b, figura 3-5) se detectó que las fracciones primarias B, C, D, E, G y J contienen compuestos con actividad antioxidante que tienen la capacidad de transferir átomos de hidrógeno al DPPH•, reduciendo el radical y decolorándolo.

Las fracciones primarias activas se sometieron a procesos de separación y purificación por cromatografía en columna y/o cristalización, conduciendo a la obtención de tres compuestos (tabla 3-5), cuya estructura se determinó a través del análisis de sus datos espectroscópicos y espectrómetricos como: lobarielina (**VI**), orselinato de metilo (**VII**) y un polihidroxialcohol (**VIII**) (Ribitol o Arabitol o Xilitol). **VI** es un compuesto novedoso y en conjunto con **VII** y **VIII** resultan reportados por primera vez para la especie.



Arriba revelado con radical libre DPPH, abajo CCD testigo revelada con H_2SO_4

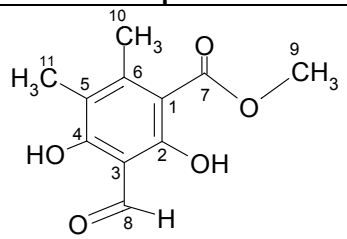
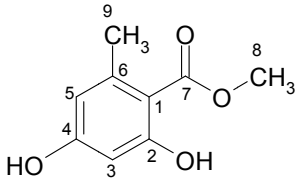
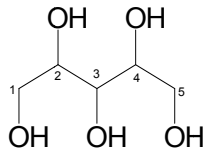
Figura 3-5. Bioautografía de las fracciones primarias del extracto metanólico de *L. pallida*

En la tabla 3-5 se muestra el rendimiento de los compuestos con relación al peso del material liquénico seco (14.64 g) y las fracciones primarias de donde provienen.

3.3.1 Determinación estructural de los compuestos aislados de *L. pallida*

Las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos **VII** y **VIII**, concuerdan con las descritas en la literatura para el orselinato de metilo (**VII**) (Huneck & Yoshimura, 1996; Rojas, 2002; Cuellar *et al.,* 2008), y para un polihidroxialcohol (**VIII**) (Huneck & Yoshimura, 1996). Sin embargo, para el caso de orselinato de metilo se reasignaron las señales de los carbonos del espectro ^{13}C RMN C-1 (145.3 ppm), C-3 (102.6 ppm), C-6 (106.4 ppm), de acuerdo a las correlaciones observadas en los espectros bidimensionales HMQC y HMBC, ya que presentaron valores de desplazamiento químico diferentes a lo reportado: ^{13}C RMN C-1 (100.4 ppm), C-3 (100.4 ppm), C-6 (143.3 ppm). C-1 (105.6 ppm), C-3 (101.3 ppm), C-6 (144.0 ppm). (Huneck & Yoshimura, 1996; Rojas, 2002; Cuellar *et al.,* 2008).

Tabla 3-5: Sustancias liquénicas obtenidas de *L. pallida*

Compuesto	Fracción	Rendimiento* (%)
 Lobarielina (**VI**)	B	0.41
 Orselinato de metilo (**VII**)	C	13.72
 Poli-hidroxialcohol (**VIII**)	H	14.62

*Rendimiento en relación a 14.64 g de material liquénico seco

La estructura molecular del orselinato de metilo (**VII**) se confirmó de manera inequívoca a través del análisis de difracción de rayos X (figura 3-6) de sus cristales. El cristal es de tipo monocíclico. La estructura cristalina es estabilizada por fuerzas de van der Waals.

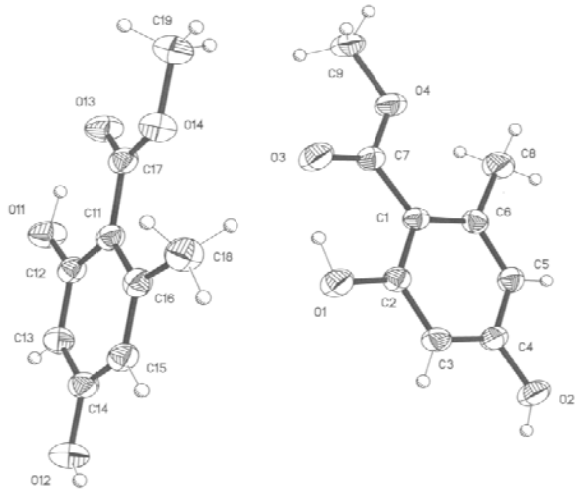


Figura 3-6. Vista estereoscópica de la estructura molecular del orselinato de metilo (VII), obtenida por difracción de rayos X

3.3.1.1 Determinación estructural de la lobarielina: 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoato de metilo (VI).

El espectro IR del compuesto lobarielina (espectro 6a), presenta bandas de absorción características de la tensión de hidroxilo fenólico (ν_{max} 3037, 2958 cm^{-1}), bandas de absorción asociadas a estiramientos C-H aromático (ν_{max} 3000-1700 cm^{-1}), una banda intensa y ancha asociada al estiramiento C=O del grupo carbonilo de aldehído y de éster (ν_{max} 1643 cm^{-1}), bandas de vibración de estiramiento C-O (ν_{max} 1200-1000 cm^{-1}) y flexiones fuera del plano correspondientes a anillo aromático sustituido (ν_{max} 900-700 cm^{-1}).
El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear para **VI** (tabla 3-6), permitió evidenciar que es un compuesto aromático de tipo β-orcinol. (Huneck & Yoshimura, 1996). El espectro de ^{1}H RMN (espectro 6b), presentó seis señales simples que integran para un total de doce hidrógenos, las cuales se asignaron de la siguiente manera: las señales en 2.10 y 2.48 ppm corresponden a dos grupos metilo sobre anillo aromático; la señal en 3.96 ppm corresponde a los hidrógenos de un grupo metoxilo; la señal en 10.35 ppm es característica de un hidrógeno de tipo aldehídico; y las señales en 12.43 y 12.88 ppm corresponden a dos hidroxilos que se encuentran formando puentes de hidrógeno intramoleculares con grupos carbonilo.

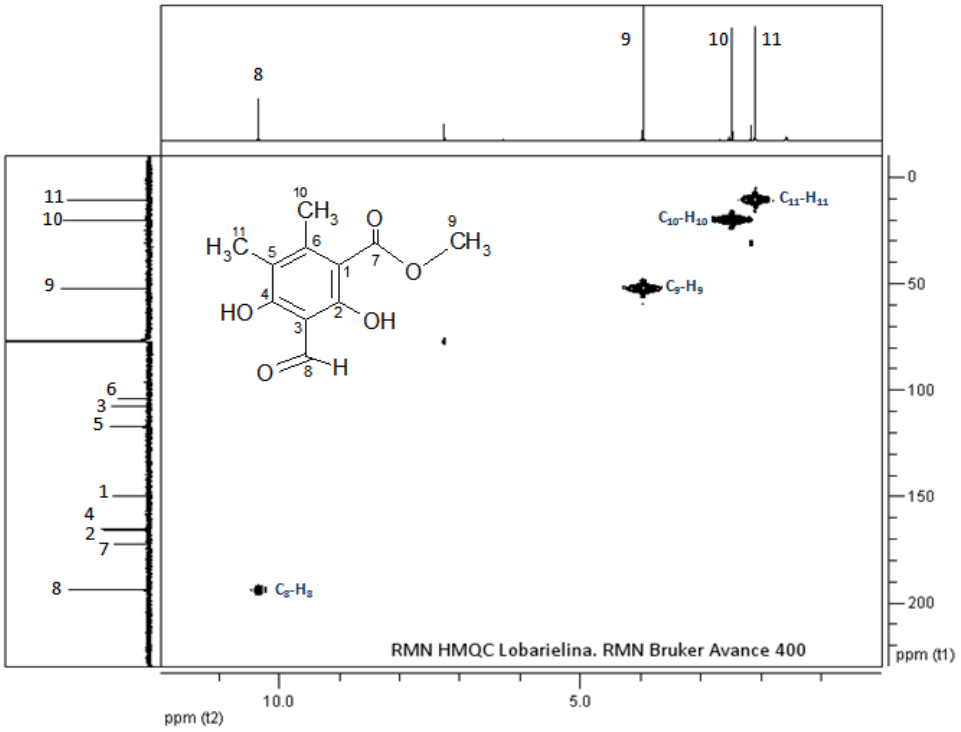
Tabla 3-6: Datos de RMN para la lobarielina

Posición	δ_H (m)	δ_C [b]	HMBC C → H
1		149.9	10, 11
2	12.88	165.5	8
3		107.7	8
4	12.34	165.1	8, 11
5		117.4	10,11
6		104.3	10
7		172.1	9
8	10.35 (s)	193.9	
9	3.96 (s)	52.3	
10	2.48 (s)	20.1	
11	2.10 (s)	10.6	

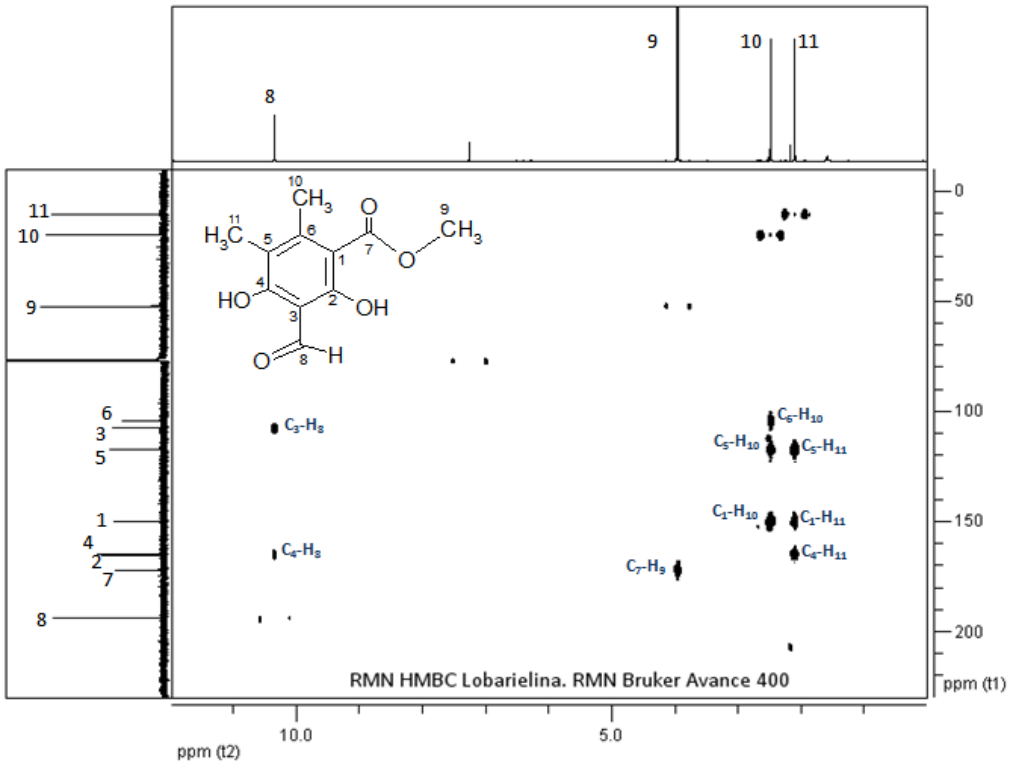
El espectro de ^{13}C RMN (espectro 6c) presentó señales correspondientes a once átomos de carbono en la molécula de **VI**, la señal en 193.99 ppm corresponde a un carbonilo de aldehído y la señal en 172.11 ppm es característica de un grupo carbonilo de éster. Las señales en 10.62, 20.05 y 52.28 ppm se asignaron a los dos metilos y el metoxilo respectivamente, según la correlación observada para las señales en el espectro bidimensional HMQC a un enlace de distancia (espectro 6f). Las señales de los carbonos restantes en el espectro ^{13}C RMN, fueron asignadas de acuerdo a las correlaciones observadas en el espectro bidimensional HMBC (espectro 6g).

El espectro de masas del compuesto **VI**, en modo FAB (M+H) (espectro 6d), mostró un *pseudo* ión molecular de 225, y el espectro de masas de alta resuolución (HRESI) (espectro 6e), en modo negativo, evidenció un ión molecular de 223, a partir de lo cual se establció la fórmula molecular de $C_{11}H_{12}O_5$, para una masa exacta de 224.2100 g/mol.

Espectro 6f. Espectro HMQC de la lobarielina (VI)

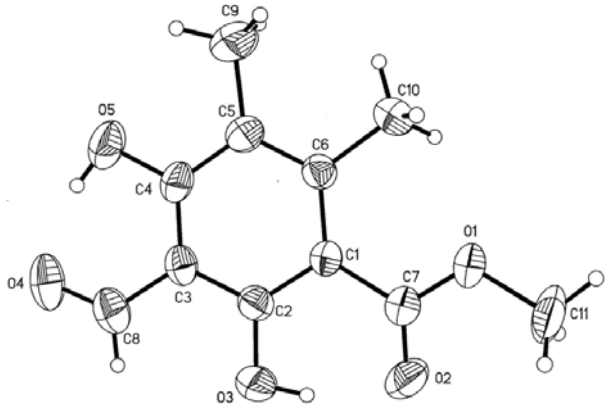


Espectro 6g. Espectro HMBC del compuesto Lobarielina (VI)



El análisis del patrón de fragmentación observado en el espectro de masas (espectro 6-d) de la lobarielina a partir del ion molecular 224, conduce a determinar perdidas de: 15 unidades carácteristicas de grupo metilo (209, 194), 31 unidades correspondientes a metoxilo, 59 unidades características de ester metilico, y 29 unidades correspondientes a grupo aldehído.

A partir del análisis de los espectros se propuso la estructura molecular de la lobarielina (tabla 3-5), como el 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoato de metilo. Dicha estructura se confirmó de manera inequívoca a partir del análisis del patrón de difracción de rayos X (figura 3-7) de sus cristales. La estructura cristalina de la lobarielina (3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoato de metilo), es de tipo monocíclico, con geometría $P2_1/n$, y valores de celdas unitarias: a = 7.2982(11), b = 13.618(2), c = 10.9625(16)Å, β = 103.213(2)°, V = 1060.7(3)Å^3, Dx = 1.404 g/cm^3 y Z = 4.



Desplazamiento elipsoidal en un nivel de probabilidad del 50 %. Los átomos de hidrógeno se dibujan como círculos con un radio arbitrario

Figura 3-7. Vista estereoscópica de la estructura molecular de la lobarielina (VI), obtenida por difracción de rayos X

La posición de todos los átomos de hidrógeno fue calculada geométricamente y se empleó un modelo de cabalgata (riding model) en el refinamiento, con distancias C-H en el rango de 0.85-0.98 Å y Uiso(H) = 1.2 Ueq(C). Los átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo se encontraron en diferentes mapas de densidad electrónica y se refinaron.

La figura 3-8 muestra la estructura cristalina a lo largo del eje α, de la celda unitaria para el compuesto **VI**. Como se había establecido por ^{1}H RMN, ambos grupos hidroxilo en la molécula están involucrados en puentes de hidrógeno intramoleculares con átomos de oxígeno de grupos carbonilo. A través de la longitud del cristal, se observan cinco interacciones intramoleculares por puentes de hidrógeno (CH • • • O), que podrían ser consideradas como las más significativas. La estructura cristalina está estabilizada por interacciones intermoleculares de puentes de hidrógeno (C-H • • • O) y por fuerzas de van der Waals.

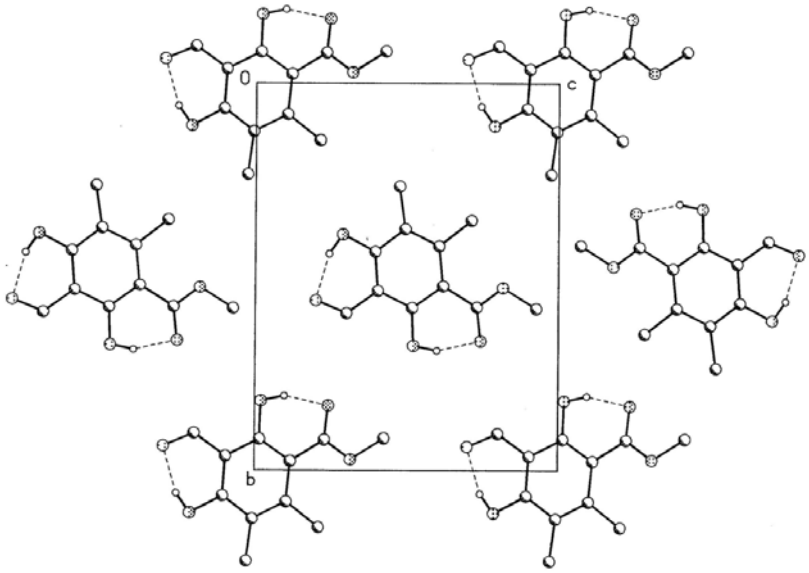


Figura 3-8. Estructura cristalina de la lobarielina (VI), proyectada a lo largo del eje α

3.3.1.2 Determinación estructural del polihidroxialcohol.

El espectro de absorción al IR de **VIII** (espectro 8a) presenta una banda de absorción características de estiramiento C-OH de grupo hidroxilo alifático (ν_{max} 3298 cm^{-1}), estiramiento C-H asociado a su carácter alifático (ν_{max} 2937, 2918, 2735, 2554 cm^{-1}), una banda intensa y ancha asociada a vibración CH_2de tipo tijera (ν_{max} 1440 cm^{-1}), bandas de flexión en el plano características de metileno (ν_{max} 1400-1300 cm^{-1}) estiramientos C-O (1200-1000 cm^{-1}) y flexiones fuera del plano correspondientes a alcanos sustituidos (1000-800).

El análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de **VIII** (tabla 3-7), condujo a determinar que se trata de un polihidroxialcohol.

Tabla 3-7: Datos de RMN para el polihidroxialcohol VIII

Posición	δ_H (m, J en Hz)	δ_C [b]	HMBC C → H
1	3.84 (dd, 2.89, 11.64)	65.79	2,3,5
2	3.58 (dd, 2.10, 8.31)	73.32	1,3
3	3.75 (m, 2.89, 6.26)	73.78	2,4,5
4	3.93 (m, 3.95, 6.26)	73.11	1,3,5
5	3.67 (m, 6.26, 12.47)	65.88	4,1
	4.78(s)		

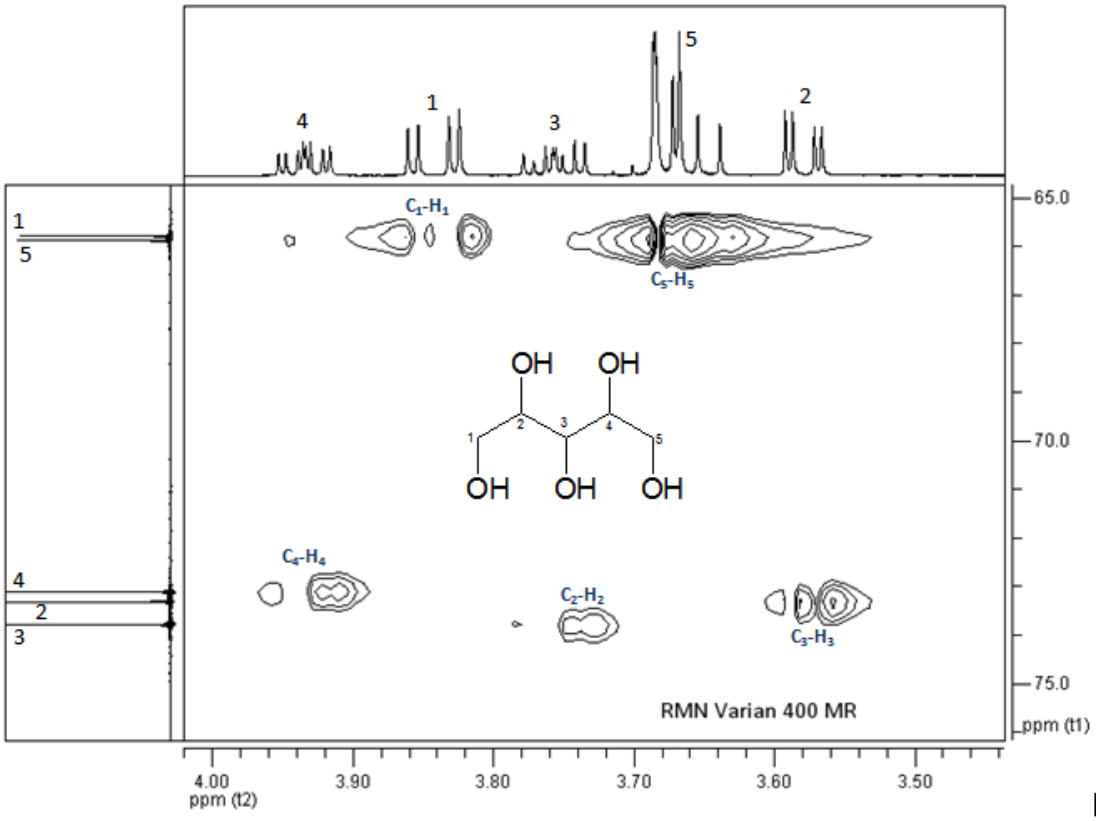
El espectro de ^1H RMN (espectro 8b) presenta seis señales diferentes, de las cuales tres: 3.58 (dd), 3.75 (m), y 3.93 (m) ppm integran para un hidrógeno e indican la presencia de tres metinos base de oxígeno de tipo alifático al encontrarse en un desplazamiento químico entre 3.5 y 4.0 ppm. Las señales en 3.84 (dd) y 3.67 (m) ppm que integran para dos hidrógenos, indican la presencia de dos grupos metileno base de

oxígeno, mientras que la señal simple ancha en 4.78 ppm que integra para cinco hidrógenos indica la presencia de cinco grupos hidroxilo.

El espectro de ^{13}C RMN (espectro 8e) presentó señales para cinco carbonos diferentes en la molécula y a partir del análisis del espectro DEPT 135 (espectro 8f) se pudo establecer la presencia de dos carbonos metilénicos base de oxígeno ubicados en 65.79 y 65.88 ppm, y de tres carbonos metínicos cuyas señales se observan en 73.11, 73.32 y 73.78 ppm. A partir de las correlaciones apreciadas en el espectro bidimensional HMBC (espectro 8h), resumidas en la tabla 3-7, se determinó la estructura de **VIII** como un polihidroxialcohol.

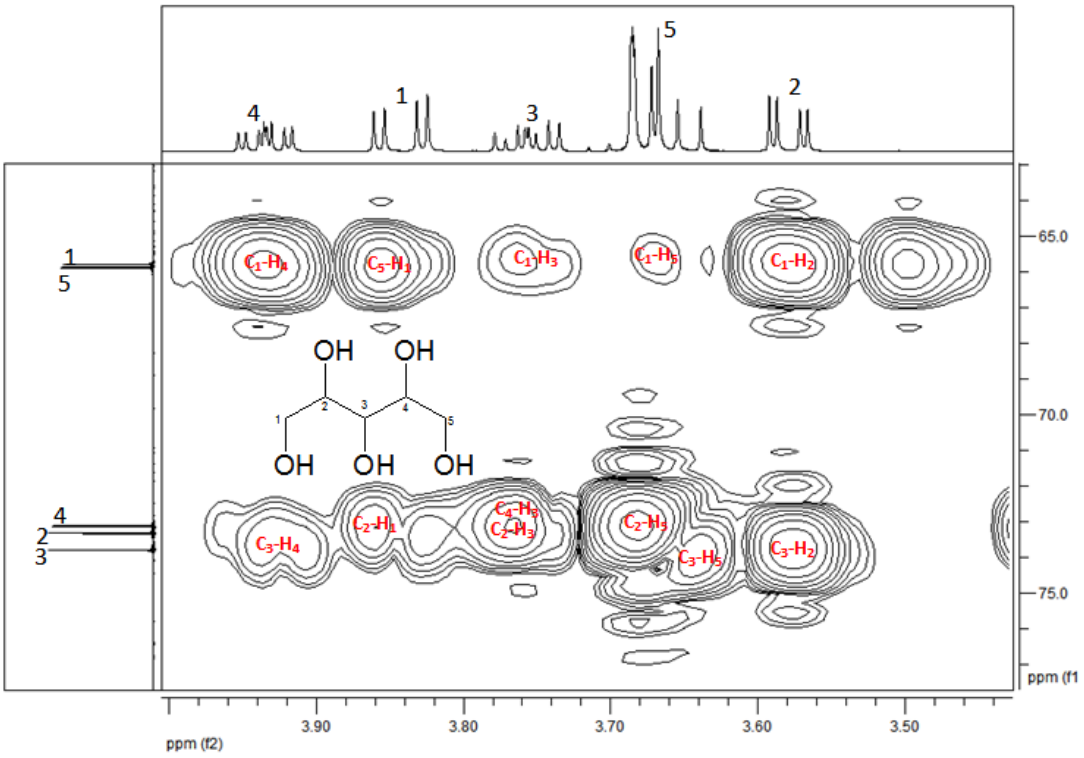
El espectro de masas de **VIII**, en modo FAB (M+H) (espectro 8d), mostró un pico base de 154. Si se considera la estructura quimica propuesta para el polihidroxialcohol, esta tiene un peso molecular de 152.14 g/mol, y dado que este valor es menor al del pico base y teniendo en cuenta que en el espectro EM-FAB aparecen otros picos en 307, 308, 391 y 392 (entre otros), que podrían corresponder al ion molecular, es probable que este compuesto sea un dimero. El patrón de fragmentación observado en el espectro de masas (espectro 8-d) de VIII, conduce a determinar perdidas de: 13 unidades carácteristicas de grupo metiníco, 14 unidades correspondientes a CH_2, 18 unidades características de salida de H_2O_2 agua, 17 unidades correspondiente a grupo hidroxilo.

Espectro 8g. Espectro HMQC del polihidroxialcohol (VIII)



En genreal, a partir de los ensayos y análisis realizados se puede considerar que se trata de un polihidroxialcohol, y aunque para los líquenes se han reportado diversos azucares del tipo dextrógiro (D-arabitol, D-ribitol, o D-xilitol), no se puede afirmar que el compuesto VII se trate de un azucar ya que no se determinó su rotacion optica (Huneck & Yoshimura, 1996).

Espectro 8h. Espectro HMBC del polihidroxialcohol (VIII)



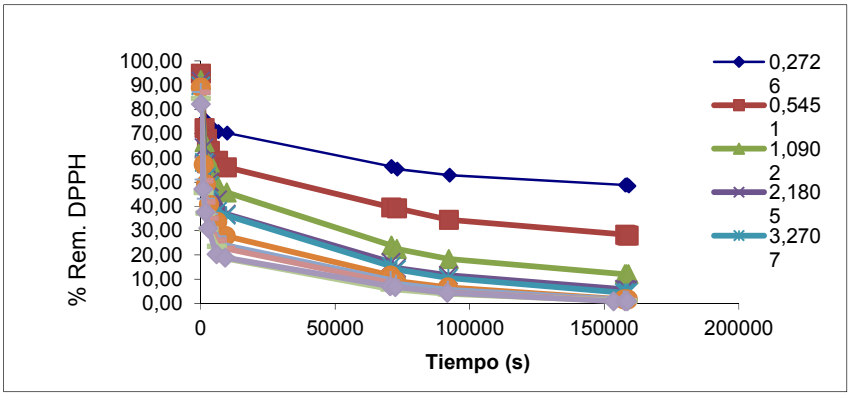
3.4 Cuantificación de la actividad antioxidante de los compuestos puros de *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum*

3.4.1 Cuantificación del poder captador del radical libre DPPH de los compuestos

Entre los principales mecanismos de acción antioxidante, la determinación del poder captador de radicales libres de los compuestos candidatos a ser antioxidantes resulta uno de los más estudiados experimentalmente. (Amarowicz, *et al*., 2004; Behera & Verma, 2006; Siddhuraju & Becker, 2007). Se han desarrollado diferentes modelos para medir este poder en sustancias de diversos orígenes, los cuales hacen uso ya sea, de radicales libres de naturaleza sintética como el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) o el radical catiónico 2,2'-azino-bis ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS•$^{+}$), o generan los radicales libres *in situ*, como en el caso del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) y el radical alcoxilo ($RO_2^{\bullet}$), entre otros. (Porkony; 2001).

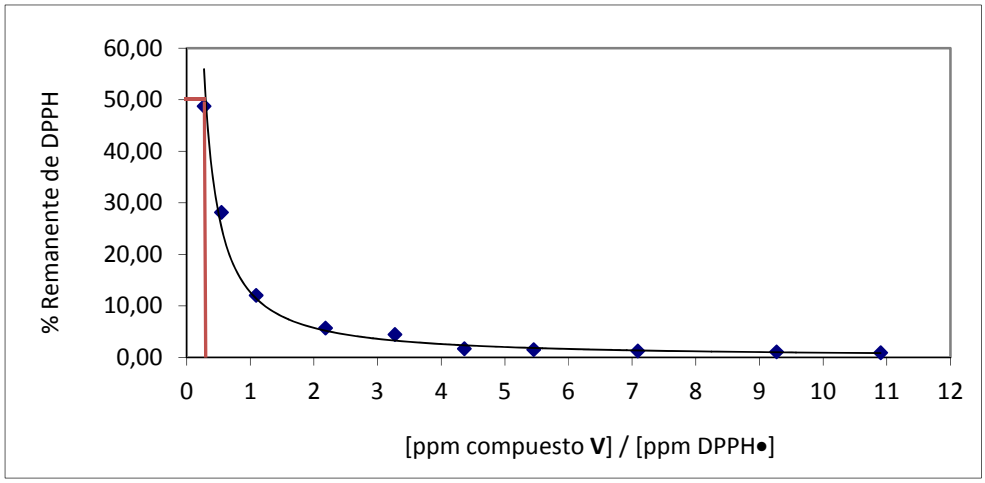
En este estudio se empleó el modelo del radical libre DPPH• teniendo en cuenta que es un método de rutina adecuado para cuantificar el poder captador de radicales libres de los compuestos (Brand-Williams *et al*., 1995). Este método se ha validado con sustancias antioxidantes estándar, demostrando una alta correlación que permite obtener resultados confiables (Brand-Williams *et al*., 1995), a lo que se suma su sencillez, practicidad y versatilidad, dado que el DPPH• es estable en soluciones acuosas y metanólicas, y permanece inalterado por reacciones como la quelación de iones metálicos o la inhibición enzimática. (Amarowicz, *et al*., 2004; Behera & Verma, 2006; Siddhuraju & Becker, 2007).

La cuantificación del poder captador del radical DPPH• de las muestras objeto de estudio inició con la determinación del porcentaje remanente del radical a partir de la variación del porcentaje de DPPH• en función del tiempo para diferentes relaciones de concentración entre compuesto y DPPH• (ver gráfica 3-3 a manera de ejemplo).



Gráfica 3-3. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones de ácido porfirílico - V (ppm) / DPPH• (ppm)
Cada curva corresponde a una relación [muestra]/ [DPPH]

Con los porcentajes remanentes de DPPH• obtenidos para cada relación al estado estacionario se construyó una gráfica de porcentaje remanente vs. relación de concentración (ver gráfica 3-4 a manera de ejemplo) a partir de la cual se calculó la concentración efectiva 50 (CE_{50}) que indica la relación, entre la muestra y el radical, necesaria para que la concentración inicial de DPPH• se reduzca en un 50 %. Los datos y gráficas para todos los compuestos se encuentran en los anexos 2 y 3. El poder captador de radicales libres de la muestra es mayor en la medida que su CE_{50} sea de menor magnitud.



Gráfica 3-4. Determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) del ácido porfirílico (V).

De acuerdo al comportamiento de los compuestos (anexos 2 y 3), el efecto captador del radical DPPH• para hematomato de metilo (**I**), atranorina (**II**), β-orcinol carboxilato de metilo (**III**), 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**), ácido porfirílico (**V**)**,** lobarielina (**VI**) y orselinato de metilo (**VII**), fue dependiente de la concentración.

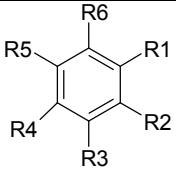
$$DPPH^{\bullet} + AH \rightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet} \qquad \textbf{Reacción 2}$$

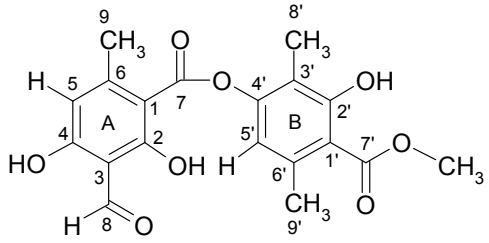
$$A\bullet + A\bullet \rightarrow AA \qquad \textbf{Reacción 3}$$

(AH): antioxidante, (A•): radical del antioxidante

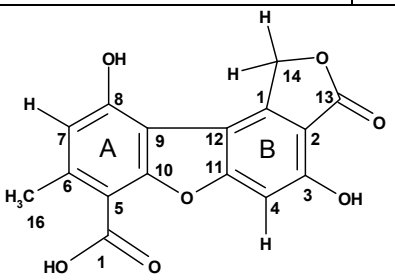
Los compuestos **I** a **VII** (representados por AH en la reacción 2), exhibieron diferentes grados de poder antirradicalario y demostraron tener la capacidad de donar electrones al radical DPPH• y neutralizar la reacción en cadena, lo cual es apreciable por una disminución progresiva del porcentaje remanente del DPPH• (gráfica 3-3 y anexos 2 y 3). En la medida en que desaparece el radical libre, se forma un compuesto estable e incoloro correspondiente a la 2,2-difenil-1-hidrazina o a compuestos análogos de hidrazina sustituidos, mientras que el radical formado a partir de los compuestos antioxidantes (A•), puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (DPPH-A, A-A), por lo que la neutralización de los radicales detendrá la reacción en cadena (reacción 2 y 3). En consecuencia, la desaparición del DPPH• proporciona un índice para cuantificar la capacidad de los compuestos de prueba para captar radicales. (Pedrasa, 2004; Lacalle, 2007; Martínez, 2007; Naik, *et al.,* 2008).

Tabla 3-8: Poder captador del radical DPPH• (CE_{50}) de extractos y compuestos de*S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida*

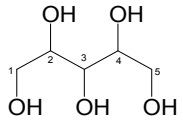
Muestra		Estructura química						CE_{50}	
								[Muestra] /[DPPH]	
		R1	**R2**	**R3**	**R4**	**R5**	**R6**	ppm/ppm	µM / µM
Hematomato de metilo **(I)**		$-COOCH_3$	-OH	-CHO	-OH	-H	$-CH_3$	**0.40**	0.77
β-orcinol carboxilato de metilo (**III**)		$-COOCH_3$	-OH	$-CH_3$	-OH	H	$-CH_3$	1.76	5.31
2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**)		-H	$-OCH_3$	-CHO	-H	$-CH_3$	$-CH_3$	**0.70**	1.68
Lobarielina (**VI**)		$-COOCH_3$	-OH	-CHO	-OH	$-CH_3$	$-CH_3$	**0.20**	0.43
Orselinato de metilo (**VII**)		$-COOCH_3$	-OH	-H	-OH	H	$-CH_3$	8.06	17.09
Atranorina (**II**)	A	-COOR	-OH	-CHO	-OH	H	$-CH_3$	4.53	4.77
	B	$-COOCH_3$	-OH	$-CH_3$	-OR	H	$-CH_3$		
Ácido porfirílico (**V**)	A	COOH	OR	R	OH	H	$-CH_3$	**0.26**	0.32
	B	COOR	OH	H	OR	R	$-CH_2$-R		
Pentapentol (**VIII**)								>16.60	
Extracto de *S. strictum* var. *compressum*								**0.96**	
Extracto de *L. pallida*								**0.85**	
Ácido ascórbico (AA)								**0.079**	0.140
Butil hidroxi tolueno (BHT)								**0.13**	0.282



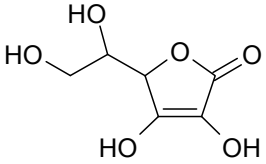
Atranorina



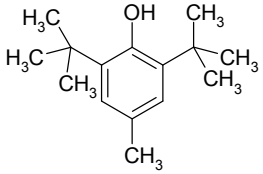
Ácido porfirílico



Polihidroxialcohol



Ácido ascórbico



BHT

De los ocho compuestos evaluados, los metabolitos secundarios lobrielina (**VI**), ácido porfirílico (**V**), hematomato de metilo (**I**) y 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**), causaron la mayor reducción en la concentración del radical DPPH•, con CE_{50} de 0.20, 0.26, 0.40 y 0.70 (ppm muestra / ppm DPPH•) respectivamente (tabla 3-8), siendo por lo tanto antioxidantes eficientes como captadores de radicales libres, aunque no superan las CE_{50} de los patrones.

Al comparar las estructuras químicas de **VI**, **I** y **IV** (tabla 3-8) se encuentra que el sustituyente formilo en R3 ubicado en posición orto a un grupo hidroxilo o metoxilo en R2, es al parecer clave para el efecto captador de radical DPPH•, lo que concuerda con lo que se ha sugerido previamente para depsidonas que poseen el mismo patrón de sustitución. (Lohézic-Le Dévéhat *et al.*, 2007). Los compuestos lobarielina (**VI**) y hematomato de metilo (**I**) con CE_{50} de 0.20 y 0.40 (ppm/ppm) se diferencian estructuralmente el uno del otro, por el sustituyente en R5 (CH_3 y H respectivamente), lo que indica que un grupo metilo en R5 causa un incremento de la actividad antioxidante del tipo captador de radicales libres.

Si se comparan las estructuras con esqueleto relacionado (**I**, **II**, **III**, **VI**, **VII**), el orden de actividad depende de la presencia de grupo formilo o metilo en R3, de un grupo metilo en R6 y de hidroxilo en R2 y R4, es decir el esqueleto de β–orcinol; mientras que el compuesto orselinato de metilo (**VII**) tiene el esqueleto del orcinol y presenta un hidrógeno en R3 lo cual causa una marcada disminución de la actividad antirradicalaria (CE_{50} = 8.06 ppm / ppm DPPH•). Se ha descrito (Sroka & Cisowski, 2003), que los compuestos fenólicos que poseen la entidad catecol resultan activos como captadores de radicales libres. Esto podría también explicar la baja actividad antirradicalario del oselinato de metilo, al presentar dos grupos hidroxilo en posición meta.

El ácido porfirílico (**V**), cuya CE_{50} fue de de 0.26 (ppm V / ppm DPPH•) resultó el segundo compuesto más activo como captador de radical DPPH•. Dicho compuesto posee estructura de dibenzofurano formado por acoplamiento carbono-carbono y por uniones éster de dos unidades de ácido orselínico. (Chooi, 2008). Este compuesto presenta un patrón de sustitución diferente al de los demás compuestos evaluados, y se requeriría evaluar varios compuestos con el mismo esqueleto para poder determinar el efecto de los sustituyentes sobre la actividad antirradicalaria en este tipo de compuestos.

La atranorina (**II**), es un dépsido que presenta el esqueleto β-orcinol, en los dos anillos, sin embargo su poder captador de radical DPPH• [CE_{50} = 4.53 (ppm II /ppm DPPH•)], fue menor al de moléculas con el mismo esqueleto y un solo anillo, lo que implica que la cantidad de sustituyentes de la molécula o su tamaño podrpia estar causando algún impedimento para que la atranarina pueda reaccionar con el radical.

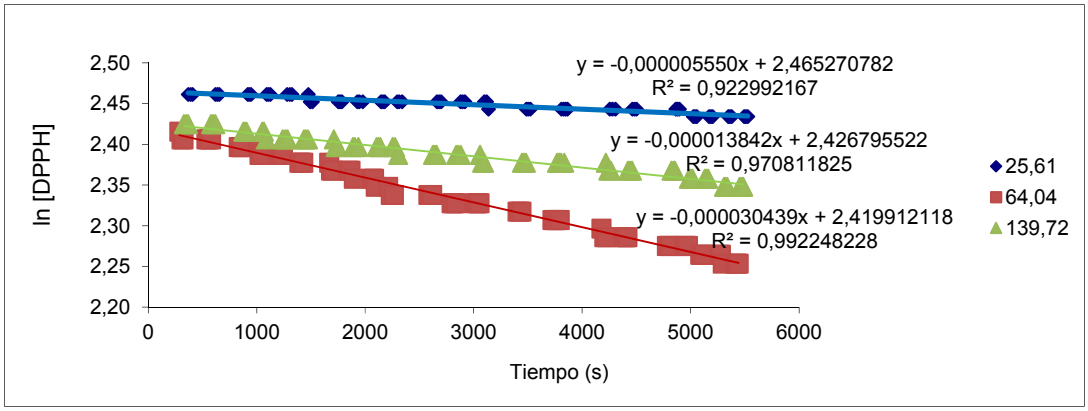
En cuanto al compuesto pentapentol (**VIII**), este polihidroxialcohol resultó inactivo como captador de radicales libres.

3.4.2 Determinación de la reactividad de los compuestos a partir de su estudio cinético frente al radical libre DPPH•

La reactividad de los metabolitos liquénicos para captar radicales libres, se cuantificó a través de la determinación de la constante de velocidad (K_2) para la reacción entre los compuestos y el radical DPPH$^{\bullet}$, siguiendo el método descrito por Brand-Williams *et al.,* (1995), el cual es un modelo eficiente que brinda resultados confiables en la evaluación de la reactividad antioxidante. (Sanchez-Moreno *et al.,* 1998, Espin *et al.,* 2000; Suja *et al.,* 2004).

La reacción entre los compuestos evaluados y el radical DPPH• siguió una cinética de *pseudo*primer orden (anexo 4) de acuerdo a la ecuación 3, bajo las condiciones experimentales $[muestra]_{inicial}$ >>>> $[DPPH\bullet]_{inicial}$ (relación del compuesto 20 a 200 veces mayor que la concentración inicial de radical). Con base en estas consideraciones, se estableció gráficamente la relación entre la concentración remanente del radical y el tiempo de reacción (ver gráfica A4a a modo de ejemplo), y se calculó la constante de velocidad (K_2) a partir del valor de la pendiente de la gráfica (k_{obs}) y la concentración inicial de cada compuesto.

$$[DPPH\bullet] = [DPPH\bullet]_0 \, e^{-Kobs \, t} \qquad \textbf{Ecuación 3}$$



Gráfica A4a. Determinación de la constante de velocidad k_2 del hematomato de metilo (I), para tres relaciones I / DPPH$^{\bullet}$: (25, 64, 140 μM/μM)

Las constantes de velocidad (K_2) determinadas para los compuestos **I**, **II**, **III**, **IV**, **V**, **VI** y **VII**, resultaron del promedio de tres ensayos independientes a la misma temperatura de trabajo (Gráfica A4a); las magnitudes de las mismas fueron significativamente menores ($p<0.05$) que la k_2 para el antioxidante comercial butil hidroxi tolueno BHT (tabla 3-9), lo que se puede representar en el siguiente orden de reactividad: BHT >>>> VI >> V >> III >> I > II > VII = IV.

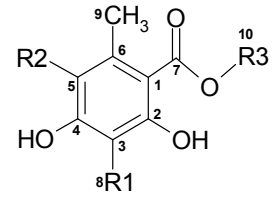
Tabla 3-9: Constantes de velocidad, (k_2), de los compuestos de *S. strictum* var. *compressum* y *L.pallida* a 25.00 ± 0.01 ºC

Compuesto C	Relación [C]/[DPPH·] (mol/mol)	k_2 (M^{-1}, s^{-1}) MEDIA ± Ds[a]
I	26 -64 – 140	0.01239 ± 0.00005**
II	10 - 35 – 76	0.01166 ± 0.00008**
III	25 – 50 – 100	0.04009 ± 0.00009**
IV	45 – 90 – 181	0.00874 ± 0.00016*
V	30 – 60 -119	**0.11155 ± 0.00064****
VI	20 – 55 – 115	**0.22530 ± 0.00642****
VII	20 – 60 – 120	0.00962 ± 0.00003*
BHT	15 – 30 - 40	5.64500± 0.11934**

a: Media ± Desviación estándar de tres ensayos independientes. *k_2 estadísticamente iguales ($p<0.05$). **k_2 significativamente diferentes ($p<0.05$)

Como se ilustra en la tabla 3-9, las k2 de los compuestos ácido porfirílico (V = 0.11155) y lobarielina (VI = 0.22530), son significativamente mayores ($p < 0.05$) que las presentadas por los demás compuestos evaluados, siendo más reactivo el compuesto **VI** un derivado de ácido benzóico de tipo β-orcinol que el compuesto **V** que es un dibenzofurano (tabla 3-10), lo que coincide con el efecto captador del radical DPPH• para ambos compuestos (CE_{50}: V = 0.26 ppm / ppm DPPH•; VI = 0.20 ppm / ppm DPPH•).

Tabla 3-10: Comparación de las estructuras químicas (k_2) de los compuestos de *S. strictum* var. *compressum* y *L.pallida*



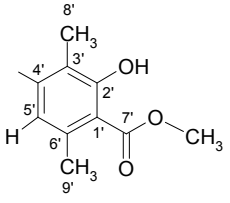
Lobarielina (VI)
R1 = CHO, R2 = CH_3 , R3 = CH_3

β-orcinol carboxilato de metilo (III)
R1 = CH_3, R2 = H, R3 = CH_3

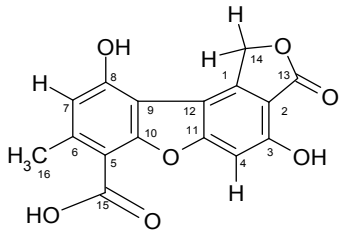
Hematomato de metilo (I)
R1 = CHO, R2 = H, R3 = CH_3

Atranorina (II) R1 = CHO, R2 = H,

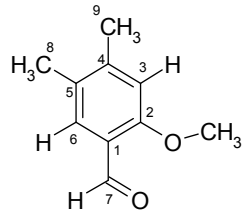
R3 =



Orselinato de metilo (VII)
R1 = H, R2 = H, R3 = CH_3



Ácido porfirílico (**V**)



2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**)

Por otro lado, al comparar la estructura química de los compuestos lobarielina (**VI**), β-orcinol carboxilato de metilo (**III**), hematomato de metilo (**I**), atranorina (**II**), y orselinato de metilo (**VIII**), los cuales presentron k_2 estadisticamente diferentes ($p<0.05$), y cuyo esqueleto estructural es el mismo (tabla 3-10), frente al compuesto 2-metoxi-4,5-dimetil benzaldehido (**IV**), se encuentra que los sustituyentes hidroxilo parecen ser necesarios para que exista una mayor reactividad por parte de la molécula.

Así mismo, el análisis de las estructuras de **VI**, **III** y **I** (tabla 3-10), conduce a determinar que el sustituyente metilo en R2 del compuesto lobarielina (VI) tiene una influencia marcada en la reactividad de la molécula, en comparación con las moléculas **III** y **I** donde R2 es un hidrógeno y al parecer causa una disminución significativa ($p<0.05$) de la reactividad de estas moléculas. Adicionalmente, el sustituyente R1 que es un formilo en la lobarilina (**VI**) y el hematomato de metilo (**I**) y un metilo para el β-orcinol carboxilato de metilo (**III**), parece disminuir significativamente la reactividad de **I** ($k_2 = 0.01239$) respecto a la de **III** ($k_2 = 0.04009$), lo que contrasta con los resultado del efecto captador del radical DPPH•, pues en ese caso se encontró que el CHO en R1 esta relacionado con una mayor actividad antirradicalaria.

En definitiva es posible considerar que los sustituyentes CH_3 o CHO en la posición 3 (R1), CH_3 en la posición 5 (R2) y OH en las posiciones 2 y 4 parecen aumentar la reactividad de los compuestos **VI**, **III** y **I** en comparación con los demás compuestos evaluados.

Cabe señalar que previamente se ha caracterizado al BHT como un compuesto de cinética lenta (Brand-Williams *et al.*, 1995), lo cual indica que se trata de una sustancia con una velocidad de reacción lenta en relación a compuestos que exhiben una cinética rápida como por ejemplo el ácido ascórbico. Comparando los valores de K2 obtenidos frente al correspondiente para el BHT se puede inferir que la lobarielina (**VI**), el ácido porfirílico (**V**) y el hemetomato de metilo (**I**), pese a que son los más reactivos en relación a los demás evaluados también presentan una cinética lenta comparable al BHT, lo que podría ser útil en la aplicación industrial de estas sustancias liquénicas como auxiliares de formulación antioxidantes que preserven la formulación del daño oxidativo durante un tiempo de vida media prolongada.

3.4.3 Determinación del poder reductor férrico de extractos y compuestos puros

La capacidad reductora de las sustancias constituye un indicador significativo de su actividad antioxidante, pues permite establecer su tendencia a actuar como agentes donadores de electrones a especies oxidadas, inactivándolas y convirtiéndolas en especies estables no reactivas, lo que termina la reacción en cadena característica de los procesos oxidativos. (Zhenbao *et al*., 2007).

Este ensayo permitió cuantificar el poder antioxidante tanto de los extractos metanólicos de *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida* como de los compuestos provenientes de estos, mediante la determinación de su capacidad para reducir el ión férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}), de manera indirecta a través de la formación de un complejo de ferricianuro ferroso "Azul de Turnbull" (reacciones 4 a 6), medible espectrofotométricamente a 700nm. (Martínez, 2007).

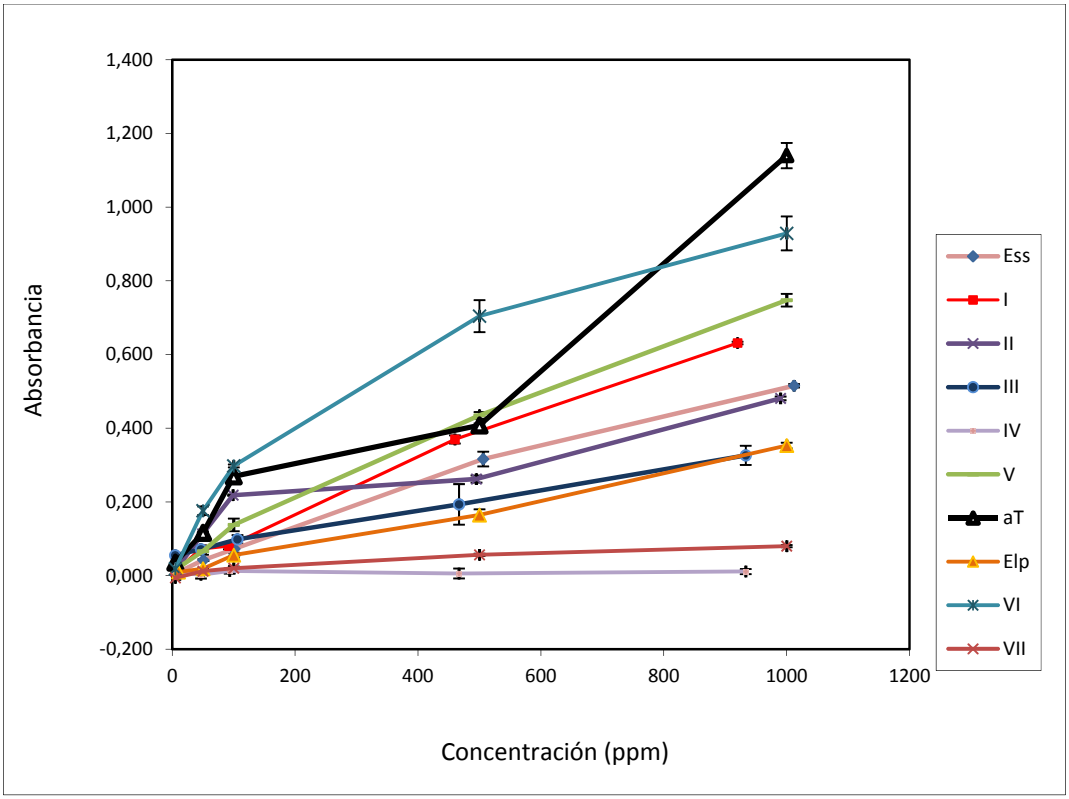
$Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ **Reacción 4**

$[Fe^{2+}(CN)^{-}_{6}]^{4-} + Fe^{3+} \rightarrow [Fe^{3+}(CN)^{-}_{6}]^{3-} + Fe^{2+}$ **Reacción 5**

$(Fe^{3+})_4\ [Fe^{2+}(CN)^{-}_{6}]^{4-}_{3} \rightarrow (Fe^{2+})_4\ [Fe^{3+}(CN)^{-}_{6}]^{3-}_{2}$ **Reacción 6**

Ferricianuro férrico — Ferricianuro ferroso (Azul de Turnbull)

En las gráficas 3-5 y 3-6, construidas a partir de los datos de la tabla A5b (anexo 5), se ilustra el poder reductor férrico de los compuestos **I**, **II**, **III** y **V** de *S. strictum* var. *compressum* y **VI** de *L. pallida* en comparación con el alfa-tocoferol, empleado como antioxidante control. Se puede apreciar que a medida que aumenta tanto la concentración de los compuestos como la del control, aumenta la absorbancia del medio de reacción, lo cual es indicativo del poder reductor de dichas sustancias ya que favorecen la formación de ferricianuro ferroso.

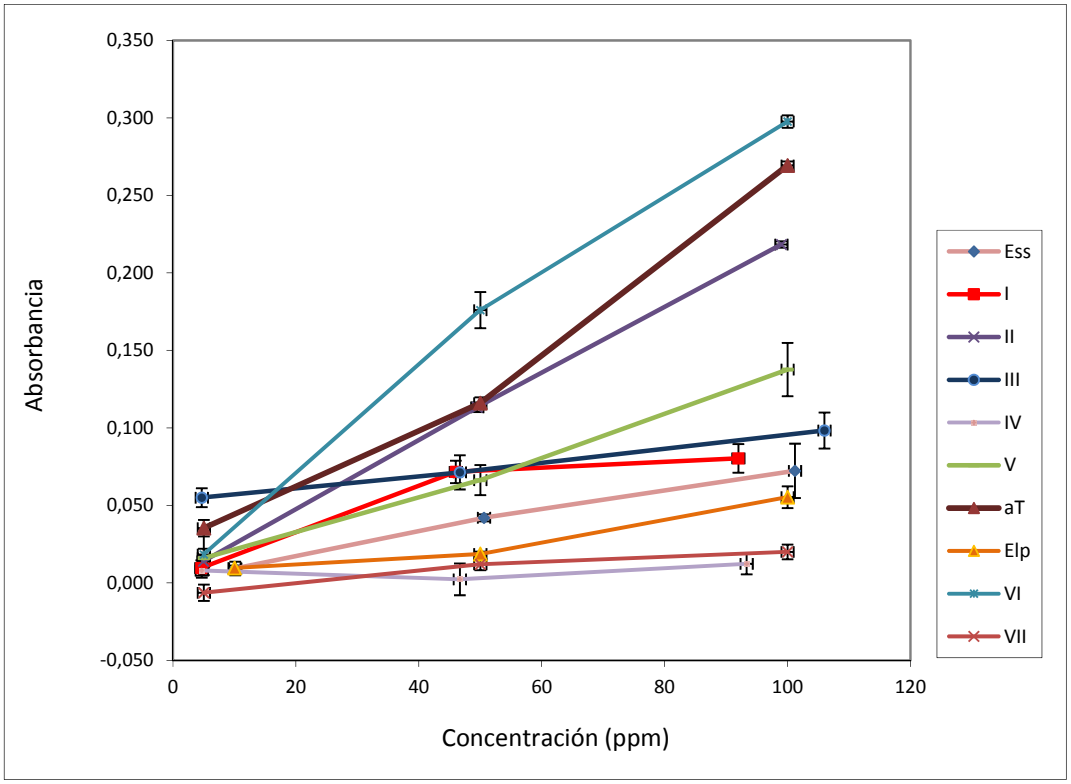


Gráfica 3-5. Poder reductor férrico del extracto metanólico y compuestos puros de *S. strictum* var *compressum* y *L. pallida* (5 a 1000 ppm)

Hematomato de metilo (**I**), atranorina (**II**), β-orcinol carboxilato de metilo (**III**), 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**), ácido porfirílico (**V**), **ESs** (Extracto de *S. strictum* var. *compressum*), lobrielina (**VI**) y orselinato de metilo (**VII**), **ELp** (Extracto de de *L. pallida*). Patrón de α-tocoferol (aT). Cada valor es la media +/- Ds de tres réplicas.

En la gráfica 3-6 se observa con mayor claridad el comportamiento reductor de las muestras a las concentraciones de 5 a 100 ppm en comparación con la gráfica 3-5 donde se aprecia el efecto de las concentraciones más altas de las muestras, 500 y 1000 ppm.

En la gráfica 3-5 se observa que el hematomato de metilo (**I**) es más activo ($p<0.01$) que el extracto *S. strictum* var *compressum* (**ESs**) en todas las concentraciones evaluadas. En cuanto a los compuestos ácido porfirílico (**V**), β-orcinol carboxilato de metilo (**III**) y atranorina (**II**) estos exhibieron un comportamiento reductor similar al del extracto de *S. strictum* ($p<0.01$), lo que indica que posiblemente los diferentes compuestos reductores del extracto estarían actuando sinérgicamente.



Gráfica 3-6. Poder reductor férrico del extracto metanólico y compuestos puros de *S. strictum* var *compressum* y *L. pallida* (ampliación de 5 a 100 ppm)

Hematomato de metilo (**I**), atranorina (**II**), β-orcinol carboxilato de metilo (**III**), 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**), ácido porfirílico (**V**)**, ESs** (Extracto de *S. strictum* var. *compressum*), lobrielina (**VI**) y orselinato de metilo (**VII**), **ELp** (Extracto de de *L. pallida*)**.** Patrón de α-tocoferol (aT). Cada valor es la media +/- Ds de tres réplicas.

De los compuestos aislados de *L. pallida*, lobarielina (**VI**) ejerció una actividad superior a la del extracto metanólico (**ELp**), y orselinato de metilo (**VII**) fue inactivo, por lo que es necesario aislar y evaluar más componentes de esta especie para concluir sobre la relación entre la actividad antioxidante y el contenido de compuestos de la misma.

El comportamiento reductor de los compuestos lobarielina (**VI**) y atranorina (**II**) es similar al del patrón de alfa tocoferol entre las concentraciones de 50 y 100 ppm (gráfica 3-6); sin embargo, lobarielina ejerce la mejor respuesta como antioxidante superando

significativamente ($p > 0.01$) el efecto del alfa tocoferol; en este mismo rango de concentraciones, los compuestos hematomato de metilo (**I**), β-orcinol carboxilato de metilo (**III**) y ácido porfirílico (**V**) muestran un comportamiento reductor que es menor ($p<0.01$) al ejercido por el control de alfa tocoferol y mayor al de los dos extractos; por su parte, los compuestos 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**) y orselinato de metilo (**VII**) no mostraron ser efectivos como agentes reductores.

El comportamiento reductor de los compuestos lobarielina (**VI**), ácido porfirílico (**V**) y hematomato de metilo (**I**) es similar al del patrón de alfa tocoferol en el rango de concentraciones de 400 a 600 ppm (gráfica 3-5). Entre las concentraciones de 100 y 700 ppm, lobarielina es más activo que el control de alfa tocoferol ($p > 0.01$), así mismo a 500 ppm, el ácido porfirílico es mejor reductor que el control, mientras que hematomato de metilo ejerce un menor efecto. A 1000 ppm, la lobarielina presenta un poder reductor menor ($p > 0.01$) al del alfa tocoferol pero significativamente mayor al de los demás compuestos evaluados.

Con base en estas consideraciones se puede inferir que tanto los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum*, como los compuestos hematomato de metilo (**I**), atranorina (**II**), β-orcinol carboxilato de metilo (**III**), ácido porfirílico (**V**) y lobarielina (**VI**) provenientes de estos, están actuando como antioxidantes que previenen la etapa de iniciación de la reacción en cadena, porque son capaces de donar electrones a especies oxidadas, inactivándolas y convirtiéndolas en especies estables no reactivas. Entre los diferentes compuestos evaluados se destaca lobarielina que resultó ser mejor agente reductor que el control de alfa tocoferol ($p<0.01$) en las concentraciones de 50 a 500 ppm; por su parte los compuestos 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**) y orselinato de metilo (**VII**) resultaron ser inactivos como agentes reductores.

3.4.4 Determinación de inhibición de la peroxidación lipídica de extractos y compuestos puros

La peroxidación lipídica (PL) fue definida por A.L. Tappel como “el deterioro oxidativo de los lípidos poliinsaturados” (Halliwell & Gutteridgue, 2007), y consiste en un proceso de daño celular en plantas y animales, y de deterioro de la calidad de diversos productos industriales con constituyentes lipídicos, cuyo mecanismo, medición e interpretación se han revisado ampliamente. (Halliwell, 1993; Pokorny *et al.*, 2001; Befnaar & Mishra, 2005; De la coba *et al*., 2007; Greenberg *et al*., 2008; Barrera *et al*., 2008; Reyes, 2008; Catalá, 2009; Niki, 2009; Morales *et al.*, 2009). Dicho proceso inicia con el ataque de los radicales libres a los ácidos grasos insaturados que se propaga mediante un ciclo de reacción en cadena.

Las membranas biológicas son un fluido bidimensional de lípidos y proteínas que se desplazan libremente, la fluidez está determinada por la presencia de ácidos grasos insaturados que aportan propiedades deseables a la función de barrera y transporte de la membrana. La formación de peróxidos lipídicos y aldehídos de degradación conlleva a la pérdida de la función e integridad de la memebrana y a su ruptura. (Befnaar & Mishra, 2005; De la coba *et al*., 2007; Reyes, 2008; Catalá, 2009). Incluso pequeños cambios en la fluidez de la membrana pueden causar la alteración de numerosas funciones celulares, así como la aparición procesos patológicos que incluyen el cáncer, las infecciones

virales, la enfermedad coronaria y las enfermedades degenerativas. (Befnaar & Mishra, 2005; De la coba *et al*., 2007; Greenberg *et al*., 2008; Niki, 2009).

Por otro lado, en los productos con constituyentes de tipo lipídico, el daño oxidativo causado por los procesos de peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados conduce al enranciamiento y pérdida de las propiedades organolépticas y fisicoquímicas de los mismos e incluso puede causar la desaparición de la actividad farmacológica de ciertos productos.

La peroxidación lipídica es un proceso autocatalítico (figura 3-9) iniciado por la abstracción de hidrógenos alílicos de los ácidos grasos poliinsaturados por parte de especies oxigeno reactivas (radical anión superóxido $O_2^{\bullet}$, peróxido de hidrógeno H_2O_2, radical hidroxilo $OH^{\bullet}$, óxido nítrico $NO\bullet$, peroxinitrilo $ONOO^{\bullet}$), lo cual comienza una peroxidación en cadena. (Girotti, 1998; Catalá, 2009). Los radicales lipídicos resultantes interactúan rápidamente con el oxígeno, conduciendo a la propagación de la reacción (figura 3-9) a través de intermediarios de radicales peroxilo; este proceso genera hidroperóxidos lipídicos que se descomponen en radicales alcoxilo (figura 3-9, tabla 3-11) que pueden descomponerse a su vez liberando hidrocarburos, alcoholes, aldehídos y cetonas volátiles de longitudes de cadena diferentes. (Mattson, 2009; Catalá, 2009). En los alimentos los aldehídos y cetonas volátiles contribuyen en gran medida al aroma de los aceites oxidados. (Pokorny *et al.*, 2001). En las membranas biológicas y en los liposomas y otros sistemas lipídicos cosméticos y farmacéuticos, el proceso de peroxidación se extiende por toda la superficie saltando de un fosfolípido a otro produciendo su agotamiento y la aparición de alteraciones estructurales por la formación de uniones cruzadas entre los fosfolípidos, y entre estos y las proteínas (membranas). (Reyes 2008)

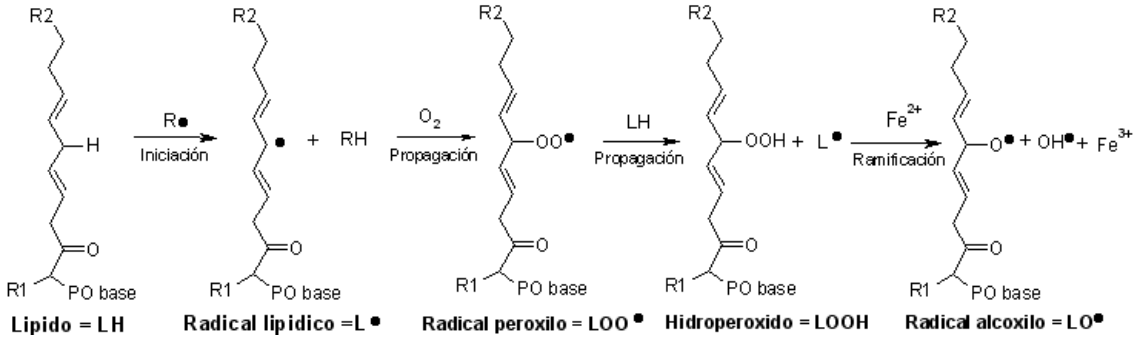


Figura 3-9. Mecanismo de autooxidación de los lípidos

Las reacciones de terminación (tabla 3-11), que conducen a la formación de moléculas estables con electrones apareados, son de baja energía pero requieren que los radicales tengan la orientación adecuada para la reacción y además están limitadas por la concentración de radicales libres que es muy baja; en la mayoría de los casos la reacción sólo termina cuando se agota el sustrato lo que implica la muerte celular, o cuando los radicales interactúan con antioxidantes. (Pokorny *et al.*, 2001; Reyes, 2008).

Tabla 3-11: Mecanismo de autooxidación de los lípidos

Paso	Mecanismo
Ramificación	$LOOH + LOOH \xrightarrow{Fe^{2+}} LOO^{\bullet} + LO^{\bullet} + OH_2$
Terminación	$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow 2\,LOOL + O_2$ $L^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow LL$ $LOO^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow LOOL$

En este estudio, el poder antioxidante de los extractos de *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida*, así como de los metabolitos secundarios **I**, **II**, **III, V** y **VI** provenientes de estos, se determinó utilizando el método del tiocianato (Gulcin *et al*., 2002), el cual mide indirectamente el contenido de peróxidos lipídicos en un sistema emulsionado de ácido linoléico. De acuerdo a la reacción que sucede durante esta prueba (reacción 8 basada en la reacción de Fenton 7), entre mayor sea la cantidad de peróxidos lipídicos en el medio de reacción, mayor será la cantidad de ion ferroso (Fe^{2+}) que será oxidado a ion férrico (Fe^{3+}), el cual es cuantificable como tiocianato férrico $Fe^{3+}(SCN^-)_3$ a 500 nm (reacción 9).

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH\bullet + OH^- \qquad \textbf{Reacción 7}$$

$$LOOH^- + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + LO\bullet + OH^- \qquad \textbf{Reacción 8}$$

$$Fe^{3+} + NH_4SCN \rightarrow [Fe^{3+}(SCN^-)_3] \qquad \textbf{Reacción 9}$$

Tiocianaro ferroso Tiocianato férrico (Rojo)

En la medida que los extractos y compuestos liquénicos evaluados disminuyen la absorbancia del complejo de tiocianato férrico (tabla 3-12) se puede inferir que tienen la capacidad de reducir la cantidad de peróxidos lipídicos en el medio por inhibición de la peroxidación del ácido linoléico a las concentraciones de 5 a 500 ppm evaluadas, lo cual se expresa como el porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica (% IAL, ecuación 6).

El % IAL siguió un comportamiento dependiente de la concentración (tabla 3-12) para los extractos de *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida* y los compuestos hematomato de metilo (**I**), atranorina (**II**), β-orcinol carboxilato de metilo (**III**), 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**), lobarielina (**VI**) y orselinato de metilo (**VII**).

La inhibición de la peroxidación del ácido linoléico fue sobresaliente, incluso desde las más bajas concentraciones, para el ácido porfirílico (**V:** 81.70 %, 5 ppm), la lobarielina (**VI**: 60.72 **%,** 50 ppm), el 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**: 76.12 %, 100 ppm), el extracto de *S. strictum* (**ESs**: 52.84 %, 100 ppm) y el extracto de *L. pallida* (**ELp**: 54.66 **%,** 50 ppm), siendo significativamente ($p<0.01$) más activos que los controles positivos: ácido ascórbico (AA), alfa tocoferol (aT) y butil hidroxi tolueno (BHT), evaluados a las mismas concentraciones y bajo las mismas condiciones.

Tabla 3-12: Porcentaje de Inhibición de la peroxidación lipídica de extractos y compuestos

Muestra	% **IAL** ± EEM				
[ppm]	5	50	100	500	1000
ESs (extracto de *S. strictum)*	17.08 ± 0.342	43.41 ± 0.164	52.84 ± 0.219	77.44 ± 0.495	81.83 ± 0.379
ELp (extracto de *L. pallida)*	31.51 ± 0.329	54.66 ± 0.236	57.78 ±0.466	76.62 ± 0.382	82.38 ± 0.393
I (hematomato de metilo)	6.47 ± 0.265	18.51 ± 0.260	31.39 ± 0.152	63.84 ± 0.325	66.28 ± 0.234
II (atranorina)	19.89 ± 0.455	28.91 ± 0.159	40.31 ± 0.258	59.40 ± 0.341	71.03 ± 0.278
III (β-orcinol carboxilato de metilo	5.16 ± 0.254	11.76 ± 0.474	16.10 ± 0.212	25.05 ± 0.359	50.87 ± 0.293
IV (2-metoxi-4,5-dimetil benzaldehído)	21.37 ± 0.438	29.35 ± 0.606	76.12 ± 0.207	78.53 ± 0.345	85.02 ± 0.277
V (ácido porfirílico)	81.70 ± 0.140	84.25 ± 0.207	85.33 ± 0.262	86.61 ± 0.161	88.19 ± 0.172
VI (lobarielina)	43.54 ± 0.231	60.72 ± 0.152	62.16 ± 0.152	69.20 ± 0.152	71.33 ± 0.066
VII (orselinato de metilo)	7.69 ± 0.408	14.12 ± 0.303	19.48 ± 0.270	26.32 ± 0.224	32.02 ± 0.288
AA (ácido ascórbico)	25.48 ± 0.341	39.59 ± 0.393	46.53 ± 0.207	65.67 ±0.378	70.36 ± 0.078
aT (alfa tocoferol)	22.54 ± 0.184	37.65 ± 0.193	44.98 ± 0.438	61.90 ± 0.458	68.62 ± 0.478
BHT (butil hidroxi tolueno)	22.43 ± 0.375	39.40 ± 0.282	42.86 ± 0.127	55.97 ± 0.409	61.26 ± 0.127

% **IAL:** porcentaje de inhibición de la peroxidación lipídica de la emulsión del ácido linoléico; ± EEM: error estándar de la media

El extracto de *S. strictum* var. *compressum* (**ESs**) fue significativamente ($p<0.01$) más activo que los compuestos hematomato de metilo (**I**), atranorina (**II**) y β-orcinol carboxilato de metilo (**III**) entre las concentraciones de 50 y 1000 ppm; por otro lado el compuesto 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**) causó un efecto estadísticamente igual ($p<0.01$) al presentado por ESs entre 500 y 1000 ppm; mientras que el ácido porfirílico (**V**) superó notoriamente el efecto inhibidor del ESs a todas las concentraciones evaluadas.

El extracto de *L. pallida* presentó un % IAL mayor ($p<0.01$) que el ejercido por lobarielina (**VI**) entre 500 y 1000 ppm y superior al presentado por el de orselinato de metilo (**VII**) a todas las concentraciones evaluadas; dado que el % IAL de **VII** fue bajo se considera que es inactivo como inhibidor de la peroxidación lipídica.

A partir de los resultados de inhibición de la peroxidación presentados por los extractos y los compuestos de *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida* se puede sugerir que existe algún tipo de sinergismo entre los compuestos de cada especie que causa una mayor actividad de los extractos respecto a algunos de sus constituyentes.

Cabe resaltar que los compuestos lobarielina (**VI**) y ácido porfirílico (**V**) han resultado altamente activos como antioxidantes en los tres modelos evaluados (poder captador de radicales libres, poder reductor e inhibición de la peroxidación lipídica), y se puede afirmar que contribuyen en gran medida a la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum* respectivamente. Por lo tanto,

estos compuestos resultan ser versátiles para su aplicación debido a que ejercen la actividad antioxidante por varios mecanismos.

Por otro lado, la atranorina (**II**) resultó ser activo como agente reductor, mientras stereocaulina (IV) es activo como inhibidor de la peroxidación lipídica, y no presentó actividad antioxidante en los otros modelos. Estos resultados indican que estos compuestos podrían ser empleados de manera restringida para aplicaciones direccionadas de acuerdo a sus efectos, por ejemplo **II** como agente reductor en formulaciones farmacéuticas y **IV** como antioxidante en productos alimenticios lipídicos.

Por su parte los compuestos hematomato de metilo (**I**) y β-orcinol carboxilato de metilo (**III**) fueron moderadamente activos como antioxidantes en los tres modelos estudiados, por lo que cabría realizar ensayos adicionales con el fin de verificar si pueden ser usados como coadyuvantes de otros agentes antioxidantes para lograr un efecto sinérgico que potencialice la acción.

3.4.5 Determinación del efecto protector de las sustancias liquénicas sobre el ADN sometido a estrés oxidativo por el radical hidroxilo

Está bien documentado que la radiación ultravioleta (UV, UVA [315-400 nm], UVB [280-315 nm] y UVC [200-280 nm]) produce tanto EOR como ENR altamente perjudiciales para los organismos porque pueden causar mutaciones genéticas e inmunosupresión que conducen a procesos inflamatorios y carcinogénesis. (Fernández *et al*., 1998; Russo *et al.*, 2008; Russo & Halliday, 2006).

Uno de los órganos más afectados por los efectos tanto de la radiación UV, como de las sustancias químicas exógenas al organismo es la piel, cuyo papel principal consiste en proporcionar al organismo una barrera protectora contra las agresiones del medio ambiente. (Sander *et al.*, 2004). El sistema antioxidante natural de la piel combate las especies reactivas altamente dañinas, ayudando a prevenir el deterioro oxidativo inducido por la radiación UV. El daño cutáneo, el envejecimiento prematuro, y el cáncer de piel surgen cuando la exposición a los rayos UV supera la capacidad de protección de este sistema antioxidante. (Bialy *et al.*, 2002). Por lo tanto, el reforzamiento del sistema antioxidante natural de la piel mediante la aplicación tópica u oral de agentes antioxidantes es una estrategia exitosa para la prevención y tratamiento de las diferentes afecciones cutáneas. (Bialy *et al.*, 2002; Sandoval *et al.*, 2003; Russo *et al.,* 2008).

El daño de la piel y de otros órganos y tejidos por la radiación UV es causado, de manera directa, por la interacción de este agente sobre el ADN así como también por la generación de especies oxidantes altamente reactivas como el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$). (Menéndez, 2001, Polachira *et al*., 2004; Sander *et al.*, 2004).

Recientemente, las sustancias liquénicas de naturaleza fenólica con actividad fotoprotectora y antioxidante están siendo consideradas como candidatas novedosas e idóneas para la protección de la piel contra el daño solar, gracias a que presentan alta capacidad tanto de absorber energía ultravioleta como de captar radicales libres. (Rancan *et al*., 2002; Russo *et al*., 2008). Dichas sustancias son biosintetizadas por los líquenes como una estrategia química que les permite protegerse y sobrevivir a

condiciones ambientales extremas como los periodos de frío intenso, desecación casi completa, concentraciones elevadas de ciertos contaminantes ambientales como el ozono y los metales pesados, y altitudes elevadas donde predomina las radiaciones ultravioleta de longitud de onda corta altamente ionizantes. (Fernández *et al*., 1998; Huneck, 1999; Chaparro & Aguirre, 2002; Kohlhardt-Floehr *et al*., 2010).

Con base en las consideraciones anteriores y en vista de que tanto los extractos metanólicos de de *S. strictum* y *L. pallida*, como las sustancias liquénicas hematomato de metilo (**I**), atranorina (**II**) y lobarielina (**VI**), aisladas de éstos, mostraron actividad antioxidante se procedió a explorar su posible efecto protector del ADN (derivado del plásmido pUC18), sometido a condiciones de estrés oxidante por el radical hidroxilo (OH•) formado *in situ* a través de la fotólisis (UV) del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). (Russo *et al*., 2008).

La figura 3-10 ilustra el patrón electroforético del ADN sometido a estrés oxidativo por el radical $OH^{\bullet}$, en ausencia y presencia de lobarielina **VI** (200 μM). En dicha figura se aprecia que el ADN que no fue expuesto a las condiciones oxidantes (ADN NT), considerado como ADN control sin tratamiento, muestra dos bandas en el gel electroforético. La banda de migración más rápida hacia la parte baja del gel, corresponde a la forma circular superenrollada del plásmido (CS-ADN) equivalente a la forma nativa o sin daño del ADN, mientras que la banda de menor movimiento corresponde a la forma circular abierta (CA-ADN) representativa del estado basal del ADN empleado en el experimento. (Chin-Yuan, 2006; Russo *et al*., 2006).

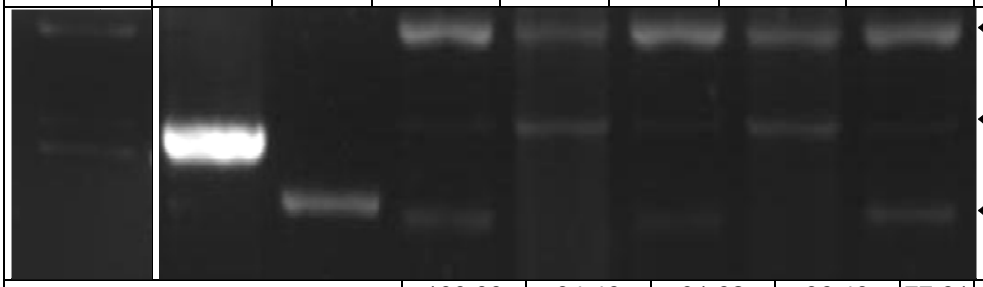


Figura 3-10. Efecto de la lobarielina (VI) en la protección del ADN derivado del plásmido pUC18 sometido a estrés oxidativo por el radical hidroxilo

Vista fotográfica de gel electroforético de agarosa (75 V/cm, 3 h) teñido con bromuro de etidio (1 ppm; 30 min). ADN NT: plásmido pUC18 sin tratamiento; ADN TT: plásmido pUC18 bajo estrés oxidativo por el radical $OH^{\bullet}$ generado *in situ* (H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm); VI: plásmido pUC18 tratado con lobarielina (100 μM) en DMSO + H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm; DMSO: plásmido pUC18 tratado con DMSO + H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm (Control de disolvente). CS: forma circular superenrollada del ADN; LIN: forma lineal del ADN; CA: forma circular abierta del ADN. λHind, 50pb y 100pb: Marcadores de peso molecular. Se calculo la densidad óptica de la banda ADN LIN para determinar el porcentaje de protección.

La exposición del ADN al efecto oxidativo del radical OH• (ADN TT) causó la escisión completa de la forma nativa CS-ADN dando lugar a la forma lineal (LIN-ADN) que es indicativa de daño del plásmido. La adición de **VI** a la mezcla de reacción antes de la generación *in situ* del radical hidroxilo impidió la formación de ADN lineal, mientras que las bandas correspondientes a las formas CS-ADN y CA-ADN se mantuvieron con una intensida similar (CS-ADN: 91.62 %) a la observada en el control negativo (ADN NT: 100 %). La adición de DMSO para disolver la lobarielina (VI) no evitó la formación de LIN-ADN, lo que indica que el compuesto VI además de ser un captador de radicales libres, un agente reductor y un inhibidor de la peroxidación lipídica, protege al ADN del daño oxidativo causado por el radical hidroxilo.

Los extractos metanólicos de *S. strictum* var. *compressum* (0.40 y 0.80 ppm) y *L. pallida* (0.41 y 0.82 ppm) y la lobarielina (**VI** 100 μM y 200 μM), mostraron ser capaces de proteger el ADN (plásmido pUC 18) frente a la exposición a estrés oxidativo causado por el radical hidroxilo. En las figuras 3-11 y 3-12 se puede constatar la mínima degradación de la CS-ADN y la poca formación de LIN-ADN en relación a los controles sin tratamiento (ADN NT) y el control (ADN TT) indicativo del máximo daño observado. La cuantificación de la densidad óptica de las bandas de SC-ADN (figura 3-11) condujo a determinar que los extractos de *S. strictum* y *L. pallida* a concentraciones de 0.80 y 0.82 ppm respectivamente y la lobarielina a concentraciones de 100 y 200 μM, protegen el ADN del daño oxidativo generado por el radical OH• con una efectividad del 82.69, 47.67, 67.81y 97.85 % respectivamente, comparado con el ADN no tratado (ADN NT), al no permitir la producción de la forma LIN-ADN a partir de la la degradación de la forma superenrollada del plásmido (CS-ADN)), es decir, previenen la degradación oxidativa del ADN. Dicho hallazgo da indicio del posible comportamiento de estas sustancias como antioxidantes bajo condiciones biológicas.

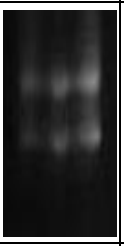
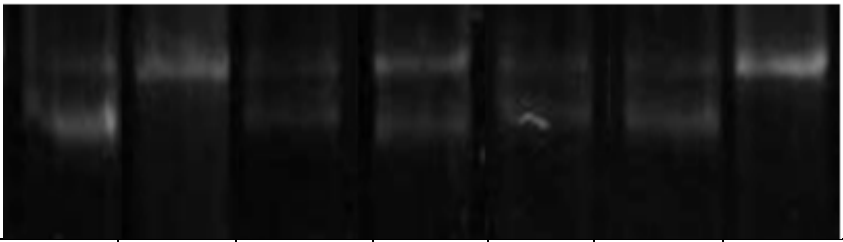
Marcador de peso	Muestras							Forma de ADN	Dirección corrida
λ Hind	ADN NT	ADN TT	VI 100 μM	VI 200 μM	Elp 0.80ppm	Ess 0.82 ppm	DMSO		
								←CA ←CS	
	100.00	33.74	67.81	97.85	47.67	82.69	35.04	% CS-ADN	

Figura 3-11. Efecto de los extractos de *S. strictum* (ESs) y *L. pallida* (ELp) y de la lobarielina (VI) en la protección del ADN derivado del plásmido pUC18 sometido a estrés oxidativo por el radical hidroxilo

Vista fotográfica de gel electroforético de agarosa (75 V/cm, 3 h) teñido con bromuro de etidio (1 ppm; 30 min). ADN NT: plásmido pUC18 sin tratamiento; ADN TT: plásmido pUC18 bajo estrés oxidativo por el radical OH• generado *in situ* [H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm]; VI 100 μM: plásmido PUC18 tratado con lobarielina (100 μM) en DMSO + H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm; VI 200 μM: plásmido pUC18 tratado con lobarielina (200 μM) en DMSO + H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm; ELp 0.80 ppm: plásmido pUC18 tratado con extracto de *L. pallida* (0.80 ppm) en DMSO + H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm; ESs 0.82 ppm: plásmido pUC18 tratado con extracto de *S. strictum* (0.082 ppm) en DMSO + H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm; DMSO: plásmido pUC18 tratado con DMSO + H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm (Control de disolvente). CS: forma circular superenrollada del ADN; LIN: forma lineal del ADN; CA: forma circular abierta del ADN. λHind: Marcador de peso molecular. Se calculo la densidad óptica de la banda ADN LIN para determinar el porcentaje de protección. Evaluados en tres ensayos independientes.

Por otro lado, los compuestos hematomato de metilo (**I**) y atranorina (**II**), a pesar de haber mostrado actividad antirradicalaria e inhibidora de peroxidación lipídica (**I**) así como poder reductor férrico (**I** y **II)**, no causaron un efecto protector del plásmido pUC18 frente al daño oxidativo (figura 3-12) permitiendo la escisión de la forma superenrollada (CS-ADN) y la consecuente formación de LIN-ADN, de manera similar al control (ADN TT) indicativo del máximo daño observado.

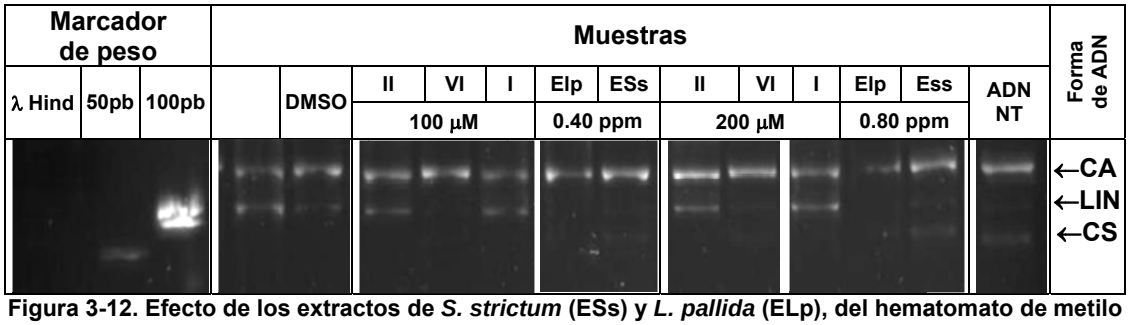
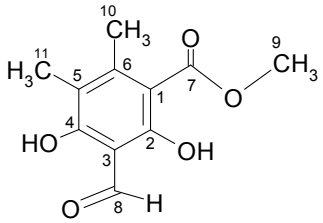


Figura 3-12. Efecto de los extractos de *S. strictum* (ESs) y *L. pallida* (ELp), del hematomato de metilo (I), de la atranorina (II) y de la lobarielina (VI) en la protección del ADN derivado del plásmido pUC18 sometido a estrés oxidativo por el radical hidroxilo

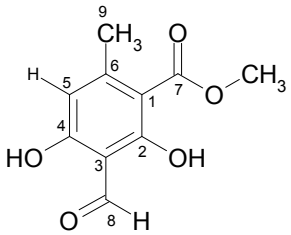
Vista fotográfica de gel electroforético de agarosa (75 V/cm, 3 h) teñido con bromuro de etidio (1 ppm; 30 min). ADN NT: plásmido pUC18 sin tratamiento; ADN TT: plásmido pUC18 bajo estrés oxidativo por el radical $OH^{\bullet}$ generado *in situ* [H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm]; I/II/VI 100 μM: plásmido PUC18 tratado con hematomato de metilo, atranorina o lobarielina (100 μM) en DMSO + H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm; I/II/VI 200 μM: plásmido pUC18 tratado con hematomato de metilo, atranorina o lobarielina (200 μM) en DMSO + H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm; ELp/ESS: plásmido pUC18 tratado con extracto de *L. pallida* (0.40 o 0.80 ppm) o *S. strictum* (0.41 o 0.82 ppm) en DMSO + H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm; DMSO: plásmido pUC18 tratado con DMSO + H_2O_2 (100 mM) + UV 254 nm (Control de disolvente). CS: forma circular superenrollada del ADN; LIN: forma lineal del ADN; CA: forma circular abierta del ADN. λHind, 50pb y 100pb: Marcadores de peso molecular. Se calculo la densidad óptica de la banda ADN LIN para determinar el porcentaje de protección. Evaluados en tres ensayos independientes.

Ya que la lobarielina (**VI**) y los extractos metanólicos de *S. strictum* y *L. pallida* protegen el ADN del daño oxidativo causado por la fotolisis al UV de H_2O_2, se pueden considerar como agentes fotoprotectores y antioxidantes que pueden prevenir los daños cutáneos ocasionados por exposición a la radiación UV y a radicales libres, lo cual requiere ser comprobado a través de estudios *in vitro* e *in vivo* más profundos (Rancan et al., 2002; Russo *et al.,* 2008; Kohlhardt-Floehr *et al*., 2010), como los realizados para algunos metabolitos secundarios liquénicos del tipo depsidona (pannarina) y dépsido (esfaeroforina) que además de ser activos como protectores del ADN frente a estrés oxidativo inducido por radicales OH• y óxido nítrico (NO), resultaron ser captadores de radicales libres, e inhibidores del crecimiento de células melanocíticas (cáncer de piel) (Russo *et al.,* 2008). Así mismo el estudio de algunas sustancias liquénicas del tipo depsidona (19-cloropannarina), dibenzofurano (ácido úsnico) y difeniléter (ácido epiforelico I y II), ha determinado que dichas sustancias pueden prevenir el daño de tejidos y órganos, como la piel, ocasionado por exposición a la radiación ultravioleta, al proteger células linfocíticas (linfocitos T, células Jurkat E 6-1) de la radicación UVB y UVA, y actúar como filtros solares en humanos voluntarios presentando un factor de protección similar al de pantallas solares existentes en el mercado. (Rancan *et al*., 2002).

En esta investigación se está aportando la lobarielina (**VI**) a la lista de sustancias liquénicas fotoprotectoras. Este compuesto derivado de ácido liquénico del tipo β-orcinol, se diferencia del hematomato de metilo (**I**) que no resultó activo, en el sustituyente metilo en la posición 5. Este resultado confirma la importancia de dicho sustituyente para la actividad antioxidante.

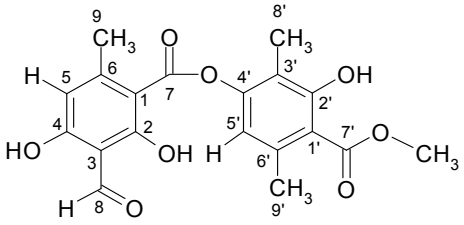


Lobarielina (**VI**)

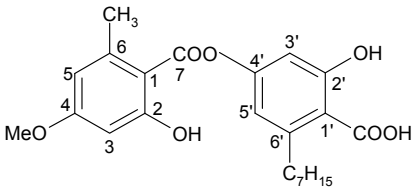


Hematomato de metilo (**I**)

Por otro lado, cabe señalar que la atranorina (**II**) a pesar de ser un dépsido como la esfaeroforina (**Sf**), no presentó propiedades protectoras del ADN como las reportadas para la **Sf** por Russo *et al.,* (2008), lo que puede deberse a las diferencias estructurales de ambas moléculas, como la presencia de una mayor cantidad de sustituyentes en la atranorina, que pueden impedir la reacción de protección frente al radical OH•.



Atranorina (**II**)



Esfaeroforina (**Sf**)

S. strictum var. *compressum* y *L. pallida*, son líquenes que habitan los páramos colombianos encontrándose expuestos de manera permanente a radiación UV intensa, debido a la altitud bastante elevada de la zona y a la rarefacción de ozono en estos hábitats (Rancan *et al.*, 2002), por lo tanto se puede esperar que esas condiciones los estimulen para sintetizar metabolitos frente las radiaciones peligrosas.

Los extractos de los dos LQ han presentado propiedades antioxidantes por los cuatro métodos hasta aquí evaluados, sin embargo *S. strictum* ha resultado ser más activo que *L. pallida*, como captador de radicales libres, agente reductor y protector del ADN contra el daño oxidativo, por lo que podría considerarse que las moléculas presentes en el extracto metanólico del líquen *S. strictum* posiblemente estén actuando de manera sinérgica.

3.4.6 Determinación del efecto citoprotector de los compuestos aislados frente al estrés oxidativo causado por el radical hidroxilo

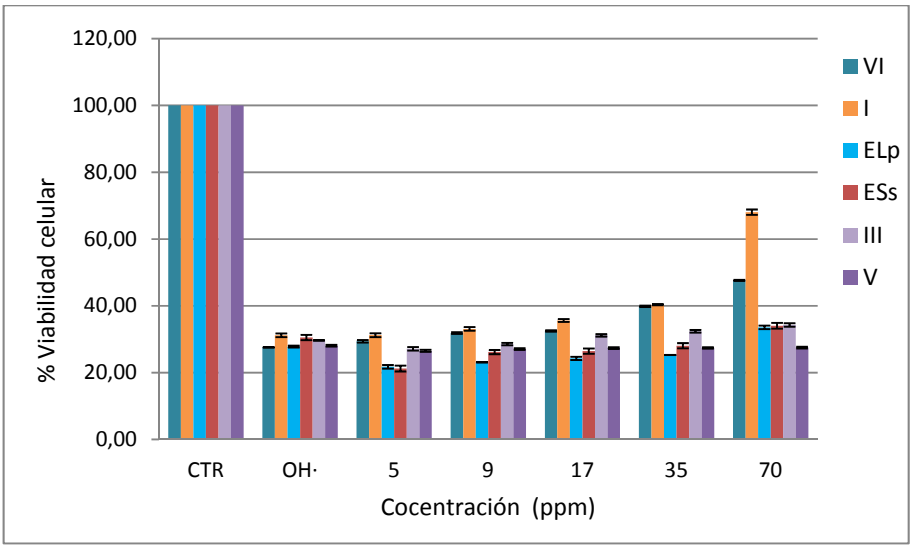
Dado que tanto los extractos de *S. strictum* var. *Compressum y L. pallida* como las sustancias liquénicas hematomato de metilo (**I**), β-orcinol carboxilato de metilo (**III**), ácido porfirílico (**V**) y lobarielina (**VI**) presentaron actividad antioxidante en los modelos previamente evaluados, se decidió determinar el efecto citoprotector de los mismos frente al daño oxidativo causado por el radical OH• (formado *in situ* a través de la fotólisis de H_2O_2 por luz UV (254 nm). Lo anterior con la finalidad de obtener indicios del posible comportamiento de estas sustancias como antioxidantes bajo condiciones biológicas.

Como se ha mencionado, el radical hidroxilo (OH•) constituye el agente oxidante más poderoso en los sistemas biológicos al inducir daños en biomoléculas, tejidos y órganos y desempeñar un papel esencial en la etiología de algunos trastornos clínicos. (Haliwell & Gutteridege, 2007; Morales *et al*., 2009). La modulación de la producción de este radical libre constituye una estrategia adecuada para prevenir o tratar problemas de tipo inflamatorio y patologías el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas mediadas por estrés oxidativo, entre otras. (Armstrong, 2002; Befnaar & Mishra, 2005: Haliwell & Gutteridege, 2007).

El efecto citoprotector se determinó sobre queratinocitos humanos inmortalizados (HaCat), un cultivo primario de neuronas murinas y un cultivo de células de carcinoma de cérvix (HeLa), cuantificando el porcentaje de viabilidad celular, representativo de la protección celular después de haber sometido a la línea celular a daño oxidativo por el radical hidroxilo. La líneas celulares de este estudio se seleccionaron teniendo en cuenta que las neuronas resultan más sensibles al daño oxidativo, lo cual está asociado al desarrollo de enfermedades de tipo neurodegenerativo, mientras que los queratinocitos al ser células presentes en la piel, se encuentran expuestas constantemente al daño oxidativo generado por el medio ambiente (contaminates ambientales, luz UV) asociado con el envejecimiento cutáneo y ciertos tipos de cáncer de piel. Las células HeLa se seleccionaron para el estudio porque experimentalmente se encontró que eran resistentes a la luz ultravioleta, y además nos permiten comparar el efecto protector de los compuestos en líneas celulares normales versus una línea celular tumoral como lo es HeLa.

Se realizó un tamizaje preliminar del efecto citoprotector de todas las sustancias liquénicas y extractos sobre queratinocitos humanos inmortalizados (HaCat) sometidos a estrés oxidativo por el radical libre hidroxilo (gráfica 3-7, construida con datos de la tabla A7a, anexo 7). Se pudo apreciar que OH• por sí solo, causó una disminución del 40 % en la viabilidad celular, representativo del máximo daño oxidativo provocado en las células. Tanto el hematomato de metilo (**I**) como la lobarielina (**VI**) presentaron efecto citoprotector ante el daño oxidativo, porque protegieron significativamente ($p<0.05$) las células a todas las concentraciones evaluadas, presentando un comportamiento dependiente de la concentración. En el caso de las células tratadas con el ácido porfirílico (**V**), aun cuando su efecto antioxidante fue notorio en los otros ensayos efectuados, no provocó una mejora significativa ($p<0.05$) de la viabilidad celular, indicando que carece de poder citoprotector frente al daño oxidativo.

Los extractos de *S. strictum* var. *compressum y L. pallida* protegieron significativamente ($p<0.05$) a las células HaCat del daño oxidativo a la máxima concentración evaluada, mientras que el β-orcinol carboxilato de metilo (**III**) provocó una ligera protección de dichas células entre las concentraciones de 20 y 80 ppm.



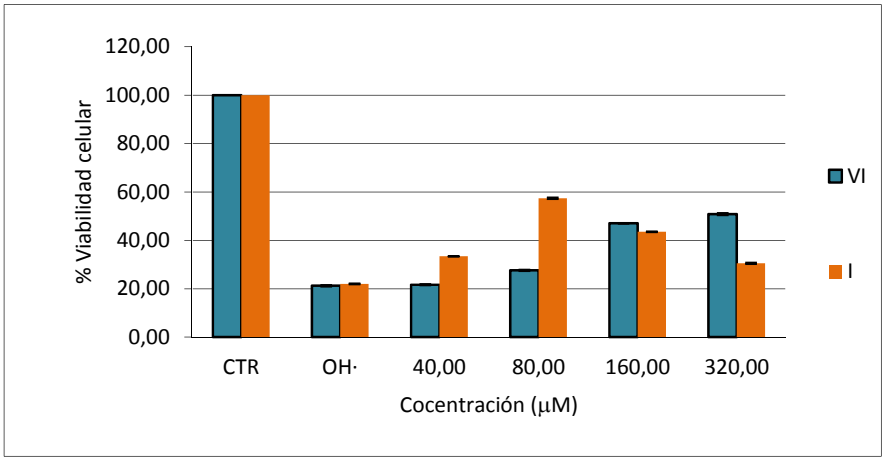
Gráfica 3-7. Efecto citoprotector del hematomato de metilo (I), el β-orcinol carboxilato de metilo (III), el ácido porfirílico (V) y la lobarielina (VI) sobre células HaCat sometidas a daño oxidativo generado por OH•.

CTR: Control de células no expuestas a estrés oxidativo; OH•: Control del máximo daño celular, por exposición a daño oxidativo por el radical OH• generado *in situ* (H_2O_2 (2.5 mM) + UV 254 nm (20 min); 5 a 70 ppm: concentraciones crecientes de los compuestos I, III, V y VI

Estos resultados en conjunto con los de actividad antioxidante y protectora del ADN frente a daño oxidativo, permiten sugerir que la lobarielina y el hematomato de metilo podrían actuar como agentes protectores de las células HaCat no solo frente al radical OH•, sino también contra los rayos UV (UV-C 254nm). Las células HaCat son queratinocitos humanos inmortalizados, cuya función consiste en sintetizar queratina, el principal componente de la piel. Por lo tanto, la protección de estas células por los compuestos **I** y **VI**, complementa los resultados del ensayo de protección del ADN frente al daño oxidativo y permite proponer a la lobarielina como agente protector tanto del ADN como de células cutáneas. Cabe aclarar que en el ensayo de protección del ADN solamente el compuesto **VI** resultó activo, sin embargo los hallazgos obtenidos a nivel celular están sugiriendo que ambos compuestos resultan candidatos promisorios como pantallas solares para uso en formulaciones tópicas, como se ha propuesto para otras sustancias de origen liquénico. (Rancan *et al*., 2002; Russo *et al*., 2008). A lo anterior se suma, el hecho de que diversos autores han propuesto que la administración tópica de antioxidantes podría fortalecer el sistema de protección endógena de la piel, lo que sería una estrategia exitosa contra el daño mediado por la radiación ultravioleta. (Bialy *et al.*, 2002; Sandoval *et al*., 2003; Russo *et al.,* 2008).

El efecto de la lobarielina y el hematomato de metilo como protector de las neuronas murinas (neuroprotector *in vitro*) sometidas a estrés oxidativo por el radical hidroxilo, se presenta en la gráfica 3-8 [construida a partir de los datos de la tabla A7c (anexo 7)]. Como se puede apreciar, **VI** protegió a las neuronas del daño oxidativo generado por OH•, de una manera dependiente de la concentración, mejorando la viabilidad neuronal desde 21.24 % que es el mayor daño observado, hasta el 50.87 % respecto a las células no expuestas a estrés oxidativo (100 %)

Por su parte, **I** mostró un efecto protector que no depende de la concentración evaluada, presentando su máxima neuroprotección (57.42 %) a una concentración de 80 μM; mientras que a concentraciones superiores a 160 μM evidencia una disminución en el porcentaje de viabilidad (representativo de la protección celular), que puede ser explicado por algún efecto citotóxico del compuesto **I** a dicha concentración.



Gráfica 3-8. Efecto citoprotector del hematomato de metilo (I) y la lobarielina (VI) sobre cultivo primario de neuronas sometido a daño oxidativo generado por OH•.

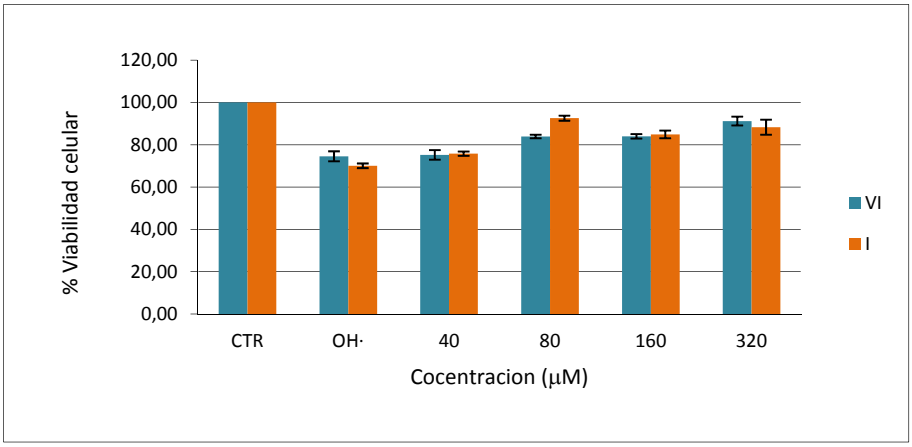
CTR: Control de células no expuestas a estrés oxidativo; OH•: Control del máximo daño celular, por exposición a daño oxidativo por el radical OH• generado *in situ* (H_2O_2 (2.5 mM) + UV 254 nm (20 min); 40 a 320 μM: concentraciones crecientes de los compuestos I y VI

Como se indicó, las células del sistema nervioso central son especialmente más sensibles al daño oxidativo. Esto posiblemente porque están expuestas a la presencia de especies reactivas provenientes del ambiente celular, y porque poseen un alto contenido de componentes lipídicos en las membranas, los cuales constituyen un blanco idóneo para los procesos oxidativos. También se ha podido establecer que este tipo de células presentan una actividad disminuída en la defensa antioxidante (catalasa y glutatión peroxidasa) sumado a que muchos de los neurotrasmisores son moléculas oxidables. (Haliwell & Gutteridege, 2007; Morales *et al.*, 2009). La sobreproducción de especies reactivas en el medio celular, produce estrés oxidativo que provoca una inapropiada muerte neuronal implicada en diversas enfermedades neurodegenerativas, por lo que los agentes antioxidantes se han constituído en herramientas terapéuticas que previenen la aparición de este tipo de patologías. (Haliwell & Gutteridege, 2007; Morales *et al.*, 2009).

Con base en estas consideraciones y dado el efecto neuroprotector *in vitro* de la lobarielina, dicha sustancia constituye un candidato promisorio para desarrollarse como agente neuroprotector del daño causado por procesos degenerativos de tipo oxidativo.

En relación al efecto protector de la lobarielina y el hematomato de metilo sobre las células HeLa (gráfica 3-9, anexo 7: tabla A7d) sometidas a daño oxidativo generado por OH•, se pudo determinar que las mismas condiciones de estrés oxidante que causaron daño sobre las células HaCat y las neuronas, no causaron un efecto deletéreo de la viabilidad celular de estas sobreviviendo en un 70 %. El comportamiento de las células HeLa en este experimento, muestra el grado de resistencia que presentan las líneas tumorales a daños directos como los provocados por la radiación ultravioleta (254 nm) y

aunque no se podría concluir que los compuestos **I** y **VI** protegen este tipo de células, se puede observar que mejoran ligeramente la viabilidad celular entre el 1 y el 15 %, hasta la concentración 80 μM mientras que a las concentraciones de 160 y 320 μM provocaron la disminución de la viabilidad celular, indicando que pueden tener un mínimo efecto citotóxico.



Gráfica 3-9. Efecto citoprotector del hematomato de metilo (I), y la lobarielina (VI) sobre células HeLa sometidas a daño oxidativo generado por OH•.

CTR: Control de células no expuestas a estrés oxidativo; OH•: Control del máximo daño celular, por exposición a daño oxidativo por el radical $OH^{\bullet}$ generado *in situ* (H_2O_2 (2.5 mM) + UV 254 nm (20 min); 40 a 320 μM: concentraciones crecientes de los compuestos I y VI

3.5 Cuantificación del contenido fenólico total en los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum* y correlación con la actividad antioxidante presentada por los mismos

Los compuestos fenólicos resultan excelentes agentes captadores de radicales libres debido a que el potencial de reducción frente al que presentan las EOR. (Haliwell & Gutteridege, 2007; Morata, 2010). Por lo tanto pueden atrapar intermediarios oxígeno reactivos sin promover posteriores reacciones oxidantes. De manera adicional es importante mencionar que muchos factores ambientales que causan estrés oxidativo a menudo inducen la síntesis de metabolitos fenólicos en plantas y líquenes. (Fernández *et al*., 1998; Huneck, 1999; Chaparro & Aguirre, 2002; Rancan *et al*., 2002; Kohlhardt-Floehr *et al*., 2010).

De los múltiples métodos que existen para la cuantificación del contenido fenólico total de muestras de diversos orígenes, el de Folin-Ciocalteu (FC) se ha propuesto como un método estandarizado de rutina para la cuantificación de éstos metabolitos. Este método consiste en una reacción de óxido-reducción, en la cual el reactivo de FC es el agente oxidante y los fenoles totales son el agente reductor; los compuestos fenólicos al ser fácilmente oxidables en medio básico (Na_2CO_3 al 5-10 %, acuoso), reaccionan transfiriendo electrones al molibdato que contiene el reactivo FC y produciendo óxido de

molibdeno MoO, un compuesto que puede ser identificado y cuantificado por espectroscopia UV/VIS (750 - 765 nm). (Ramirez, 2005; Jayaprakasha & Patil, 2007; Maisuthisakul *et al*., 2007; Martínez, 2007).

Diversos estudios (Gulcin *et al.*, 2002; Odabasoglu *et al.*, 2004; Hsu, 2006; Katalinic *et al.*, 2006; Verma *et al.*, 2008; Goze *et al.*, 2009; Hodzic *et al.*, 2009) establecen una relación directa entre el contenido fenólico total (determinado por FC) en extractos de distintos orígenes y su actividad antioxidante, llegando incluso a utilizar este contenido como criterio de actividad antioxidante de la muestra. (Gulcin *et al.*, 2002; Gulluce *et al.*, 2006).

Los resultados del contenido fenólico total (CFT) (expresados en equivalentes de ácido gálico (EAG) para los extractos metanólicos de *S. strictum* var. *compressum* (ESs) *y L. pallida* (ELp)*,* son dados en la tabla 3-13, donde se puede apreciar que el ESs exhibe un contenido fenólico total levemente menor al presentado por ELp.

Tabla 3-13: Contenido Fenólico Total de los extractos metanólicos de *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida*

Muestra	mg/mL	Fenoles Totales mg EGA / g extracto		
		Media	Ds	
ESs	232.76	0.155	0.0020	0.156 ± 0.001
	506	0.154	0.0012	
	708.4	0.157	0.0009	
ELp	230	0.166	0.0015	**0.165 ± 0.001**
	500	0.166	0.0016	
	700	0.164	0.0011	

Con la finalidad de poder establecer una posible correlación entre la actividad antioxidante de los extractos debida al contenido total de compuestos fenólicos de los mismos, se realizó una comparación del contenido fenólico total (CFT) con los resultados de los modelos antioxidantes (tabla 3-14): poder reductor férrico (PRF), inhibición de peroxidación lipídica (% IAL) y poder captador de radicales libres (CE_{50}) para los dos extractos.

Tabla 3-14: Correlación entre la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum* y el contenido fenólico total de los mismos

Extracto	CE_{50}	**PRF** (Abs ± Ds)				
	[Exto] /[DPPH•]	5 ppm	50 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
S. strictum	**0.96**	0.009 ± 0.004*	**0.042 ± 0.002**	0.072 ± 0.018*	**0.316 ± 0.020**	**0.515 ± 0.005**
L. pallida	0.85	0.010 ± 0.002*	0.019 ± 0.002	0.055 ± 0.007*	0.164 ± 0.016	0.353 ± 0.008
Extracto	**CFT**	% **IAL** ± EEM				
	EAG/gExto	5 ppm	50 ppm	100 ppm	500 ppm	1000 ppm
S. strictum	0.156*	17.08 ± 0.342	43.41 ± 0.164	52.84 ± 0.219	77.44 ± 0.495*	81.83 ± 0.379*
L. pallida	**0.165***	**31.51 ± 0.329**	**54.66 ± 0.236**	**57.78 ±0.466**	76.62 ± 0.382*	82.38 ± 0.393*

*No existen diferencias significativas entre los valores ($p<0.01$)

CE_{50} (concentración efectiva 50), PRF (poder reductor férrico), % IAL (inhibición de peroxidación lipídica del ácido linoléico)

Cabe resaltar que a pesar de que el extracto metanólico de *S. strictum* posee un contenido fenólico total (CFT) menor al del extracto de *L. pallida*, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas ($p<0.01$) entre los dos valores (tabla 3-14). Los resultados permiten evidenciar una dependencia creciente de los valores de PRF y del % IAL con la concentración de extracto aunque estos no siguen una tendencia de tipo lineal. Para el PRF, este fenómeno también se ha presentado en estudios similares hechos con otros extractos de líquenes (Odabasoglu *et al*., 2004), aun cuando diversos autores han podido establecer una relación directa entre el contenido fenólico total y la actividad antioxidante de extractos provenientes de plantas, que se constituye en un criterio de actividad antioxidante de la planta.

En un rango de 5 a 100 ppm se observan diferencias significativas en el % IAL para ambos extractos. Sin embargo estas diferencias dejan de ser significativas a concentraciones superiores (500 y 1000 ppm). Por el contrario para PRF, a concentraciones superiores de 50 ppm, se aprecian diferencias significativas para ambos extractos. El extracto de *S. strictum* posee un mayor poder captador de radicales libres y un poder reductor férrico significativamente más alto ($p<0.01$) que el causado por el extracto de *L. pallida*; mientras que este último posee mejores propiedades como inhibidor de la peroxidación lipídica del ácido linoléico siendo significativamente más activo que *S. strictum* en la mayoría de las concentraciones evaluadas.

Los resultados indican que independientemente del contenido fenólico total de ambos líquenes estos causan diferentes efectos antioxidantes, ya que si bien, la mayoría de los compuestos aislados de las especies estudiadas son de naturaleza fenólica, no todos poseen la misma potencia antioxidante, ni la misma abundancia en el extracto; encontrándose en diversos rangos de actividad: potentes (**I, V, VI**), moderadamente potentes (**II**, **III)** y con actividad antioxidante débil o nula (**VII**) y de abundancia: en *S. stricutm* el compuesto más abundante es el hematomato de metilo (I) presente en un 3.67 %, seguido por β-orcinol carboxilato de metilo (III) 1.89 %, atranorina (II) 1.84 %, ácido porfirílico (V) 0.98 % y 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV) 0.22 %; en *L. pallida* los compuestos más abundantes no se pueden considerar antioxidantes y son el polihidroxialcohol (VIII) 14.62 % y el orselinato de metilo (VII) 13.72 %, mientras que la lobarielina (VI) que es el agente antioxidante más potente de todos los evaluados en este estudio está presente en un escaso porcentaje del 0.41 %.

Por lo tanto, el hecho de que el compuesto más potente de *Lobariella pallida* sea escaso y por el contrario los compuestos inactivos sean abundantes podría causar una disminución de la actividad antioxidante total del extracto. Lo que al parecer no ocurre en *Stereocaulon strictum* var. *compressum* aun cuando uno de los compuestos más potentes, el ácido porfirílico no sea abundante, el otro, el hematomato de metilo es el componente mayoritario y los demás se encuentran en cantidades moderadas. Es importante tener en cuenta, que el ensayo de Folin-Ciocalteu no es específico para compuestos fenólicos por lo que puede detectar también otros sustratos de oxidación. Adicionalmente, es necesario considerar el posible sinergismo que se pudiera presentar entre los compuestos fenólicos presentes en el extracto o incluso el que no se hayan aislado componentes minoritarios del extracto, que presenten actividad antioxidante. (Odabasoglu *et al*., 2004). Hasta donde se lleva esta investigación se han aislado compuestos de naturaleza fenólica (derivados de ácidos liquénicos, dépsidos y dibenzofuranos), que explican en gran medida la actividad antioxidante de los extractos; sin embargo no se debe descartar que esta actividad también se deba al contenido de otros compuestos no fenólicos.

3.6 Determinación de la actividad Citotóxica de extractos y compuestos aislados de *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum*

Los compuestos fenólicos tienen numerosas actividades biológicas siendo la mejor descrita su capacidad de actuar como antioxidantes. Sin embargo, también existen algunos estudios que evidencian de manera creciente que los compuestos fenólicos pueden causar citotoxicidad relacionada con sus efectos pro-oxidantes. (Galati & O'Brien, 2004; Nameikaite-Ceineré *et al.,* 2005).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos se basa en su poder captador de radicales libres y en la quelación de metales involucrados en los procesos oxidativos. Los radicales derivados de fenoles, son intermediarios más estables y menos reactivos, debido a la deslocalización del electrón desapareado sobre la nube electrónica del anillo aromático. (Cao *et al*., 1997; Haliwell & Gutteridege, 2007; Morata, 2010).

Una exposición a niveles demasiado altos de fenoles puede saturar las células provocando la formación de EOR, a través del mismo mecanismo que permite a estos compuestos captar radicales libres, lo que implica que sean moléculas potencialmente tóxicas al presentar propiedades pro-oxidantes. (Skibola & Smith, 2000; Lambert *et al.,* 2007).

El carácter antioxidante / pro-oxidante está determinado por la estabilidad redox del primer radical fenoxilo formado a partir del compuesto fenólico original. Uno de los mecanismos en los que se basa el efecto pro-oxidante es la formación de radicales fenoxilo lábiles que logran librar todos los procesos enzimáticos de la defensa antioxidante celular hasta producir radicales hidroxilo altamente peligrosos para las biomoléculas. Dicho mecanismo se encuentra relacionado con ciertas acciones mutagénicas y citotóxicas de los fenoles en condiciones pro – oxidantes, ya que estos pueden inducir apoptosis anormal, disminuir la activación de factores de transcripción y la expresión de moléculas de adhesión e inhibir el crecimiento y la proliferación celular, entre otros. (Nameikaite-Ceineré *et al.,* 2005; Schmidt *et al.,* 2005).

En esta investigación, se estudiaron los efectos citotóxicos de los compuestos liquénicos obtenidos de *S. strctum* y *L. pallida*. Estos compuestos mostraron una actividad antioxidante y citoprotectora prometedora, pero surge el interés de conocer si también pueden ejercer efecto citotóxico posiblemente relacionado con procesos de tipo pro-oxidante. Adicionalmente es necesario garantizar la seguridad de estos compuestos para las células normales del organismo y seleccionar los menos tóxicos entre los que presentan mejor actividad antioxidante.

En la tabla 3-15 se presentan los resultados de citotoxicidad expresados como concentración inhibitoria del crecimiento celular 50 (CI_{50}), para los extractos metanólicos de *S. strictum* var*. compressum* y *L. pallida,* los compuestos hematomato de metilo (**I**), ácido porfirílico (**V**), lobarielina (**VI**), atranorina (**II**) y 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**), comparados frente al antitumoral cisplatino.

Tabla 3-15: Citotoxicidad (CI_{50}) del extracto metanólico y compuestos aislados de *S. strictum var. compressum* y *L. pallida*

Tratamiento	CI_{50} ± Ds				
	HaCat	HeLa	Mcf-7	k562	Pc3
Cisplatino, μM	**17.35±1.08**	**19.37±3.27**	**68.85±7.88**	**13.24±1.04**	**15.87±1.10**
Hematomato de metilo (I), μM	**248.88 ± 1.10**	**206.54 ± 1.05**	**442.59 ± 1.12**	**234.42 ± 1.05**	**222.84 ± 1.03**
Ácido porfirílico (V), μM	>218.53	>218.77	>222.99	>218.77	Nd
Lobarielina (VI), μM	> 317.42	>381.01	> 317.42	**263.53±1.05**	Nd
Extracto de *S. strictum,* μg/mL	>68.62	>68.62	>68.62	>68.62	Nd
Extracto de *L. pallida*, μg/mL	>67.22	>67.22	>67.22	>67.22	Nd
Atranorina (II), μM	> 183.53	Nd	Nd	Nd	Nd
2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV), μM	> 381.22	Nd	Nd	Nd	Nd

Ensayo por triplicado, Ds: desviación estándar Nd: no determinado
HaCat: queratinocitos humanos inmortalizados; MCF-7: adenocarcinoma de mama; HeLa: adenocarcinoma cervico uterino; K562: eritroleucemia; PC3: adenocarcinoma de próstata

De acuerdo a los estándares del Instituto Nacional de Cáncer (INC) de los Estados Unidos (Bezivin, 2003), un extracto crudo resulta citotóxico si presenta una $CI_{50} \leq 20$ μg/mL. En este estudio, las CI_{50} de los extractos es superior a 67 μg/mL. Las máximas concentraciones evaluadas para los extractos (ESs 68.62 y ELp 67.22 μg/mL) estuvieron limitadas por la solubilidad de los mismos en el medio, lo que puede estar relacionado con que no se detectara la CI_{50} para los mismos.

Dado que a las concentraciones evaluadas, tanto los extractos metanólicos de *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida* como los compuestos ácido porfirílico (**V**) y lobarielina (**VI**), atranorina (**II**) y 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (**IV**), aislados de los mismos, no alcanzaron una inhibición del crecimiento celular del 50 % o un valor inferior al recomendado por el INC, se puede inferir que no resultaron ser tóxicos ni para queratinocitos humanos (HaCat), ni para las líneas tumorales HeLa, Mcf-7, k562 y PC-3.

Aun cuando se pudo calcular una CI_{50} para el hematomato de metilo (**I**), este mostró una baja citotoxicidad (CI_{50} > 200 μM) en comparación con el antitumoral cisplatino que fue usado como control (CI_{50} < 68.85 μM).

Tabla 3-16: Índice de selectividad (IS) del Cisplatino y del hematomato de metilo

Tratamiento	*IS*			
	HeLa	Mcf-7	k562	Pc3
Cisplatino μM	*0.90*	*0.25*	*1.31*	*1.09*
Hematomato de metilo (I), μM	*1.20*	*0.56*	*1.06*	*1.12*

De acuerdo al valor del índice de selectividad (IS), que compara la acción citotóxica de una muestra respecto a células tumorales vs. células normales, un valor calculado de IS > 3.0 se considera prometedor (Bezivin *et al*., 2003) dado que muestra mayor selectividad de la acción del compuesto sobre los tumores. En el caso de los valores obtenidos en este estudio, tanto el compuesto hematomato de metilo (**I**) como el cisplatino no superan el valor de 1.5, (tabla 3-16) lo cual indicaría que su índice de selectividad es bajo, por lo tanto, estos compuestos no presentan selectividad de acción.

Debido al IS bajo el cisplatino causa efectos secundarios en los pacientes con cáncer tratados con éste. Por su parte, el bajo índice de selectividad del hematomato de metilo se debe a su escasa toxicidad celular a las concentraciones evaluadas en esta investigación.

Varios investigadores han reportado la citotoxicidad de metabolitos secundarios aislados de líquenes (Correche *et al*., 2002; Bezivin *et al*., 2003; Russo *et al*., 2006; Zeytinoglu *et al*., 2009; Millot *et al*., 2009, Backorova *et al*., 2011). Sin embargo, los resultados de este estudio permiten indicar que ni los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum* ni los compuestos liquénicos aislados a la fecha de los mismos, son citotóxicos a las concentraciones evaluadas.

Por lo tanto, se puede establecer que las más altas concentraciones de los compuestos antioxidantes evaluados no provocan efectos tóxicos posiblemente relacionados con procesos pro-oxidantes, y así como son seguras para células HaCat, podrían serlo para las células normales del organismo ejerciendo su acción antioxidante con el mínimo efecto tóxico para el mismo

Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- Esta investigación condujo al aislamiento de dos productos naturales novedosos, el compuesto 3-formil-2,4-dihidroxi-5,6-dimetil-benzoato de metilo, que se denominó lobarielina (**VI**) aislado del líquen *Lobariella pallida* (Hook. f.) Moncada & Lücking, (Lobarieaceae) y el compuesto 2-metoxi-4,5-dimetil benzaldehído denominado stereocaulina (**IV**) proveniente de *Stereocaulon strictum* var. *compressum* (Nyl.) I.M. Lamb., (Stereocaulaceae).

- El estudio Químico dirigido a la obtención de principios antioxidantes de los extractos también permitió la obtención de los compuestos: orselinato de metilo (**VII**) y un polihidroxialcohol (**VIII**) reportados por primera vez para *L. pallida*, así como hematomato de metilo (**I**) y β-orcinol carboxilato de metilo (**III**) reportados por primera vez para *S. strictum* var. *compressum* junto con atranorina (**II**) y ácido porfirílico (**V)** confirmados para la misma.

- Se identificó y confirmo la actividad antioxidante en las dos especies estudiadas, encontrando que la misma no se correlaciona linealmente con el contenido fenólico total de los extractos sino que también se asocia a la presencia de moléculas no fenólicas.

- Por medio de los estudios in vitro realizados se determinó que los compuestos **I** a **VI** son antioxidantes**,** siendo **I**, **V** y **VI** prometedores como prototipos antioxidantes novedosos.

- Las sustancia liquénicas **I, III, IV, V** y **VI** pueden ser útiles como auxiliares de formulación que preserven productos frente al del daño oxidativo dado que su efectividad como antioxidantes es prolongada.

- Los extractos metanólicos de *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum* y el compuesto lobarielina (**VI**) mostraron ser agentes protectores del ADN frente al daño oxidativo generado por el radical hidroxilo (OH•), dando indicio de su potencial fotoprotector.

- Los compuestos **I** y **VI** son prometedores como citoprotectores y neuroprotectores frente a radiaciones UV y efectos nocivos de radicales libres y en consecuencia pueden ser empleados como pantallas solares y como moléculas prototipo para estudios dirigidos a la prevención y tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

- Los extractos y metabolitos evaluados no son citotóxicos sobre la línea de Queratinocitos Humanos Inmortalizados (HaCat) a las concentraciones que resultan efectivos como antioxidantes, lo que permite predecir su inocuidad en células normales.

- Los extractos y compuestos de los líquenes *Stereocaulon strictum* y *Lobariella pallida* no son citotóxicos sobre las líneas tumorales (HeLa, Mcf-7, k562 y PC-3) y no poseen potencial antitumoral para estos tipos de cáncer a las concentraciones estudiadas.

- **Este es el primer trabajo doctoral colombiano encaminado al estudio farmacéutico de los Líquenes, por lo tanto los hallazgos derivados de esta investigación se constituyen en un aporte científico al conocimiento de las propiedades bioactivas y químicas de la de las especies estudiadas, y al descubrimiento de las potencialidades de la megadiversidad biológica colombiana, ya de los líquenes en general han sido poco estudiados en el país, así como es escaso el estudio de las propiedades químicas y biológicas de las especies provenientes de los páramos .**

.

4.2 Recomendaciones

- Las sustancias liquénicas (**I, V** y **VI**) aisladas de *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida,* son moléculas que podrían ser empleadas para encaminar estudios farmacológicos, toxicológicos y farmacotécnicos más profundos, con el fin confirmar su utilidad como agentes antioxidantes en la industria farmacéutica.

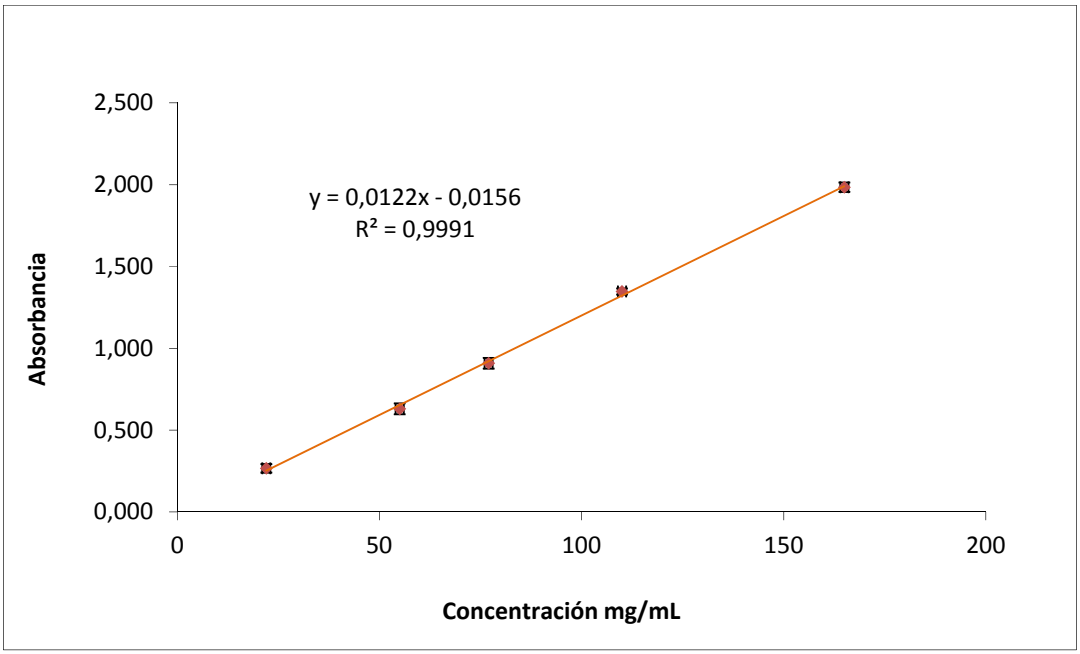
- Es recomendable complementar el estudio químico de *Lobariella pallida*, con el fin de aislar más metabolitos secundarios de las fracciones provenientes del extracto metanólico.

ANEXOS

Anexo 1
Datos y resultados del Contenido fenólico total de los extractos de *Stereocaulon strictum* var. *compressum* y *Lobariella pallida*

Tabla A1a. Curva calibración Equivalentes de ácido gálico a 30.00 ± 0.01 ºC

[A. gálico]	Absorbancia						Media	Ds	EEM
mg/mL	765nm								
22	0.265	0.263	0.297	0.297	0.239	0.239	0.267	0.026	0.027
55	0.645	0.644	0.658	0.588	0.589	0.659	0.631	0.033	0.030
77	0.886	0.887	0.952	0.950	0.889	0.890	0.909	0.033	0.030
110	1.364	1.363	1.324	1.325	1.353	1.359	1.348	0.019	0.023
165	1.975	1.969	2.022	2.022	1.958	1.964	1.985	0.029	0.028



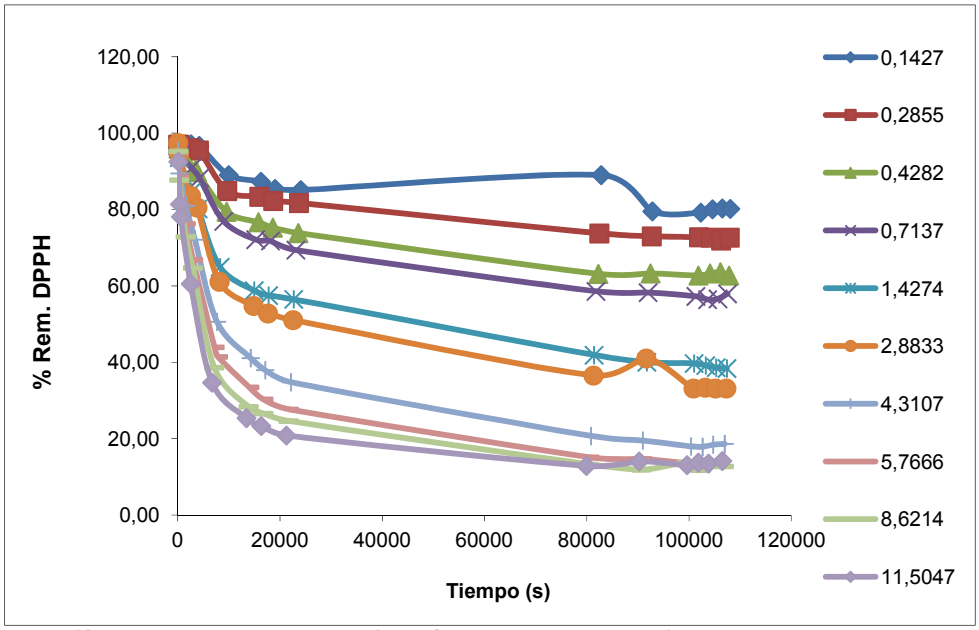
Gráfica A1a. Contenido fenólico total, curva de calibración Equivalentes de ácido gálico

Anexo 2
Datos y resultados Poder captador de radical libre DPPH• para las sustancias liquénicas de *S. strictum* var. *compressum*

Tabla A2a. Determinación de las concentraciones de radical libre y cálculo del porcentaje remanente de DPPH•, en el tiempo, para la exposición al extracto de *S. strictum* (ESs)

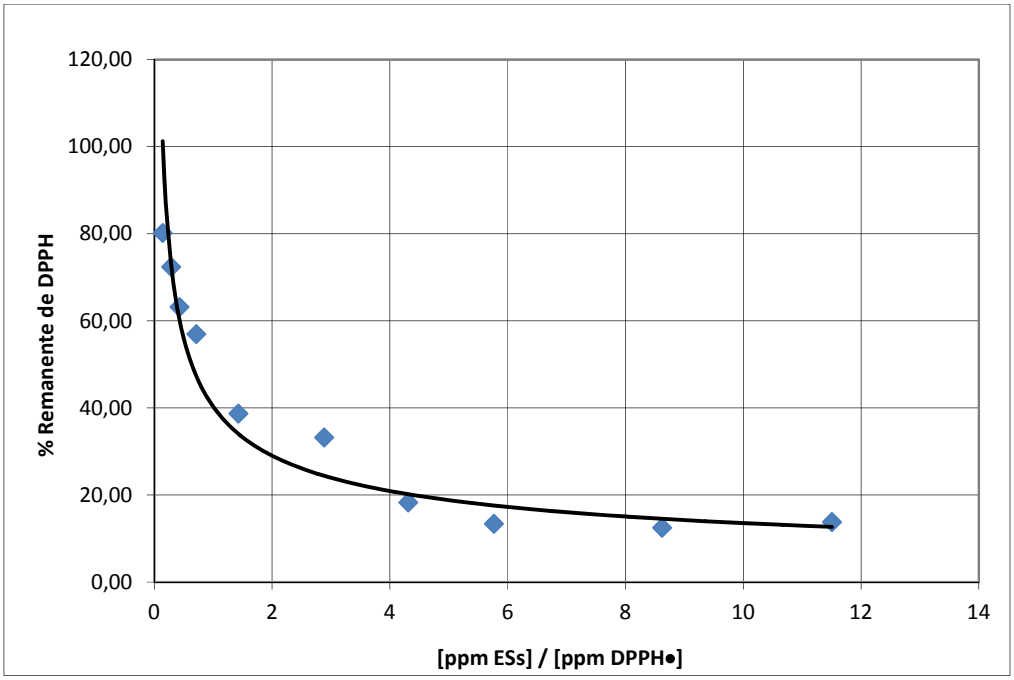
#	Relación ppm de Extracto de *S. strictum* / DPPH•									
	0.1427	**0.2855**	**0.4282**	**0.7137**	**1.4274**	**2.8833**	**4.3107**	**5.7666**	**8.6214**	**11.5047**
	Tiempo (segundos)									
1	34	42	37	45	44	39	127	44	32	33
2	2110	2023	2007	1931	1940	1867	1865	1677	1622	1515
3	4565	4604	4511	4433	4499	4422	4417	4229	4144	4034
4	7290	7005	7018	6939	7045	6970	6960	6775	6700	6596
5	8462	8372	8344	8269	8250	8173	8144	7959	7863	7754
6	42804	42715	42720	42640	42638	42560	42548	42362	42258	42149
7	53973	53889	54221	54143	54143	54073	54074	53895	57515	57429
8	73166	73080	73118	73038	73112	73040	73061	72881	72788	72680
9	86713	86626	86640	86561	86568	86495	86514	86328	86223	86122
10	90852	90765	90784	90705	90699	90628	90610	90459	90258	90219
11	102166	102080	102098	102276	102034	102020	101933	101747	101495	101528
	Concentración μM DPPH									
1	88,05	88,26	87,00	86,90	86,58	88,36	83,75	84,70	84,70	84,70
2	83,44	85,12	83,34	82,81	81,66	82,60	77,89	79,15	79,15	78,94
3	82,08	83,44	81,14	79,04	77,47	78,00	73,28	74,02	74,33	73,07
4	81,14	82,50	79,36	76,95	75,06	75,48	70,56	70,88	71,40	69,62
5	81,14	82,39	78,83	76,42	74,44	74,64	69,62	70,14	70,14	68,36
6	76,74	70,77	67,00	59,57	55,59	53,60	50,46	48,89	50,46	43,76
7	74,33	67,63	64,59	58,42	47,53	37,06	35,49	33,39	31,19	28,37
8	67,21	57,16	45,85	37,27	35,91	33,29	31,30	30,36	20,93	20,30
9	63,02	50,35	38,10	29,62	25,96	24,07	21,56	20,30	18,52	17,27
10	62,92	50,25	37,79	29,52	26,48	24,18	21,56	20,20	18,11	17,16
11	63,13	49,83	37,69	29,62	25,96	24,18	21,56	20,10	18,11	17,06
	% Remanente DPPH									
1	95,97	96,20	94,83	94,72	94,37	96,31	91,29	92,32	92,32	92,32
2	90,95	92,78	90,84	90,27	89,01	90,04	84,90	86,27	86,27	86,04
3	89,47	90,95	88,44	86,16	84,44	85,02	79,88	80,68	81,02	79,65
4	88,44	89,92	86,50	83,87	81,82	82,28	76,91	77,25	77,83	75,89
5	88,44	89,81	85,93	83,30	81,14	81,36	75,89	76,46	76,46	74,52
6	87,89	81,05	76,74	68,22	63,67	61,39	57,79	55,99	57,79	50,12
7	85,13	77,46	73,98	66,90	54,43	42,44	40,64	38,24	35,73	32,49
8	76,98	65,46	52,51	42,68	41,12	38,12	35,85	34,77	23,97	23,25
9	73,94	59,08	44,70	34,75	30,45	28,24	25,30	23,82	21,73	20,26
10	73,82	58,95	44,33	34,63	31,07	28,37	25,30	23,70	21,24	20,14
11	74,06	58,46	44,21	34,75	30,45	28,37	25,30	23,58	21,24	20,01

*Calculada a partir de los datos de absorbancia con la ecuación de la curva de calibración: ABS=0.009550938x[DPPH•]+0.012070550. **Los cálculos se realizaron frente a las concentraciones de DPPH (100%) sin exposición a la muestra para el día de lectura 1 (95.95 μM), 2 (83.99 μM).



Gráfica A2a. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones del extracto de *S. strictum* (ESs) (ppm) / DPPH• (ppm).

Cada curva corresponde a una relación en [muestra]/ [DPPH]

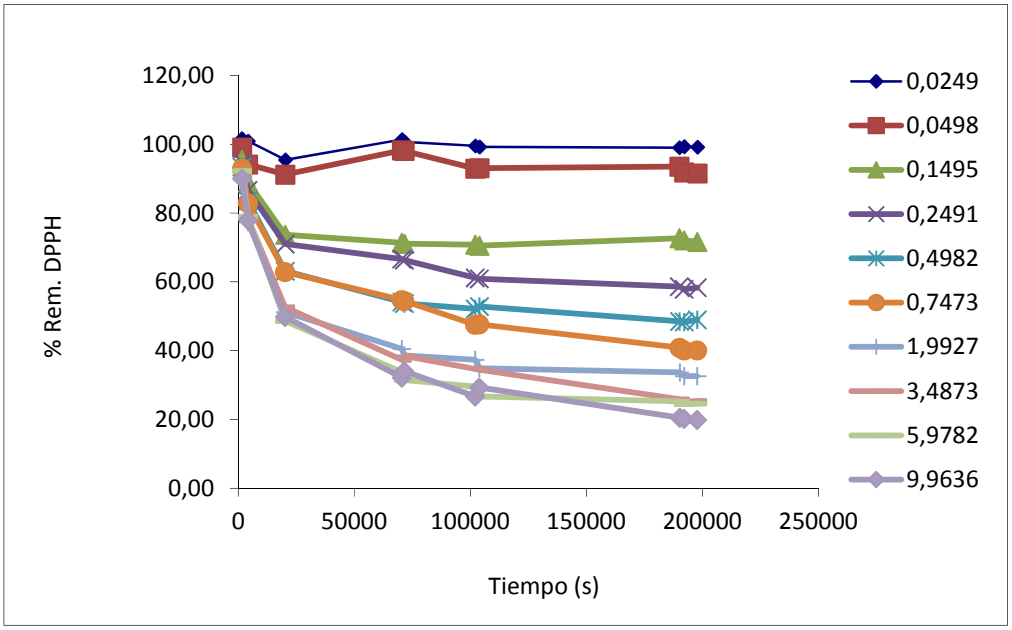


Gráfica A2b. Determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) del extracto de *S. strictum*.

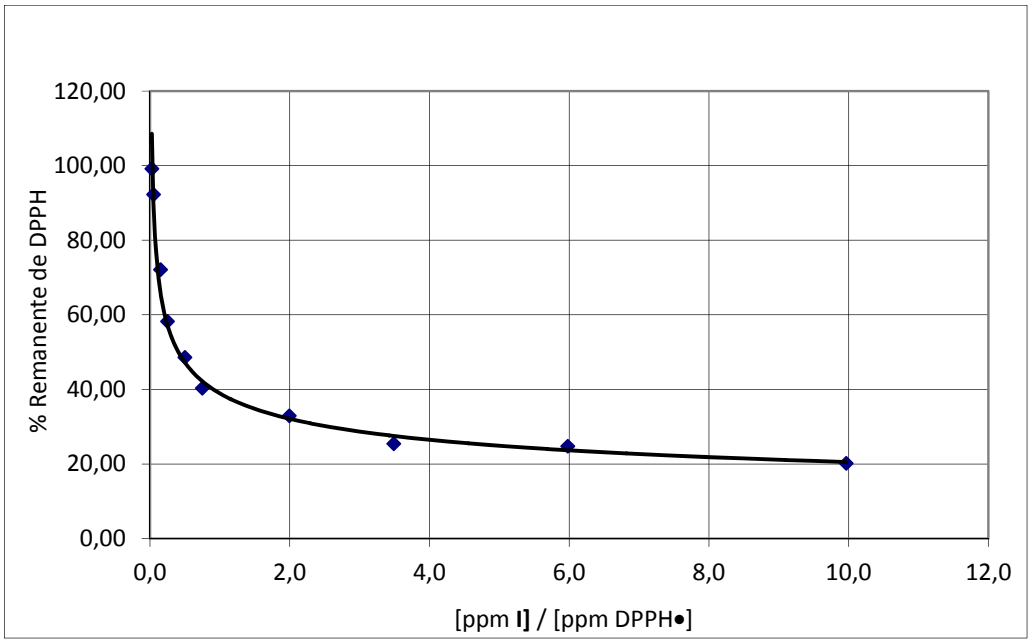
Tabla A2b. Determinación de las concentraciones de radical libre y cálculo del porcentaje remanente de DPPH•, en el tiempo, para la exposición al hematomato de metilo (I)

#	Relación ppm Hematomato de metilo (I) *S. strictum* / ppm DPPH•									
	0.0249	**0.0498**	**0.1495**	**0.2491**	**0.4982**	**0.7473**	**1.9927**	**3.4873**	**5.9782**	**9.9636**
	Tiempo (segundos)									
1	1594	1656	1523	1623	1590	1597	1589	1623	1590	1622
2	4298	4220	4175	4150	4203	4119	4179	4126	4160	4137
3	20324	20246	20211	20183	20217	20131	20194	20146	20168	20143
4	70587	70505	70437	70406	70514	70426	70489	70438	70468	70441
5	71732	71645	71578	71549	71567	71477	71532	71478	71528	71504
6	102178	102092	102093	102062	102087	102003	102076	102022	102041	102014
7	104019	103934	103906	103875	103884	103794	103842	103790	103809	103785
8	190134	190050	190049	190018	190145	190056	190237	190186	190255	190231
9	192210	192124	192104	192077	192140	192053	192100	192047	192064	192038
10	197932	197844	197759	197729	197752	197663	197712	197660	197682	197665
	Concentración μM DPPH*									
1	86.476	84.278	81.241	80.613	79.461	79.042	76.320	77.367	78.519	76.634
2	85.848	80.089	75.692	73.703	71.085	70.562	65.850	66.897	67.211	66.374
3	81.241	77.577	62.709	60.406	53.705	53.495	43.549	44.805	41.350	42.397
4	73.912	71.609	52.029	48.574	39.465	39.884	29.519	27.215	24.598	23.446
5	73.389	71.504	51.820	48.365	39.151	39.675	28.157	28.053	22.922	24.807
6	72.551	67.735	51.611	44.596	37.999	34.649	27.215	25.278	21.561	19.467
7	72.342	67.839	51.401	44.386	38.523	34.754	25.435	25.121	19.467	21.352
8	67.735	63.965	49.726	40.093	33.183	27.948	23.027	17.687	17.268	14.023
9	67.944	62.814	49.307	39.570	33.078	27.424	22.294	17.164	16.745	13.813
10	67.839	62.604	48.993	39.884	33.497	27.424	22.294	17.373	16.850	13.604
	% Remanente DPPH**									
1	101.62	99.04	95.47	94.73	93.38	92.88	89.69	90.92	92.27	90.05
2	100.88	94.11	88.95	86.61	83.53	82.92	77.38	78.61	78.98	78.00
3	95.47	91.16	73.69	70.98	63.11	62.86	51.17	52.65	48.59	49.82
4	101.38	98.22	71.37	66.63	54.13	54.71	40.49	37.33	33.74	32.16
5	100.66	98.08	71.08	66.34	53.70	54.42	38.62	38.48	31.44	34.03
6	99.52	92.91	70.79	61.17	52.12	47.53	37.33	34.67	29.57	26.70
7	99.23	93.05	70.50	60.88	52.84	47.67	34.89	34.46	26.70	29.29
8	99.01	93.50	72.68	58.60	48.50	40.85	33.66	25.85	25.24	20.50
9	99.31	91.81	72.07	57.84	48.35	40.09	32.59	25.09	24.48	20.19
10	99.16	91.51	71.61	58.30	48.96	40.09	32.59	25.39	24.63	19.88

*Calculada a partir de los datos de absorbancia con la ecuación de la curva de calibración: ABS=0.009550938x[DPPH•]+0.012070550. **Los cálculos se realizaron frente a las concentraciones de DPPH (100 %) sin exposición a la muestra para el día de lectura 1 (85.10 μM), 2 (72.90 μM).



Gráfica A2c. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones de Hematomato de metilo (I) (ppm) / DPPH• (ppm).
Cada curva corresponde a una relación en [muestra]/ [DPPH]

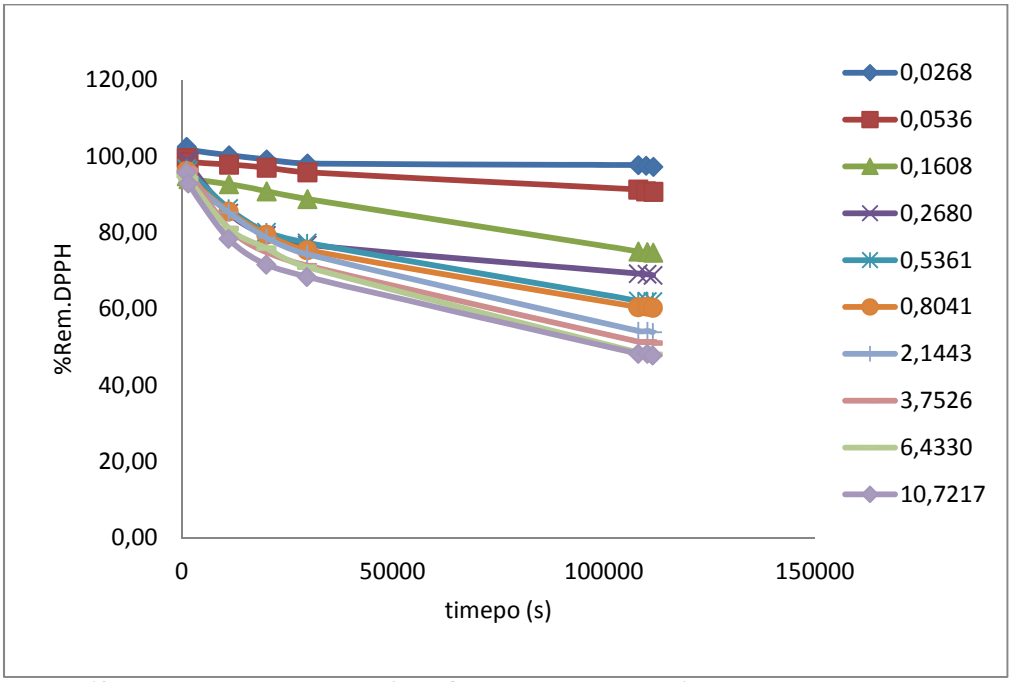


Gráfica A2d.Determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) del Hematomato de metilo (I).

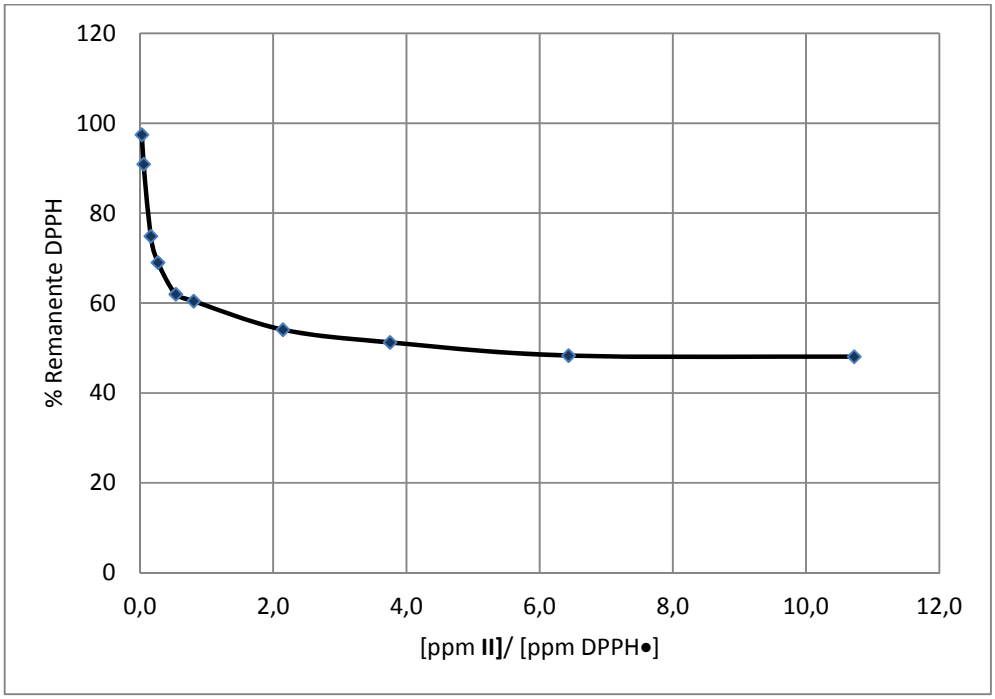
Tabla A2c. Determinación de las concentraciones de radical libre y cálculo del porcentaje remanente de DPPH•, en el tiempo, para la exposición a atranorina (II)

#	Relación ppm Atranorina (II) *S. strictum* / ppm DPPH•									
	0.0268	**0.0536**	**0.1608**	**0.2680**	**0.5361**	**0.8041**	**2.1443**	**3.7526**	**6.4330**	**10.7217**
	Tiempo (segundos)									
1	1148	1143	1181	1125	1141	1109	1085	1135	1132	1091
2	1610	1604	1604	1549	1581	1550	1571	1542	1566	1525
3	11202	11191	11181	11123	11088	11064	11088	11061	11092	11056
4	20099	20097	20098	20039	20056	20026	20048	20020	20037	19995
5	29765	29754	29759	29701	29684	29666	29682	29655	29664	29629
6	108150	108148	108169	108110	108131	108100	108148	108117	108152	108112
7	109992	109987	110269	110213	110279	110250	110300	110271	110306	110267
8	111717	111712	111678	111630	111605	111573	111581	111552	111566	111524
	Concentración μM DPPH• *									
1	85.22	82.81	78.83	82.29	80.51	79.98	80.09	80.40	78.94	79.67
2	84.59	81.97	78.20	81.76	80.09	78.52	78.20	80.09	78.31	77.26
3	77.68	75.80	71.82	65.95	66.90	66.27	66.06	62.81	62.81	60.72
4	76.84	75.17	70.35	61.45	62.08	61.56	60.93	58.00	58.84	55.48
5	76.01	74.23	68.78	59.46	59.88	58.42	57.58	55.28	54.96	52.97
6	68.68	64.17	52.76	48.68	43.65	42.50	38.10	36.11	34.13	33.92
7	68.57	63.86	52.66	48.57	43.55	42.61	38.10	36.11	34.02	33.92
8	68.36	63.76	52.55	48.36	43.55	42.40	37.89	35.91	33.81	33.60
	% Remanente DPPH• **									
1	102.42	99.53	94.75	98.90	96.76	96.13	96.26	96.63	94.87	95.75
2	101.67	98.52	93.99	98.27	96.26	94.37	93.99	96.26	94.12	92.86
3	100.23	97.79	92.66	85.10	86.31	85.50	85.23	81.04	81.04	78.34
4	99.14	96.98	90.77	79.29	80.10	79.42	78.61	74.83	75.91	71.59
5	98.06	95.77	88.74	76.72	77.26	75.37	74.29	71.32	70.91	68.34
6	97.64	91.24	75.02	69.21	62.06	60.43	54.18	51.35	48.52	48.22
7	97.49	90.80	74.87	69.06	61.92	60.58	54.18	51.35	48.37	48.22
8	97.20	90.65	74.72	68.76	61.92	60.28	53.88	51.05	48.07	47.77

*Calculada a partir de los datos de absorbancia con la ecuación de la curva de calibración: ABS=0.009550938x[DPPH•]+0.012070550. **Los cálculos se realizaron frente a las concentraciones de DPPH (100 %) sin exposición a la muestra para el día de lectura 1 (83.20 μM), 2 (77.51 μM) y 3 (70.33 μM).



Gráfica A2e. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones de atranorina II (ppm) / DPPH• (ppm).
Cada curva corresponde a una relación [muestra]/ [DPPH]

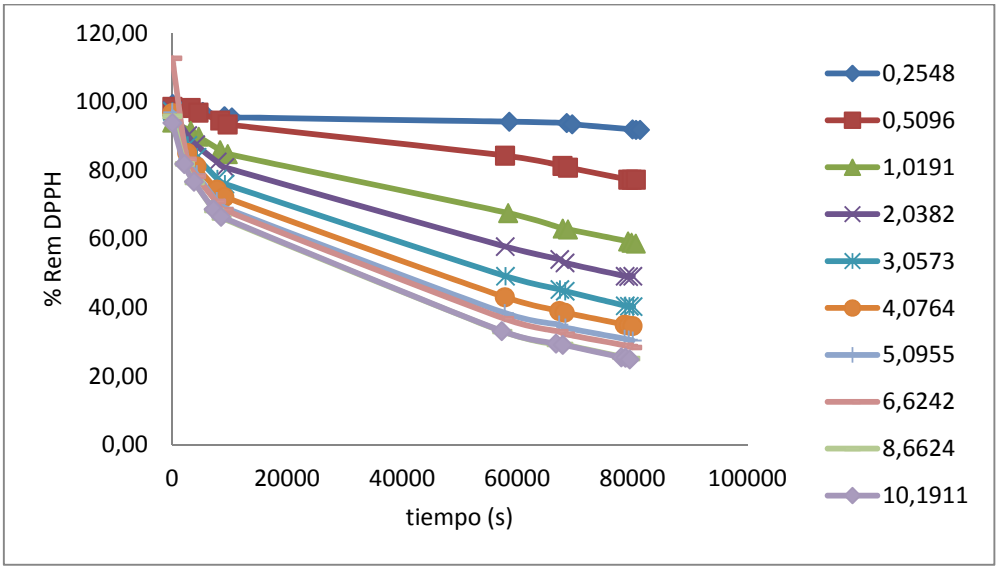


Gráfica A2f. Determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) de atranorina (II).

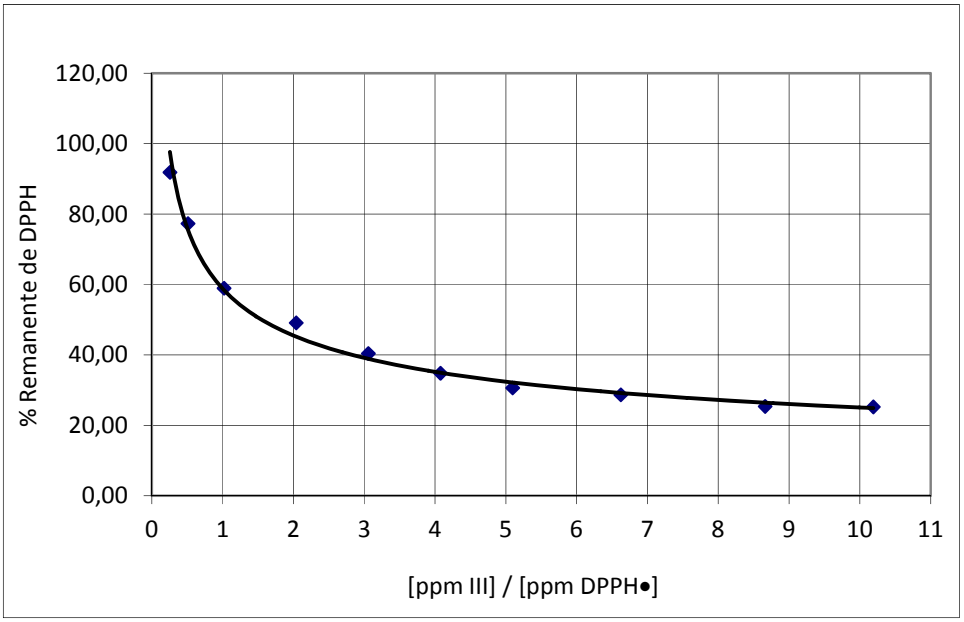
Tabla A2d. Determinación de las concentraciones de radical libre y cálculo del porcentaje remanente de DPPH•, en el tiempo, para la exposición a β-orcinol carboxilato de metilo (III)

#	Relación ppm β-orcinol carboxilato de metilo (III) *S. strictum* / ppm DPPH•									
	0.2548	**0.5096**	**1.0191**	**2.0382**	**3.0573**	**4.0764**	**5.0955**	**6.6242**	**8.6624**	**10.1911**
	Tiempo (segundos)									
1	109	67	35	42	55	38	44	46	49	59
2	3990	3245	3238	2723	2739	2634	2672	2559	2231	2132
3	5338	4593	4631	4122	4344	4240	4290	4176	3923	3824
4	9110	8365	8358	7845	7889	7782	7772	7658	7326	7226
5	10400	9655	9683	9175	9194	9088	9076	8961	8619	8523
6	58600	57855	58401	57896	57934	57829	57817	57702	57385	57284
7	68580	67844	67877	67365	67391	67285	67273	67158	66827	66723
8	69534	68800	68792	68281	68318	68211	68351	68262	67981	67887
9	80009	79277	79241	78733	78747	78642	78627	78514	78159	78062
10	80623	79887	79843	79336	79467	79363	79350	79242	78886	78789
11	81320	80602	80581	80071	80114	80018	80046	79944	79627	79529
	Concentración μM DPPH• *									
1	90.45	89.72	85.53	88.78	88.47	88.05	88.26	102.60	87.21	85.43
2	88.57	89.41	83.34	82.08	79.46	77.47	75.90	75.80	74.54	74.54
3	88.36	88.15	81.76	79.67	76.32	73.91	71.82	71.29	69.62	69.83
4	87.21	86.06	78.20	75.06	70.56	67.73	64.70	64.59	62.19	62.50
5	86.90	85.01	77.16	73.60	69.20	65.75	62.92	62.39	60.20	60.51
6	78.83	70.56	56.53	48.36	41.14	36.01	32.14	30.77	27.63	27.74
7	78.52	68.05	52.76	45.22	37.89	32.66	29.31	27.63	24.49	24.70
8	78.20	67.63	52.55	44.39	37.48	32.24	28.58	27.01	24.49	24.39
9	76.95	64.70	49.62	41.14	33.92	29.31	25.85	24.28	21.46	21.35
10	76.84	64.70	49.31	41.04	33.81	29.10	25.64	23.97	21.25	21.25
11	76.84	64.70	49.10	41.14	33.71	29.00	25.44	23.76	21.04	20.83
	% Remanente DPPH• **									
1	99.38	98.57	93.97	97.54	97.19	96.73	96.96	112.72	95.81	93.86
2	97.31	98.23	91.56	90.18	87.30	85.11	83.39	83.27	81.89	81.89
3	97.08	96.85	89.83	87.53	83.85	81.20	78.90	78.33	76.49	76.72
4	95.81	94.55	85.92	82.47	77.52	74.42	71.08	70.97	68.32	68.67
5	95.47	93.40	84.77	80.86	76.03	72.23	69.13	68.55	66.13	66.48
6	94.21	84.32	67.56	57.80	49.16	43.03	38.40	36.78	33.02	33.15
7	93.83	81.32	63.05	54.04	45.28	39.03	35.02	33.02	29.27	29.52
8	93.46	80.82	62.80	53.04	44.78	38.53	34.15	32.27	29.27	29.14
9	91.95	77.32	59.30	49.16	40.53	35.02	30.90	29.02	25.64	25.52
10	91.83	77.32	58.92	49.04	40.41	34.77	30.65	28.64	25.39	25.39
11	91.83	77.32	58.67	49.16	40.28	34.65	30.40	28.39	25.14	24.89

*Calculada a partir de los datos de absorbancia con la ecuación de la curva de calibración: ABS=0.009550938x[DPPH•]+0.012070550. **Los cálculos se realizaron frente a las concentraciones de DPPH (100 %) sin exposición a la muestra para el día de lectura 1 (91.02 μM) y 2 (83.68 μM).



Gráfica A2g. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones de β-orcinol carboxilato de metilo III (ppm) / DPPH• (ppm).
Cada curva corresponde a una relación [muestra]/ [DPPH]

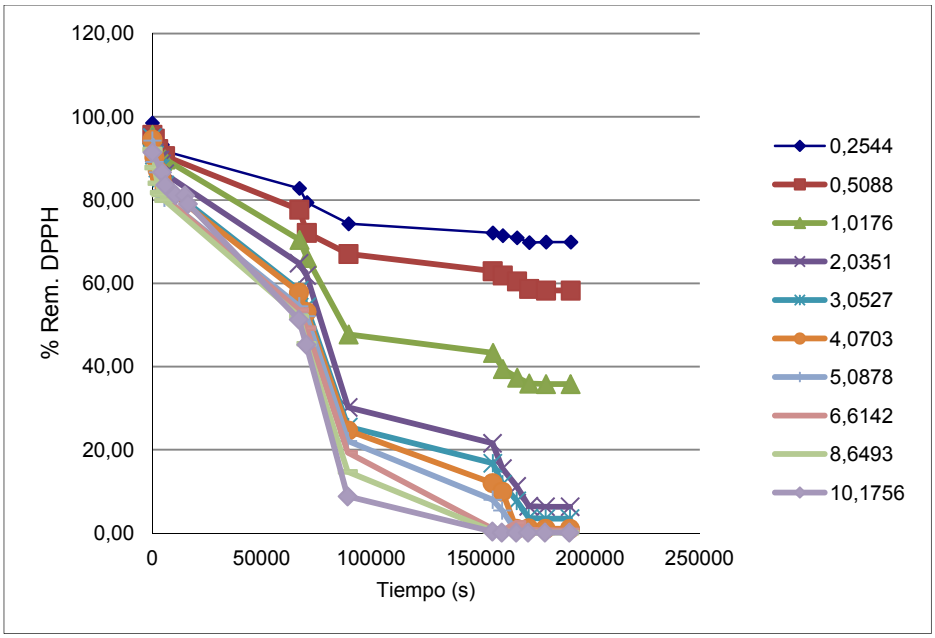


Gráfica A2h. Determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) de β-orcinol carboxilato de metilo (III)

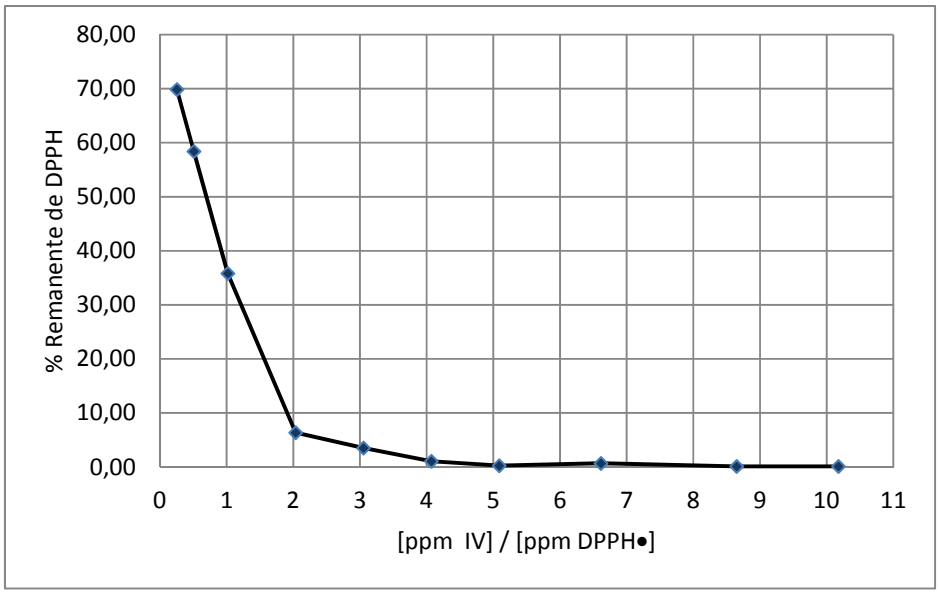
Tabla A2e. Determinación de las concentraciones de radical libre y cálculo del porcentaje remanente de DPPH•, en el tiempo, para la exposición al 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV).

	#	Relación ppm compuesto IV *S. strictum* / ppm DPPH•									
		0.2544	**0.5088**	**1.0176**	**2.0351**	**3.0527**	**4.0703**	**5.0878**	**6.6142**	**8.6493**	**10.1756**
Tiempo (segundos)	1	58	38	57	46	40	46	48	34	35	58
	2	1266	1163	1176	957	998	926	996	895	927	4434
	3	2789	2687	2767	2541	2564	2497	2515	2414	2423	5935
	4	3637	3527	3668	3445	3550	3478	3538	3437	3449	10561
	5	4565	4455	4503	4276	4308	4233	4311	4209	4205	14917
	6	5913	5803	5883	5660	5683	5608	5540	5498	5521	16233
	7	67252	67152	67232	67008	67047	66972	67100	66998	67016	66928
	8	70660	70561	70667	70443	70488	70409	70313	70369	70415	70328
	9	89698	89588	89670	89445	89471	89396	89385	89285	89273	89183
	10	155539	155457	155593	155374	155496	155421	155451	155353	155397	155308
	11	160121	160052	160105	159884	159886	159817	159786	159687	159675	159585
	12	166641	166569	166634	166409	166419	166344	166334	166233	166225	166136
	13	172222	172110	172155	171929	171904	171828	171795	171702	171670	171574
	14	179894	179792	179799	179571	179619	179544	179504	179405	179382	179286
	15	191171	191069	191032	190815	190743	190694	190608	190540	190491	190422
Concentración μM DPPH• *	1	90.66	88.05	87.52	88.05	87.00	87.42	84.80	86.79	84.17	84.80
	2	89.09	87.21	83.54	87.21	82.08	84.07	80.82	83.13	79.78	80.82
	3	85.53	84.91	82.50	84.91	79.78	80.72	78.20	80.19	76.95	77.37
	4	86.27	83.44	83.13	82.50	80.51	77.37	78.62	75.27	77.05	74.75
	5	85.85	82.81	82.29	81.66	78.41	78.52	75.80	74.64	74.85	75.06
	6	84.38	83.34	79.46	82.60	76.32	76.95	74.23	74.12	72.76	73.60
	7	76.22	71.50	59.67	61.03	53.18	53.70	50.14	47.95	49.31	47.21
	8	73.07	66.37	57.26	56.95	50.04	48.89	47.95	41.66	45.33	41.87
	9	64.38	58.10	41.35	26.17	23.45	16.74	21.35	2.61	7.64	12.77
	10	58.42	50.98	35.07	17.48	13.60	6.48	9.73	0.41	0.31	0.83
	11	57.89	50.14	31.93	9.52	12.56	4.39	8.05	0.41	0.10	0.31
	12	57.47	48.99	30.25	9.10	6.27	0.83	1.98	0.31	0.10	0.20
	13	56.53	47.53	29.10	5.23	2.92	0.93	0.62	0.20	0.10	0.10
	14	56.64	47.21	29.00	5.12	2.82	0.83	0.52	0.20	0.10	0.10
	15	56.64	47.21	29.00	5.12	2.82	0.83	0.52	0.20	0.10	0.10
% Remanente DPPH• **	1	98.52	95.68	95.11	95.68	94.54	94.99	92.15	94.31	91.47	92.15
	2	96.81	94.77	90.78	94.77	89.19	91.35	87.83	90.33	86.69	87.83
	3	92.95	92.26	89.65	92.26	86.69	87.71	84.98	87.14	83.62	84.07
	4	93.74	90.67	90.33	89.65	87.48	84.07	85.44	81.80	83.73	81.23
	5	93.29	89.99	89.42	88.74	85.21	85.32	82.36	81.11	81.34	81.57
	6	91.69	90.56	86.35	89.76	82.93	83.62	80.66	80.54	79.07	79.98
	7	82.82	77.70	68.87	70.44	61.37	61.98	57.87	55.33	56.90	54.49
	8	79.41	72.13	66.09	65.72	57.75	56.42	55.33	48.08	52.31	48.32
	9	74.30	67.05	47.72	30.20	27.06	19.32	24.64	3.01	8.81	14.73
	10	72.11	62.93	43.29	21.57	16.79	8.00	12.01	0.51	0.38	1.02
	11	71.46	61.90	39.41	11.75	15.50	5.42	9.94	0.51	0.12	0.38
	12	70.94	60.47	37.34	11.23	7.75	1.02	2.45	0.38	0.12	0.25
	13	69.78	58.67	35.92	6.45	3.61	1.15	0.77	0.25	0.12	0.12
	14	69.91	58.28	35.79	6.32	3.48	1.02	0.64	0.25	0.12	0.12
	15	69.91	58.28	35.79	6.32	3.48	1.02	0.64	0.25	0.12	0.12

*Calculada a partir de los datos de absorbancia con la ecuación de la curva de calibración: ABS=0.009550938x[DPPH•]+0.012070550. **Los cálculos se realizaron frente a las concentraciones de DPPH (100%) sin exposición a la muesta para el día de lectura 1 (92.03 μM), 2 (86.65 μM) y 3 (81.01 μM).



Gráfica A2i. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones de 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído IV (ppm) / DPPH• (ppm).
Cada curva corresponde a una relación [muestra]/ [DPPH]

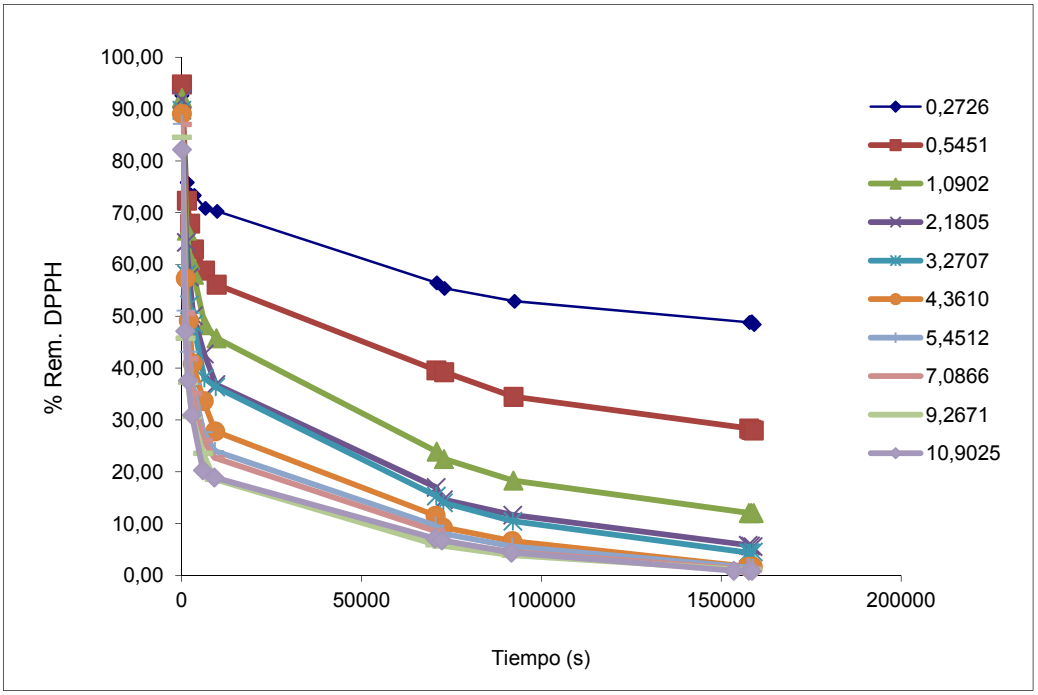


Gráfica A2j. Determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) del 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV).

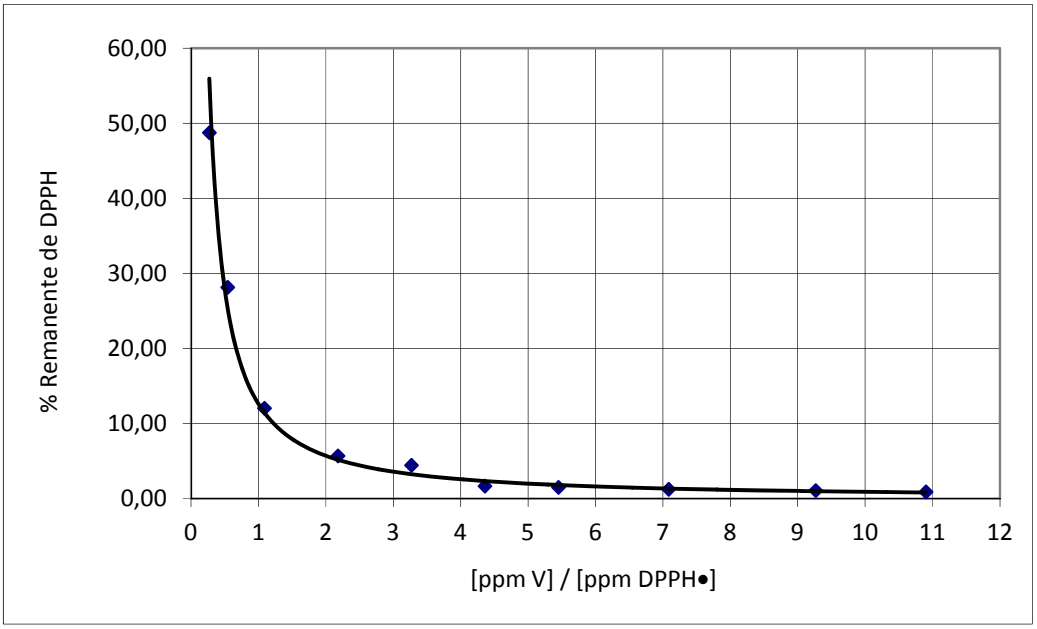
Tabla A2f. Determinación de las concentraciones de radical libre y cálculo del porcentaje remanente de DPPH•, en el tiempo, para la exposición al ácido porfirílico (V).

#	Relación ppm compuesto VI *S. strictum* / ppm DPPH•									
	Tiempo (segundos)									
1	69	65	72	66	54	58	43	46	59	92
2	1538	1450	1449	1279	1323	1138	1147	1036	1078	996
3	2485	2358	2322	2150	2169	1984	1956	1844	1752	1786
4	3521	3399	3398	3229	3269	3084	3065	2957	2961	2873
5	6609	6481	6458	6287	6304	6121	6088	5978	6001	5914
6	9852	9727	9675	9504	9476	9290	9252	9142	9163	9078
7	70908	70784	70877	70705	70753	70570	70561	70451	70504	70417
8	73058	72949	72900	72735	72737	72552	72507	72395	72402	72309
9	92520	92233	92196	92021	92046	91864	91852	91741	91732	91646
10	157845	157719	157611	157449	157452	157268	157242	157131	153521	153433
11	158450	158326	158251	158085	158045	157863	157820	157720	157733	157646
12	159110	158998	158966	158797	158856	158706	158668	158557	158575	158492
	Concentración μM DPPH• *									
1	85.53	87.52	85.12	84.80	82.92	82.29	80.51	80.40	78.10	75.90
2	70.04	66.79	61.45	59.36	53.70	52.97	47.21	46.69	42.29	43.55
3	67.84	62.71	56.22	53.18	48.26	45.43	39.88	38.63	34.44	34.75
4	67.73	58.10	53.60	46.27	44.80	37.79	34.13	32.45	28.37	28.58
5	65.43	54.33	44.60	39.47	35.17	31.09	25.54	24.07	21.77	18.73
6	61.87	49.41	40.30	32.45	32.03	24.49	21.14	19.99	16.33	16.64
7	49.73	34.86	21.04	14.96	13.50	10.15	8.47	7.53	5.23	6.27
8	48.78	34.54	19.78	12.87	12.35	8.16	7.11	5.75	5.02	5.96
9	46.58	30.36	16.12	10.25	9.21	5.86	4.91	3.97	3.45	3.87
10	39.47	22.92	9.73	4.70	3.55	1.35	1.25	0.93	0.93	0.73
11	39.57	22.71	9.73	4.60	3.55	1.35	1.25	1.04	0.83	0.73
12	39.15	22.61	9.73	4.49	3.66	1.35	1.14	1.04	0.83	0.73
	% Remanente DPPH• **									
1	92.63	94.78	92.18	91.84	89.80	89.11	87.19	87.07	84.58	82.20
2	75.85	72.33	66.55	64.28	58.16	57.37	51.13	50.56	45.80	47.16
3	73.47	67.91	60.88	57.59	52.26	49.20	43.19	41.83	37.30	37.64
4	73.35	62.92	58.05	50.11	48.52	40.92	36.96	35.14	30.72	30.95
5	70.86	58.84	48.30	42.74	38.09	33.67	27.66	26.07	23.58	20.29
6	70.27	56.12	45.77	36.86	36.38	27.82	24.01	22.70	18.54	18.90
7	56.48	39.59	23.89	17.00	15.33	11.53	9.62	8.55	5.94	7.13
8	55.41	39.23	22.47	14.62	14.02	9.27	8.08	6.53	5.70	6.77
9	52.91	34.48	18.30	11.65	10.46	6.65	5.58	4.51	3.92	4.39
10	48.83	28.36	12.04	5.82	4.40	1.67	1.55	1.16	1.16	0.90
11	48.96	28.10	12.04	5.69	4.40	1.67	1.55	1.29	1.03	0.90
12	48.44	27.97	12.04	5.56	4.52	1.67	1.42	1.29	1.03	0.90

*Calculada a partir de los datos de absorbancia con la ecuación de la curva de calibración: ABS=0.009550938x[DPPH•]+0.012070550. **Los cálculos se realizaron frente a las concentraciones de DPPH (100 %) sin exposición a la muesta para el día de lectura 1 (92.34 μM), 2 (88.05 μM) y 3 (80.82 μM).

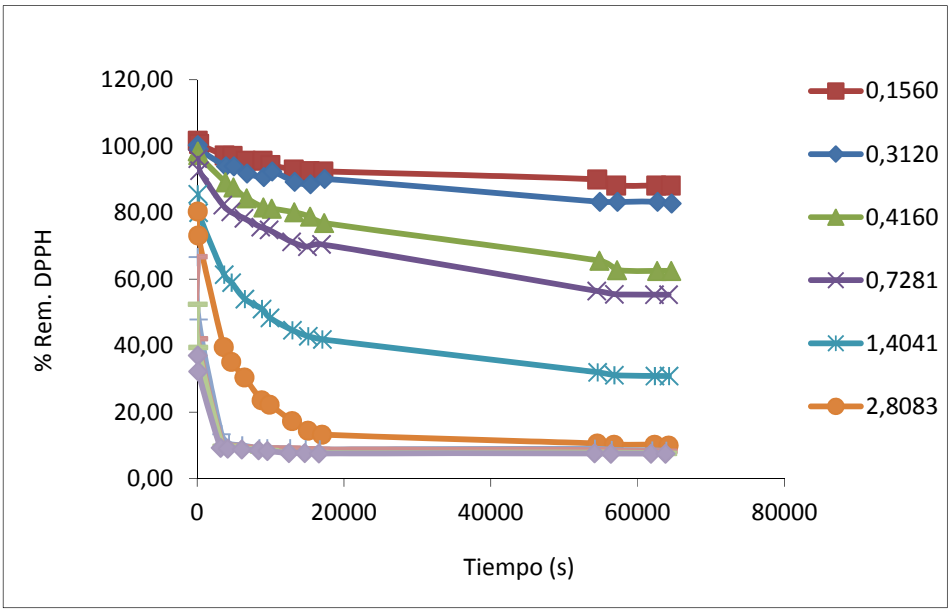


Gráfica A2k. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones de ácido porfirílico V (ppm) / DPPH• (ppm).
Cada curva corresponde a una relación [muestra]/ [DPPH]

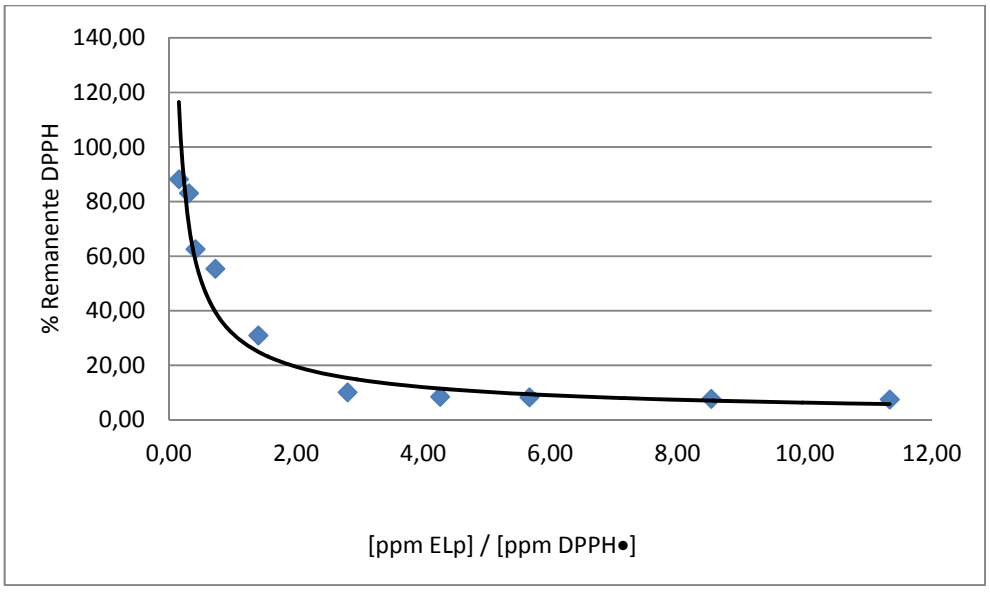


Gráfica A2L. Determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) del compuesto V.

Anexo 3
Datos y resultados del ensayo de poder captador de radical libre DPPH• para las sustancias liquénicas de *L. pallida*



Gráfica A3a. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones de extracto metanólico de *L. pallida* ELp (ppm) / DPPH• (ppm).
Cada curva corresponde a una relación [muestra]/ [DPPH]



Gráfica A3b. Determinación de la Concentración efectiva 50 (CE50) del extracto metanólico de *L. pallida*.

Tabla A3a. Determinación de las concentraciones de radical libre y cálculo del porcentaje remanente de DPPH•, en el tiempo, para la exposición al extracto metanólico de *L. pallida*

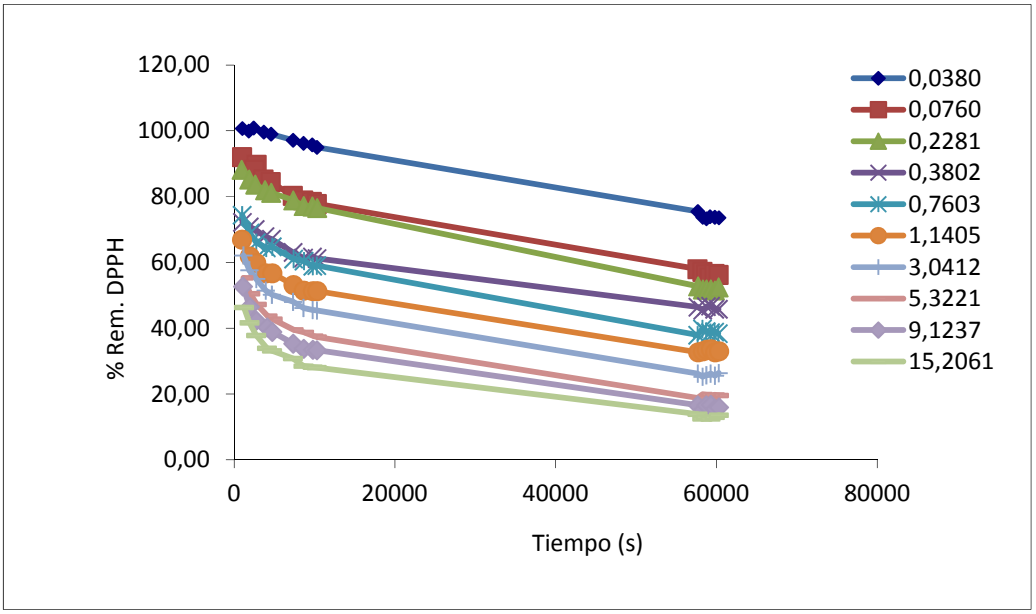
	#	Relación ppm Extracto *L. pallida* / ppm DPPH•									
		0.1560	**0.3120**	**0.4160**	**0.7281**	**1.4041**	**2.8083**	**4.2645**	**5.6686**	**8.5289**	**11.3372**
Tiempo (segundos)	1	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
	2	240	180	120	300	180	120	180	120	120	120
	3	3720	3900	3840	3480	3660	3600	3300	3480	3420	3180
	4	4800	4980	4920	4560	4680	4620	4320	4440	4380	4140
	5	6600	6780	6720	6360	6480	6420	6120	6300	6300	6060
	6	8880	9060	9000	8640	8820	8760	8460	8580	8520	8340
	7	9960	10200	10140	9780	9900	9840	9540	9840	9780	9540
	8	13140	13260	13200	12840	12960	12900	12660	12780	12720	12480
	9	15300	15420	15360	15000	15120	15060	14760	14940	14880	14640
	10	17160	17340	17280	16920	17040	16980	16680	16800	16740	16560
	11	54480	54840	54780	54420	54540	54480	54180	54360	54360	54120
	12	57060	57240	57180	56820	56820	56760	56460	56640	56580	56340
	13	62520	62700	62640	62280	62340	62280	61980	62100	62040	61800
	14	64500	64620	64560	64200	64260	64200	63900	64080	64020	63780
Concentración μM DPPH• *	1	88.47	87.31	85.64	83.75	74.44	69.93	58.00	58.10	32.24	45.64
	2	87.63	86.27	84.70	80.61	69.62	63.65	41.66	36.64	28.05	34.33
	3	84.59	81.76	77.58	71.61	53.39	34.44	11.61	8.68	8.05	8.47
	4	84.49	81.76	76.22	69.83	51.30	30.57	9.21	8.68	7.85	8.47
	5	83.23	79.88	73.39	68.15	47.00	26.48	8.68	8.26	7.64	7.85
	6	83.23	78.94	70.98	65.85	44.39	20.51	7.95	7.95	7.43	7.22
	7	82.08	80.40	70.67	65.12	42.08	19.36	7.95	7.95	7.22	7.32
	8	80.93	77.68	69.72	61.98	38.84	15.07	7.95	7.95	6.69	6.80
	9	80.51	77.05	68.57	60.72	37.27	12.56	7.74	7.74	6.69	6.69
	10	80.40	76.74	66.90	59.99	36.43	11.51	7.64	7.64	6.59	6.69
	11	76.63	70.88	55.80	48.05	27.22	9.00	7.64	7.32	6.48	6.69
	12	75.06	70.88	53.39	47.21	26.48	8.68	7.32	7.11	6.38	6.59
	13	75.06	70.88	53.18	47.11	26.27	8.68	7.22	7.01	6.38	6.59
	14	75.06	70.46	53.18	47.11	26.27	8.47	7.11	7.01	6.38	6.48
% Remanente DPPH• **	1	101.71	100.39	98.46	96.29	85.58	80.40	66.68	66.80	52.48	37.07
	2	100.75	99.18	97.38	92.68	80.04	73.18	47.90	42.12	39.48	32.25
	3	97.26	94.01	89.19	82.33	61.38	39.60	13.35	9.98	9.74	9.26
	4	97.14	94.01	87.63	80.28	58.98	35.14	10.58	9.98	9.74	9.02
	5	95.69	91.84	84.38	78.36	54.04	30.45	9.98	9.50	9.02	8.78
	6	95.69	90.76	81.61	75.71	51.03	23.59	9.14	9.14	8.30	8.54
	7	94.37	92.44	81.25	74.87	48.38	22.26	9.14	9.14	8.42	8.30
	8	93.04	89.31	80.16	71.26	44.65	17.33	9.14	9.14	7.82	7.70
	9	92.56	88.59	78.84	69.81	42.85	14.44	8.90	8.90	7.70	7.70
	10	92.44	90.18	76.91	70.49	41.88	13.23	8.78	8.78	7.70	7.58
	11	90.06	83.29	65.57	56.47	31.98	10.57	8.97	8.60	7.87	7.62
	12	88.21	83.29	62.74	55.48	31.12	10.20	8.60	8.36	7.74	7.50
	13	88.21	83.29	62.50	55.36	30.87	10.20	8.48	8.24	7.74	7.50
	14	88.21	82.80	62.50	55.36	30.87	9.96	8.36	8.24	7.62	7.50

*Calculada a partir de los datos de absorbancia con la ecuación de la curva de calibración: ABS=0.009550938x[DPPH•]+0.012070550. **Los cálculos se realizaron frente a las concentraciones de DPPH (100%) sin exposición al extracto de Lp para el día de lectura 1 (86.97 μM) y 2 (85.09 μM).

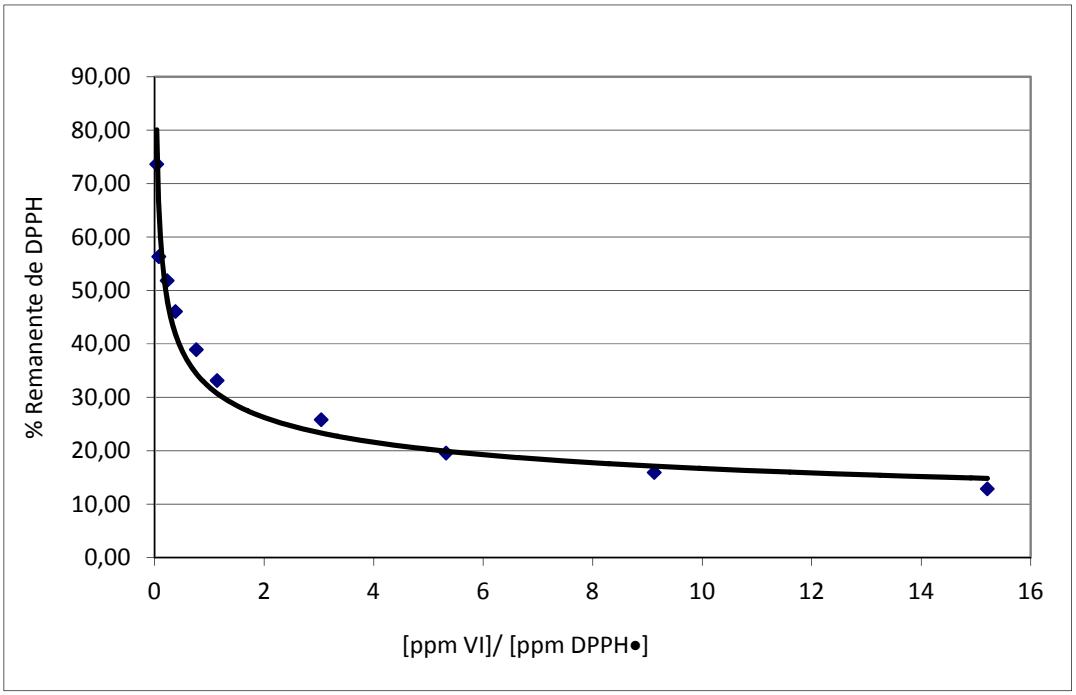
Tabla A3b. Determinación de las concentraciones de radical libre y cálculo del porcentaje remanente de DPPH•, en el tiempo, para la exposición a lobarielina (VI)

	#	Relación ppm Lobarielina (VII) *L. pallida* / ppm DPPH•									
		0.0380	**0.0760**	**0.2281**	**0.3802**	**0.7603**	**1.1405**	**3.0412**	**5.3221**	**9.1237**	**15.2061**
Tiempo (segundos)	1	1019	978	935	1030	993	981	1153	1139	1097	1224
	2	1821	2789	1875	1871	1978	1953	1900	1995	1950	1910
	3	2427	2519	2626	2606	2754	2748	2748	2816	2771	2734
	4	3689	3649	3849	3829	3997	3981	3934	4151	4107	4083
	5	4592	4553	4611	4644	4742	4749	4697	4793	4750	4710
	6	7339	7294	7354	7331	7399	7378	7327	7394	7350	7309
	7	8631	8588	8653	8635	8692	8671	8621	8700	8659	8624
	8	9711	9667	9735	9739	9785	9810	9767	9841	9797	9760
	9	10305	10291	10329	10311	10284	10347	10303	10284	10305	10259
	10	57680	57635	57714	57691	57656	57720	57674	57650	57678	57638
	11	58296	58251	58313	58290	58254	58325	58274	58250	58278	58237
	12	58749	58711	58765	58746	58710	58794	58741	58717	58739	58699
	13	59194	59152	59295	59266	59256	59315	59274	59262	59298	59258
	14	59799	59758	59805	59776	59770	59838	59806	59785	59828	59794
	15	60305	60258	60263	60234	60231	60328	60279	60303	60323	60296
Concentración µM DPPH• *	1	68.0488	62.19	59.57	48.78	50.25	45.22	41.98	37.37	35.59	31.30
	2	67.5252	60.61	57.58	47.84	46.58	41.77	38.94	34.13	31.40	28.16
	3	68.1535	59.57	56.53	47.32	44.60	40.41	37.16	31.93	28.58	25.54
	4	67.3158	57.58	55.38	45.85	43.55	38.31	34.75	29.52	27.22	22.92
	5	66.897	57.06	54.86	45.33	43.76	38.31	33.92	28.89	26.27	22.40
	6	65.6406	54.23	53.29	42.61	41.25	35.91	32.45	26.69	23.86	20.83
	7	65.0124	53.29	52.13	41.45	40.83	34.75	31.19	26.17	22.82	19.26
	8	64.6983	52.97	52.03	41.66	39.78	34.65	30.77	25.44	22.61	19.05
	9	64.1748	52.55	51.72	41.35	39.88	34.65	30.67	25.23	22.50	18.94
	10	50.0401	38.42	34.96	30.77	25.12	21.67	17.37	12.45	10.99	9.21
	11	48.8883	37.89	34.33	30.15	26.38	21.88	16.74	13.19	9.94	8.26
	12	48.5742	37.37	34.33	30.88	25.85	22.19	17.06	13.08	10.99	8.58
	13	48.993	36.74	34.33	30.98	25.64	22.29	17.37	12.56	11.09	8.26
	14	48.8883	37.48	34.13	30.36	25.75	21.67	16.95	13.08	10.25	8.58
	15	48.7836	37.27	34.75	30.36	25.44	21.88	17.48	12.98	10.57	9.00
% Remanente DPPH• **	1	100.72	92.04	88.17	72.21	74.38	66.94	62.13	55.32	52.68	46.33
	2	99.95	89.72	85.23	70.81	68.95	61.82	57.64	50.51	46.48	41.68
	3	100.88	88.17	83.68	70.04	66.01	59.81	55.01	47.26	42.30	37.80
	4	99.64	85.23	81.97	67.87	64.46	56.71	51.44	43.69	40.28	33.93
	5	99.02	84.45	81.20	67.09	64.77	56.71	50.20	42.76	38.89	33.15
	6	97.16	80.27	78.87	63.06	61.05	53.15	48.03	39.51	35.32	30.83
	7	96.23	78.87	77.17	61.36	60.43	51.44	46.17	38.73	33.77	28.50
	8	95.76	78.41	77.01	61.67	58.88	51.29	45.55	37.65	33.46	28.19
	9	94.99	77.79	76.55	61.20	59.03	51.29	45.40	37.34	33.31	28.04
	10	75.49	57.96	52.75	46.43	37.90	32.69	26.21	18.79	16.57	13.89
	11	73.75	57.17	51.80	45.48	39.79	33.00	25.26	19.89	14.99	12.47
	12	73.28	56.38	51.80	46.59	39.00	33.48	25.74	19.73	16.57	12.94
	13	73.91	55.43	51.80	46.74	38.69	33.63	26.21	18.94	16.73	12.47
	14	73.75	56.54	51.48	45.80	38.85	32.69	25.58	19.73	15.47	12.94
	15	73.60	56.22	52.43	45.80	38.37	33.00	26.37	19.58	15.94	13.57

*Calculada a partir de los datos de absorbancia con la ecuación de la curva de calibración: ABS=0.009550938x[DPPH•]+0.012070550. **Los cálculos se realizaron frente a las concentraciones de DPPH (100 %) sin exposición a la muestra para el día de lectura 1 (67.56 µM) y 2 (66.29 µM).



Gráfica A3c. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones de lobarielina VI (ppm) / DPPH• (ppm).
Cada curva corresponde a una relación [muestra]/ [DPPH]

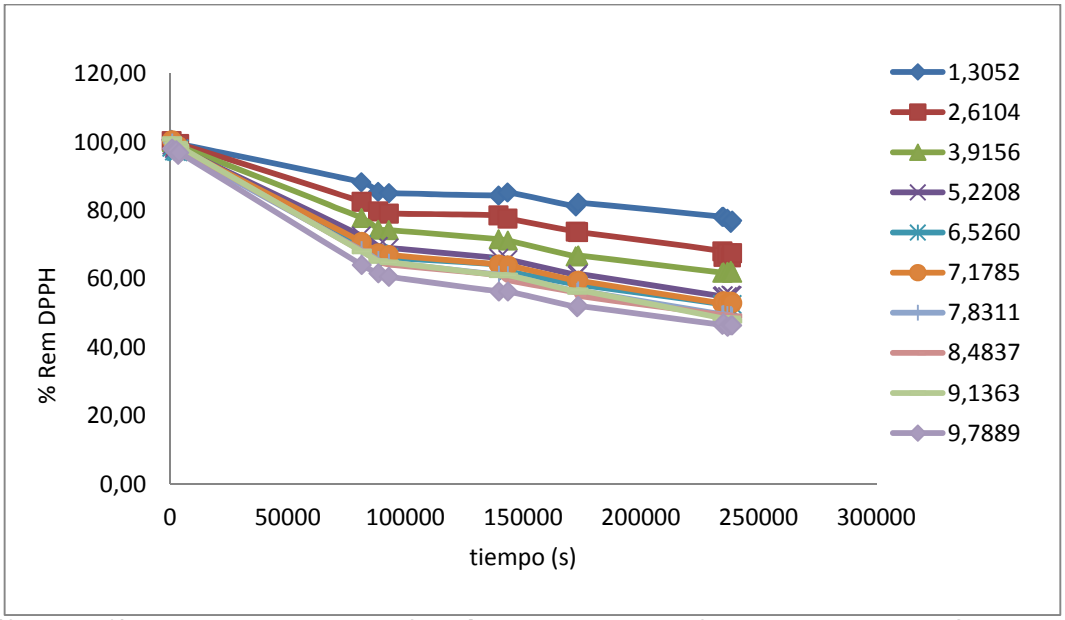


Gráfica A3d. Determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) de lobarielina (VI).

Tabla A3c. Determinación de las concentraciones de radical libre y cálculo del porcentaje remanente de DPPH•, en el tiempo, para la exposición al orselinato de metilo (VII).

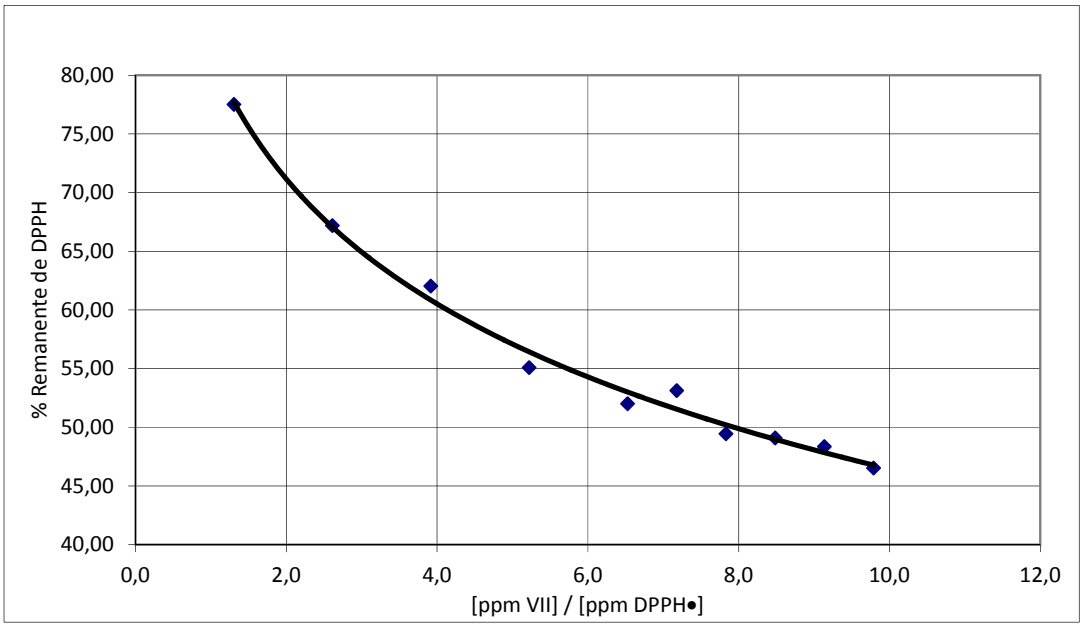
	#	Relación ppm Orselinato de metilo (VII) *L. pallida* / ppm DPPH•									
		1.0352	**2.6104**	**3.9156**	**5.2208**	**6.5260**	**7.1785**	**7.8311**	**8.4837**	**9.1363**	**9.7889**
Tiempo (segundos)	1	586	626	730	714	692	747	872	857	827	836
	2	1672	1676	1809	1792	1769	1762	1868	1861	1832	1806
	3	2632	2607	2555	2567	2670	2643	2609	2690	2662	2626
	4	3327	3410	3360	3341	3419	3395	3366	3442	3419	3383
	5	3806	3785	3737	3828	3809	3785	3856	3846	3816	3803
	6	81184	81290	81241	81230	81336	81310	81278	81407	81383	81347
	7	88319	88295	88320	88415	88393	88365	88431	88425	88399	88416
	8	92912	92886	92835	92904	92881	92853	92904	92891	92862	92878
	9	139472	139447	139492	139588	139566	139537	139626	139614	139585	139605
	10	143289	143264	143430	143415	143392	143464	143436	143424	143479	143443
	11	172287	172262	172216	172881	172855	172827	172886	172870	172842	172854
	12	173267	173244	173316	173298	173275	173352	173319	173304	173363	173326
	13	234491	234560	234517	234498	234560	234538	234507	234590	234573	234536
	14	234949	235011	234958	234955	235032	235005	234982	235056	235027	234990
	15	236663	236724	236680	236670	236733	236709	236677	236787	236772	236741
	16	238102	238188	238140	238123	238193	238167	238147	238219	238231	238196
	17	238692	238670	238702	238688	238666	238732	238700	238689	238726	238689
Concentración μM DPPH• *	1	86.58	86.27	85.95	85.2198	84.6963	86.4763	85.8481	85.1151	86.7904	84.3822
	2	85.53	85.12	85.85	84.3822	83.7540	84.9057	85.2198	84.6963	85.4292	83.8587
	3	86.16	84.91	85.64	84.3822	83.6493	84.9057	84.8010	84.1728	85.6387	83.9634
	4	85.53	85.01	85.12	84.2775	83.5446	85.0104	83.5446	83.7540	85.5339	82.8117
	5	85.53	85.53	85.01	84.3822	84.2775	84.4869	83.8587	84.5916	84.9057	83.3352
	6	72.55	67.84	63.97	59.6726	57.5786	58.2068	56.2175	56.0081	55.9034	52.6576
	7	70.25	65.54	61.14	57.1598	55.3798	55.4845	53.8093	53.5999	53.5999	50.6683
	8	69.93	65.01	61.03	56.7410	54.4375	55.0657	53.1811	52.7623	53.2858	49.8307
	9	67.11	62.50	56.95	52.5529	50.9824	51.0871	48.6789	48.5742	48.5742	44.8050
	10	67.84	61.77	56.64	52.2388	49.5165	50.8777	48.5742	47.4225	48.5742	44.8050
	11	64.59	58.73	52.97	48.5742	46.3755	47.2131	44.7003	44.4909	44.7003	41.1404
	12	65.43	58.63	53.18	48.8883	46.3755	47.3178	45.0144	43.7579	45.1191	41.4545
	13	60.09	52.34	47.53	42.1874	40.4075	40.6169	38.1041	37.9994	37.2664	35.8006
	14	60.09	51.09	47.63	42.3968	39.6746	41.1404	38.2088	37.5805	37.2664	36.2194
	15	59.67	51.82	47.74	42.1874	39.8840	40.6169	37.9994	37.6852	37.2664	35.3818
	16	58.73	50.98	47.95	42.5015	39.4652	41.0357	37.9994	37.5805	37.2664	35.6959
	17	59.25	51.92	47.53	42.3968	40.4075	40.7216	37.6852	37.7899	36.7429	35.6959
% Remanente DPPH• **	1	100.73	100.37	100.00	99.15	98.54	100.61	99.88	99.03	100.97	98.17
	2	99.51	99.03	99.88	98.17	97.44	98.78	99.15	98.54	99.39	97.56
	3	100.24	98.78	99.63	98.17	97.32	98.78	98.66	97.93	99.63	97.69
	4	99.51	98.90	99.03	98.05	97.20	98.90	97.20	97.44	99.51	96.35
	5	99.51	99.51	98.90	98.17	98.05	98.29	97.56	98.42	98.78	96.95
	6	88.34	82.60	77.88	72.66	70.11	70.87	68.45	68.19	68.07	64.11
	7	85.53	79.79	74.44	69.60	67.43	67.56	65.52	65.26	65.26	61.69
	8	85.15	79.16	74.31	69.09	66.28	67.05	64.75	64.24	64.88	60.67
	9	84.42	78.63	71.65	66.11	64.14	64.27	61.24	61.11	61.11	56.37
	10	85.35	77.71	71.25	65.72	62.29	64.01	61.11	59.66	61.11	56.37
	11	81.26	73.89	66.64	61.11	58.34	59.40	56.24	55.97	56.24	51.76
	12	82.32	73.75	66.91	61.50	58.34	59.53	56.63	55.05	56.76	52.15
	13	78.20	68.12	61.85	54.90	52.58	52.86	49.59	49.45	48.50	46.59
	14	78.20	66.48	61.99	55.17	51.63	53.54	49.72	48.91	48.50	47.13
	15	77.65	67.44	62.12	54.90	51.90	52.86	49.45	49.04	48.50	46.04
	16	76.43	66.35	62.39	55.31	51.36	53.40	49.45	48.91	48.50	46.45
	17	77.11	67.57	61.85	55.17	52.58	52.99	49.04	49.18	47.82	46.45

*Calculada a partir de los datos de absorbancia con la ecuación de la curva de calibración: ABS=0.009550938x[DPPH•]+0.012070550. **Los cálculos se realizaron frente a las concentraciones de DPPH (10 0%) sin exposición a la muestra para el día de lectura 1 (85.95 μM), 2 (82.13 μM), 3 (79,45 μM) y 4 (76.84 μM).



Gráfica A3e. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones de Orselinato de metilo VII (ppm) / DPPH• (ppm).

Cada curva corresponde a una relación [muestra]/ [DPPH]

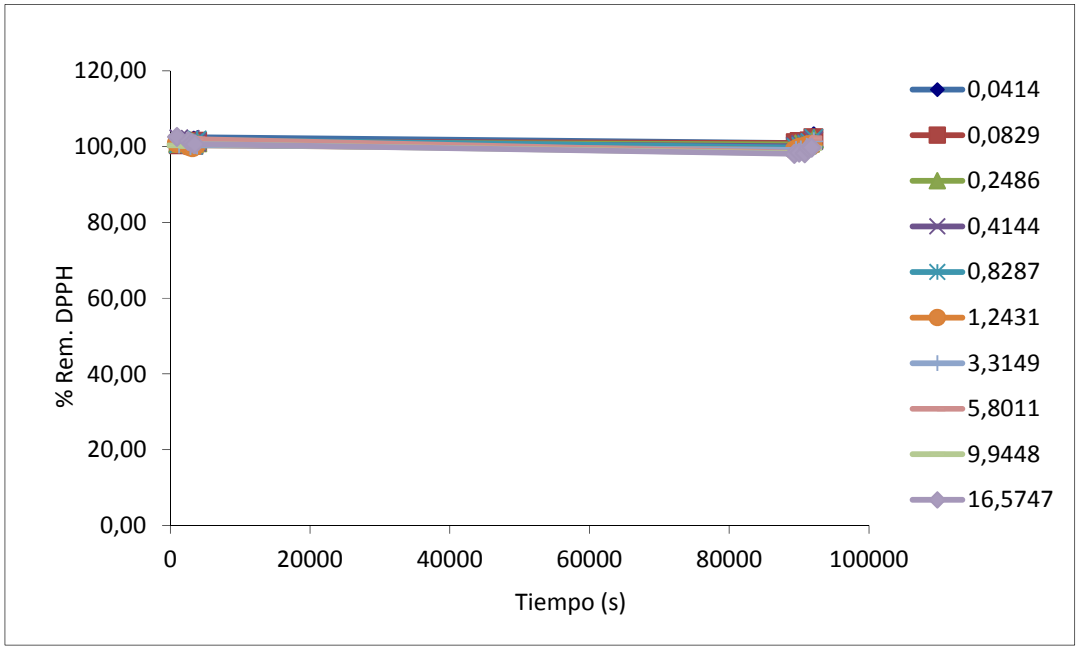


Gráfica A3f. Determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) del orselinato de metilo (VII).

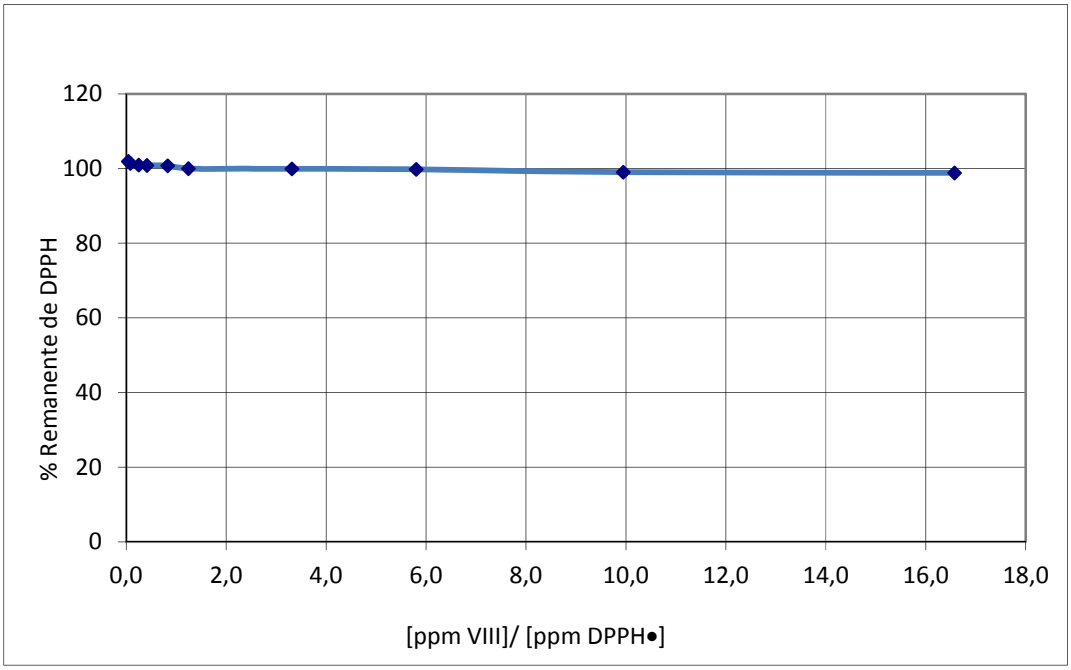
Tabla A3d. Determinación de las concentraciones de radical libre y cálculo del porcentaje remanente de DPPH•, en el tiempo, para la exposición al polihidroxialcohol VIII.

#	Relación ppm compuesto VIII / ppm DPPH•									
	0.0414	**0.0829**	**0.2486**	**0.4144**	**0.8287**	**1.2431**	**3.3149**	**5.8011**	**9.9448**	**16.5747**
	Tiempo (segundos)									
1	1239	1184	1126	1194	1137	936	1235	932	908	933
2	2835	2804	2865	2827	2860	2663	2857	2647	2607	2560
3	3338	3282	3324	3284	3312	3136	3332	3121	3099	3053
4	3853	3796	3825	3786	3815	3614	3809	3585	3547	3498
5	89375	89530	89478	89443	89552	89351	89549	89378	89353	89305
6	90141	90084	90228	90194	90242	90050	90248	90077	90039	89992
7	91105	91050	91095	91055	91086	90888	91081	90878	90842	90795
8	91563	91507	91548	91509	91551	91350	91543	91334	91317	91302
9	92087	92033	92102	92076	92101	91905	92101	91873	91834	91787
	Concentración μM DPPH• *									
1	66.90	66.37	66.58	67.32	66.37	66.58	66.37	66.58	66.16	67.63
2	66.90	66.58	66.79	67.21	66.37	66.06	66.06	66.48	66.06	66.90
3	67.42	66.27	66.58	66.69	66.16	65.85	66.27	67.32	66.37	66.58
4	67.53	66.79	66.69	66.69	67.11	66.16	66.16	67.21	66.37	66.37
5	63.65	63.65	63.44	63.13	62.92	62.50	62.50	62.08	61.98	61.87
6	63.97	63.86	63.34	63.44	63.13	62.92	62.60	62.50	62.19	62.08
7	64.07	63.76	63.44	63.65	63.44	63.13	63.02	62.81	62.29	61.98
8	64.49	63.97	63.76	63.76	63.76	63.34	63.02	62.81	63.02	62.81
9	65.22	64.49	64.38	64.07	64.49	63.44	63.97	64.49	62.81	62.92
	% Remanente DPPH• **									
1	101.48	100.69	101.01	102.12	100.69	101.01	100.69	101.01	100.37	102.59
2	101.48	101.01	101.32	101.96	100.69	100.21	100.21	100.85	100.21	101.48
3	102.28	100.53	101.01	101.16	100.37	99.89	100.53	102.12	100.69	101.01
4	102.44	101.32	101.16	101.16	101.80	100.37	100.37	101.96	100.69	100.69
5	100.93	100.93	100.60	100.10	99.77	99.10	99.10	98.44	98.27	98.11
6	101.43	101.26	100.43	100.60	100.10	99.77	99.27	99.10	98.61	98.44
7	101.59	101.10	100.60	100.93	100.60	100.10	99.93	99.60	98.77	98.27
8	102.26	101.43	101.10	101.10	101.10	100.43	99.93	99.60	99.93	99.60
9	103.42	102.26	102.09	101.59	102.26	100.60	101.43	102.26	99.60	99.77

*Calculada a partir de los datos de absorbancia con la ecuación de la curva de calibración: ABS=0.009550938x[DPPH•]+0.012070550. **Los cálculos se realizaron frente a las concentraciones de DPPH (100 %) sin exposición a la muestra para el día de lectura 1 (65,92 μM) y 2 (63,063 μM).



Gráfica A3g. % Remanente de DPPH en función del tiempo para diferentes relaciones del polihidroxialcohol VIII (ppm) / DPPH• (ppm).
Cada curva corresponde a una relación [muestra]/ [DPPH]

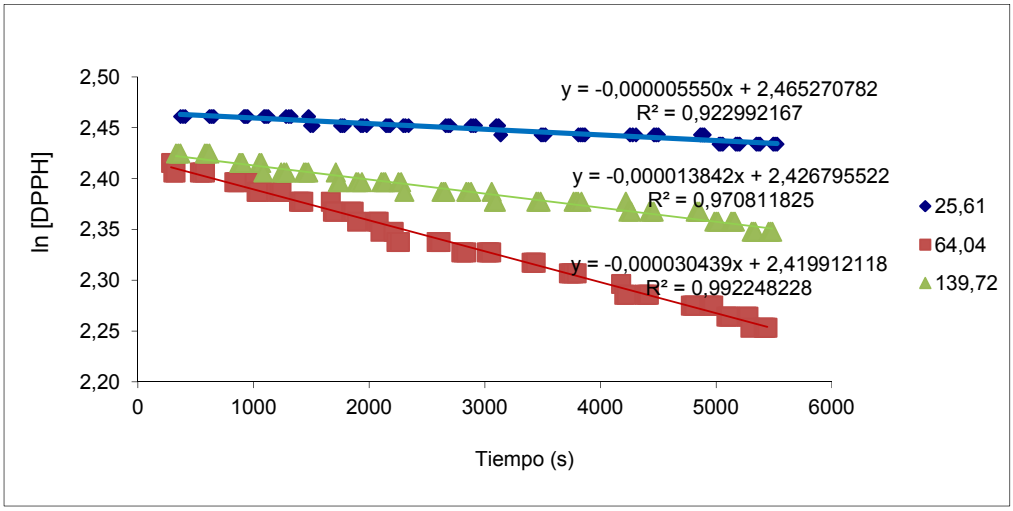


Gráfica A3h. Determinación de la concentración efectiva 50 (CE_{50}) del polihidroxialcohol (VIII)

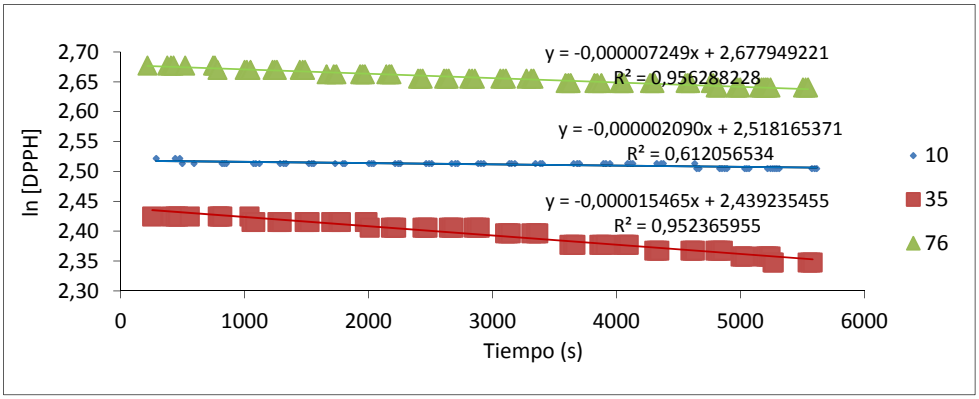
Anexo 4
Gráficas y resultados de la determinación de la reactividad de los compuestos a partir de su estudio cinético frente al radical libre DPPH•.

Tabla A4a. Determinación de la constante de velocidad, (k_2), de los compuestos de *S. strictum* var. *compressum* y *L.pallida* a 25.00 ± 0.01 ºC

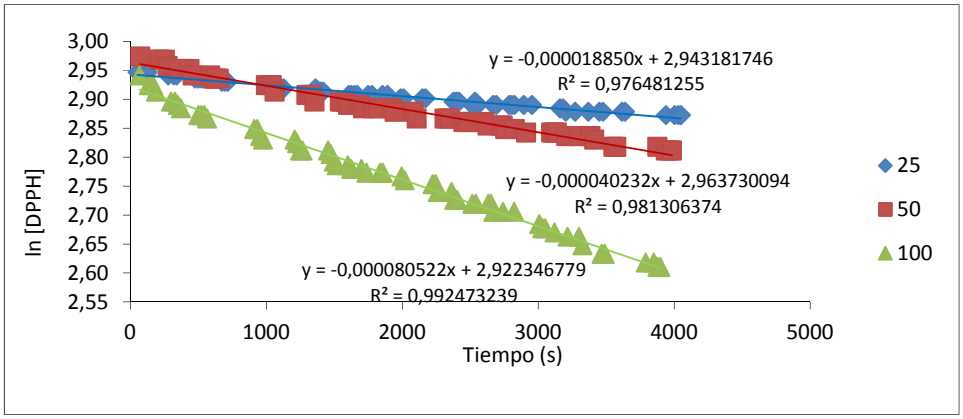
Compuesto C		Relación [C]/[DPPH·]	[C]	r^2	K_{obs}	K_2	MEDIA	Ds[b]
		(mol/mol)	µM			*M-1s-1*		
I	hematomato de metilo	26	0.00044838	0.92299	0.000006	0.01238	0.01239	0.00005
		64	0.00112095	0.97081	0.000014	0.01235		
		140	0.00244571	0.99225	0.000030	0.01245		
II	atranorina	10	0.00017808	0.59961	0.000002	0.01161	0.01166	0.00008
		35	0.00062058	0.95615	0.000007	0.01175		
		76	0.00132479	0.95085	0.000015	0.01162		
III	β-orcinol carboxilato de metilo	25	0.00049949	0.97663	0.000020	0.04003	0.04009	0.00009
		50	0.00100459	0.98131	0.000040	0.04005		
		100	0.00200357	0.99247	0.000081	0.04019		
IV	2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído	45	0.003980488	0.98839	0.000034	0.008590	0,00874	0.00016
		90	0.001990244	0.98427	0.000017	0.008908		
		181	0.000995122	0.97263	0.000008	0.008728		
V	ácido porfirílico	30	0.00059554	0.98378	0.000067	0.11222	0.11155	0.00064
		60	0.00119108	0.95051	0.000133	0.11150		
		119	0.00238217	0.99376	0.000264	0.11094		
VI	lobarielina	20	0.00000000	0.96595	0.000080	0.22841	0.22530	0.00642
		55	0.00000000	0.97338	0.000221	0.22957		
		115	0.00000000	0.99394	0.000439	0.21791		
VII	orselinato de metilo	20	0.00000000	0.87284	0.000003	0.00965	0.00962	0.00003
		60	0.00000000	0.90424	0.000010	0.00960		
		120	0.00000000	0.95070	0.000020	0.00960		



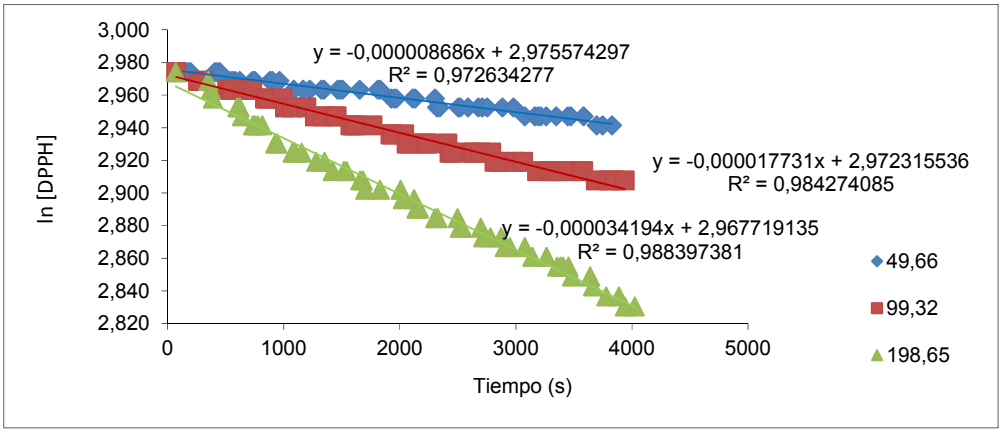
Gráfica A4a. Determinación de la constante de velocidad k2 del hematomato de metilo (I), para tres relaciones I / DPPH: (25, 64, 140 µM/µM)



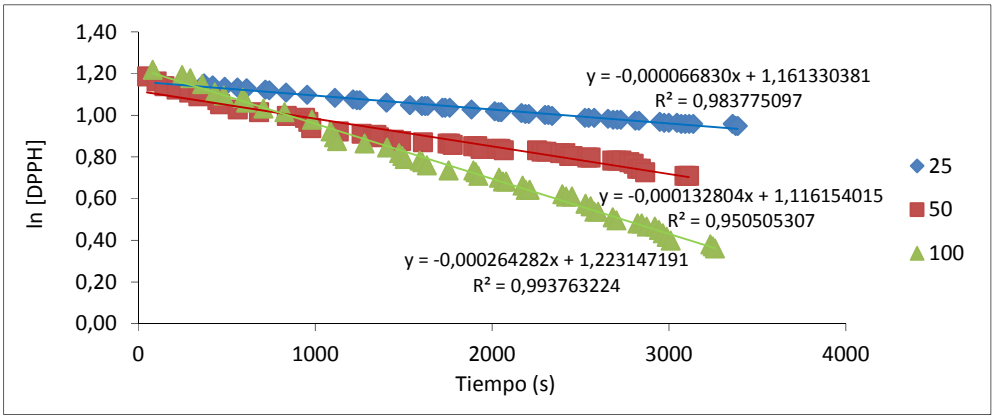
Gráfica A4b. Determinación de la constante de velocidad k_2 de atranorina (II), para tres relaciones de II /DPPH: (10, 35, 76 µM/µM)



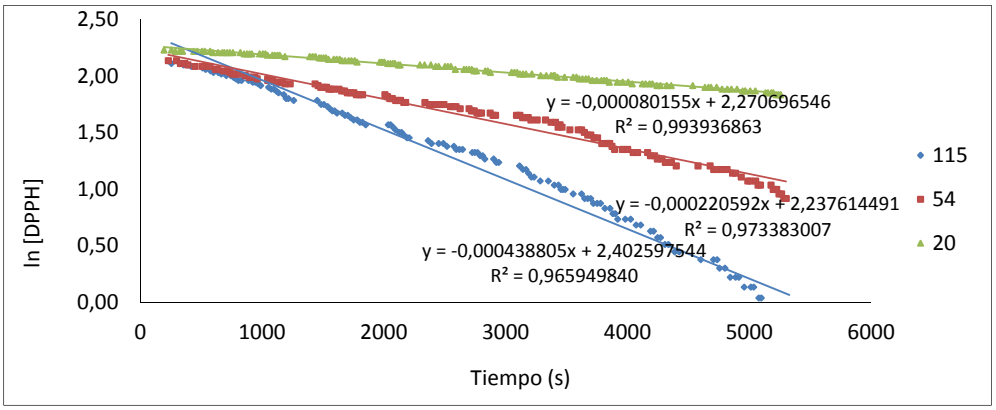
Gráfica A4c. Determinación de la constante de velocidad k_2 de β-orcinol carboxilato de metilo (III), para tres relaciones de III /DPPH: (25, 50, 100 µM/µM)



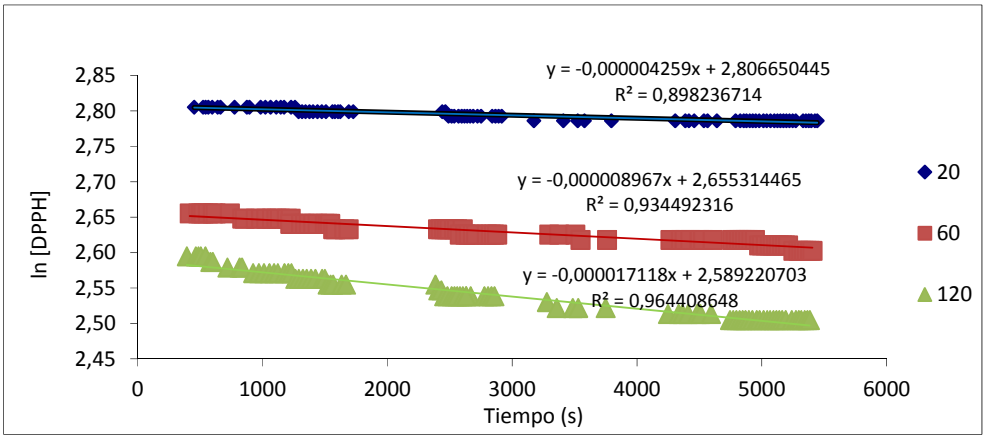
Gráfica A4d. Determinación de la constante de velocidad k_2 del 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV), para tres relaciones de IV / DPPH: (45, 90, 181 µM/µM)



Gráfica A4e. Determinación de la constante de velocidad k_2 de ácido porfirílico (V), para tres relaciones de V / DPPH: (30, 60, 119 µM/µM)



Gráfica A4f. Determinación de la constante de velocidad k_2 de lobarielina (VI), para tres relaciones de VI / DPPH: (115, 54, 20 µM/µM)

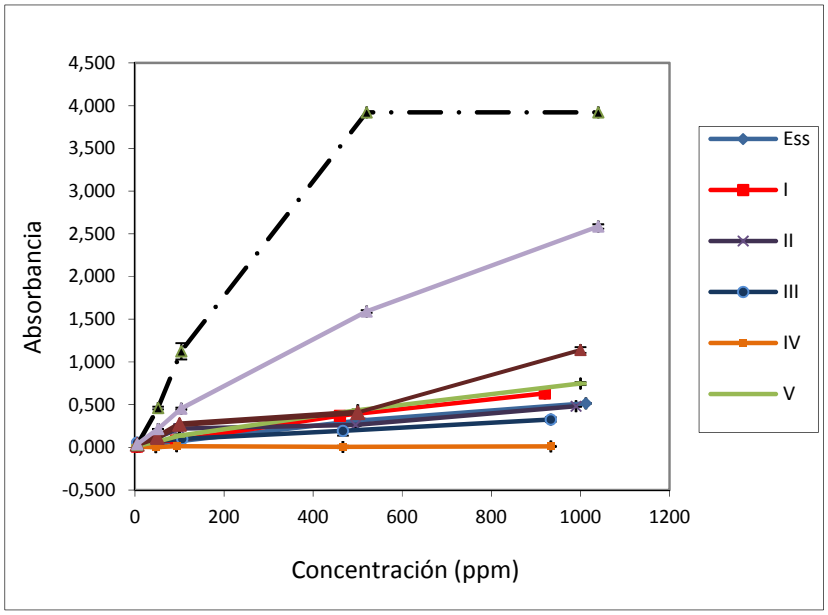


Gráfica A4g. Gráfica para la determinación de la constante de velocidad k_2 de orselinato de metilo (VII), para tres relaciones de VII / DPPH: (20, 60, 120 µM/µM)

Anexo 5
Gráficas y resultados del poder reductor de los compuestos y extractos de *L. pallida* y *S. strictum* var. *compressum*

Tabla A5a. Poder reductor férrico de los patrones antioxidantes Acido ascórbico, BHT y a-tocoferol a 50.00 ± 0.01 ºC

Muestra	[Muestra]	[Muestra]	Replica (absorbancia)					Absorbancia corregida (Δ)
	ppm	mM	1	2	3	Media	Ds	
Blanco	Blanco	0.00	0.079	0.081	0.076	0.079	0.003	0.000
Acido ascórbico (AA)	5.20	0.03	0.129	0.101	0.095	0.108	0.018	0.030
	52.00	0.30	0.532	0.529	0.558	0.540	0.016	0.461
	104.00	0.59	1.126	1.175	1.310	1.204	0.095	1.125
	520.00	2.95	4.000	4.000	4.000	4.000	0.000	3.921
	1040.00	5.90	4.000	4.000	4.000	4.000	0.000	3.921
Butilhidroxi tolueno (BHT)	5.20	0.02	0.116	0.126	0.107	0.116	0.010	0.038
	52.00	0.24	0.294	0.293	0.295	0.294	0.001	0.215
	104.00	0.47	0.542	0.536	0.518	0.532	0.012	0.453
	520.00	2.36	1.651	1.678	1.678	1.669	0.016	1.590
	1040.00	4.72	2.635	2.676	2.683	2.665	0.026	2.586
Alfa tocoferol (aT)	5.00	0.01	0.112	0.120	0.110	0.114	0.005	0.035
	50.00	0.12	0.199	0.192	0.193	0.195	0.004	0.116
	100.00	0.23	0.349	0.345	0.350	0.348	0.003	0.269
	500.00	1.16	0.490	0.489	0.480	0.486	0.006	0.408
	1000.00	2.32	1.191	1.208	1.257	1.219	0.034	1.140



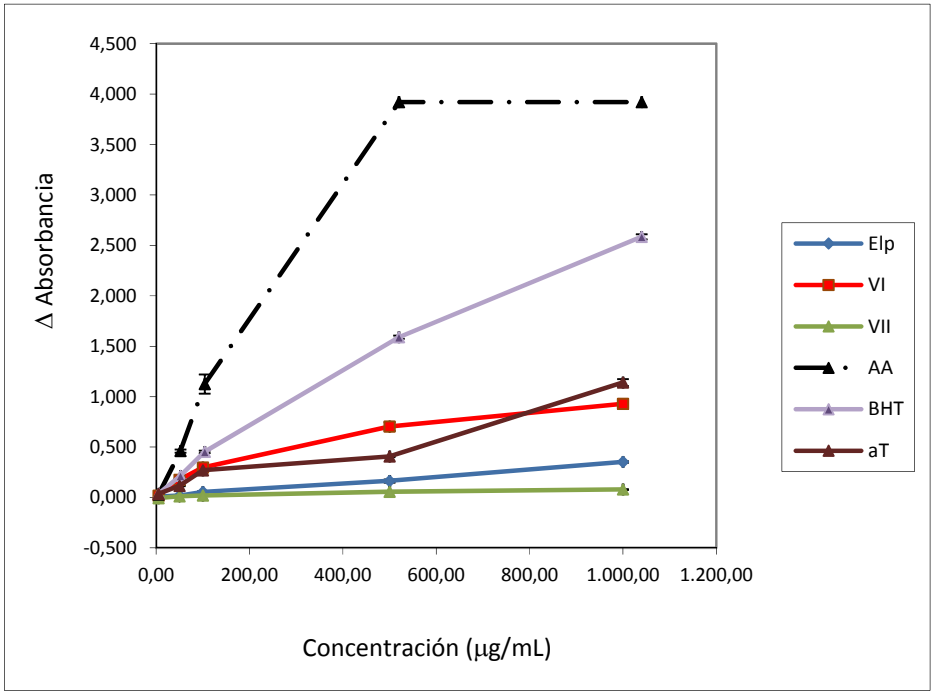
Gráfica A5a. Poder reductor de *S. strictum* var. *compressum*, para concentraciones crecientes de muestras. Se compara frente a tres patrones

Tabla A5b. Poder reductor férrico de *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida* a 50.00 ± 0.01 ºC

Muestra	[Muestra]	[Muestra]	Réplica					Absorbancia corregida (Δ)
	ppm	mM	1	2	3	Media	Ds	
Blanco	0	0.00	0.100	0.110	0.095	0.102	0.008	0.000
	10		0.114	0.113	0.106	0.111	0.004	0.009
	51		0.145	0.145	0.141	0.144	0.002	0.042
Ess	101		0.192	0.173	0.157	0.174	0.018	0.072
	506		0.427	0.432	0.395	0.418	0.020	0.316
	1012		0.616	0.622	0.613	0.617	0.005	0.515
Blanco	0		0.265	0.281	0.279	0.275	0.009	0.000
	5	0.02	0.279	0.288	0.287	0.285	0.005	0.010
	46	0.22	0.342	0.343	0.355	0.347	0.007	0.072
I	92	0.44	0.350	0.350	0.366	0.355	0.009	0.080
	460	2.19	0.646	0.633	0.655	0.645	0.011	0.370
	920	4.38	0.910	0.903	0.906	0.906	0.004	0.631
	5	0.01	0.293	0.285	0.289	0.289	0.004	0.014
	50	0.24	0.391	0.389	0.385	0.388	0.003	0.113
II	99	0.48	0.494	0.491	0.495	0.493	0.002	0.218
	495	2.38	0.548	0.530	0.533	0.537	0.010	0.262
	990	4.76	0.756	0.761	0.751	0.756	0.005	0.481
Blanco	0		0.074	0.084	0.073	0.077	0.006	0.000
	5	0.02	0.128	0.129	0.139	0.132	0.006	0.055
	47	0.24	0.141	0.143	0.161	0.148	0.011	0.071
III	106	0.48	0.163	0.177	0.186	0.175	0.012	0.098
	467	2.38	0.214	0.273	0.324	0.270	0.055	0.193
	933	4.76	0.385	0.392	0.433	0.403	0.026	0.326
	5	0.03	0.081	0.090	0.084	0.085	0.005	0.008
	47	0.26	0.082	0.088	0.068	0.079	0.010	0.002
IV	93	0.57	0.087	0.084	0.097	0.089	0.007	0.012
	467	2.85	0.097	0.081	0.070	0.083	0.014	0.006
	933	5.69	0.080	0.091	0.093	0.088	0.007	0.011
	5	0.02	0.089	0.090	0.100	0.093	0.006	0.016
	50	0.16	0.135	0.154	0.141	0.143	0.010	0.066
V	100	0.32	0.234	0.201	0.209	0.215	0.017	0.138
	500	1.59	0.504	0.522	0.510	0.512	0.009	0.435
	1000	3.18	0.822	0.809	0.843	0.825	0.017	0.748
Blanco	0.00	0.00	0.079	0.081	0.076	0.079	0.003	0.000
	10.00		0.090	0.088	0.087	0.088	0.002	0.010
	50.00		0.096	0.097	0.099	0.097	0.002	0.019
Elp	100.00		0.129	0.142	0.131	0.134	0.007	0.055
	500.00		0.260	0.240	0.229	0.243	0.016	0.164
	1000.00		0.430	0.425	0.440	0.432	0.008	0.353

Tabla A5b. Poder reductor férrico de *S. strictum* var. *compressum* y *L. pallida* a 50.00 ± 0.01 ºC. (continuación)

Muestra	[Muestra]	[Muestra]	Réplica					Absorbancia corregida (Δ)
	ppm	mM	1	2	3	Media	Ds	
Blanco	0.00	0.00	0.069	0.067	0.063	0.066	0.003	0.000
VI	5.00	0.02	0.100	0.078	0.076	0.085	0.013	0.018
	50.00	0.22	0.232	0.255	0.240	0.242	0.012	0.176
	100.00	0.44	0.368	0.364	0.360	0.364	0.004	0.298
	500.00	2.22	0.773	0.726	0.813	0.771	0.044	0.704
	1000.00	4.44	0.994	0.950	1.042	0.995	0.046	0.929
VII	5.00	0.03	0.056	0.058	0.066	0.060	0.005	-0.006
	50.00	0.27	0.081	0.074	0.080	0.078	0.004	0.012
	100.00	0.55	0.090	0.081	0.088	0.086	0.005	0.020
	500.00	2.73	0.120	0.122	0.126	0.123	0.003	0.056
	1000.00	5.46	0.149	0.147	0.143	0.146	0.003	0.080



Gráfica A5b. Poder reductor de *L. pallida*, para concentraciones crecientes de muestras. Se compara frente a tres patrones

Anexo 6
Gráficas y resultados del ensayo de Inhibición de peroxidación lipídica

Tabla A6a. Inhibición de peroxidación lipídica ejercida por los patrones antioxidantes

Muestra	[ppm]	Hora	% Inhibición peroxidación lipídica			Media	Ds*	EEM
Control	0	67.9	1.054	1.043	1.060	1.052	0.008	0.029
AA	5.20	67.9	24.41	25.55	26.50	**25.48**	1.047	0.341
	52.00	67.9	39.81	38.10	40.86	**39.59**	1.392	0.393
	104.00	67.9	46.75	46.09	46.75	**46.53**	0.384	0.207
	520.00	67.9	66.91	65.77	64.34	**65.67**	1.286	0.378
	1040.00	67.9	70.33	70.43	70.33	**70.36**	0.055	0.078
BHT	5.00	67.8	23.88	21.60	21.79	**22.43**	1.265	0.375
	50.00	67.8	39.37	40.13	38.71	**39.40**	0.713	0.282
	100.00	67.8	42.98	42.89	42.70	**42.86**	0.145	0.127
	500.00	67.8	57.62	55.62	54.67	**55.97**	1.504	0.409
	1000.00	67.8	61.23	61.42	61.13	**61.26**	0.145	0.127
aT	5.00	67.7	22.88	22.31	22.41	**22.54**	0.306	0.184
	50.00	67.7	37.62	38.00	37.34	**37.65**	0.334	0.193
	100.00	67.7	44.28	43.71	46.94	**44.98**	1.726	0.438
	500.00	67.7	60.54	64.06	61.11	**61.90**	1.888	0.458
	1000.00	67.7	70.52	68.91	66.43	**68.62**	2.059	0.478

Ds: desviación estándar, EEM: error estándar de la media

Tabla A6b. Inhibición peroxidación lipídica ejercida por el extracto y los compuestos de *S. strictum*

Muestra	[ppm]	Hora	% Inhibición peroxidación lipídica			Media	Ds	EEM
Control	0	65.8	1.092	1.098	1.106	1.099	0.006	0.027
Ess	5.06	65.8	18.20	16.11	16.93	**17.08**	1.055	0.342
	50.60	65.8	43.68	43.32	43.22	**43.41**	0.241	0.164
	101.20	65.8	53.32	52.51	52.69	**52.84**	0.430	0.219
	506.00	65.8	77.80	75.07	79.44	**77.44**	2.206	0.495
	1012.00	65.8	80.35	82.71	82.44	**81.83**	1.294	0.379
Elp	5.00	65.8	30.66	31.30	32.58	**31.51**	0.973	0.329
	50.00	65.8	54.14	54.69	55.14	**54.66**	0.501	0.236
	100.00	65.8	55.87	59.78	57.69	**57.78**	1.958	0.466
	500.00	65.8	77.71	76.98	75.16	**76.62**	1.312	0.382
	1000.00	65.8	81.53	81.62	83.99	**82.38**	1.393	0.393
Control	0	50.4	1.498	1.488	1.444	1.473	0.025	0.053
I	4.85	50.4	6.18	6.04	7.20	**6.47**	0.631	0.265
	48.5	50.4	18.19	19.21	18.13	**18.51**	0.608	0.260
	97	50.4	31.43	31.16	31.57	**31.39**	0.207	0.152
	485	50.4	64.77	62.86	63.88	**63.84**	0.951	0.325
	970	50.4	66.53	66.60	65.72	**66.28**	0.491	0.234
VI	4.70	49.0	43.11	44.06	43.45	**43.54**	0.482	0.231
	47.00	49.0	60.90	60.49	60.76	**60.72**	0.207	0.152
	94.00	49.0	62.12	62.39	61.98	**62.16**	0.207	0.152
	470.00	49.0	69.25	68.97	69.38	**69.20**	0.207	0.152
	940.00	49.0	71.35	71.35	71.28	**71.33**	0.039	0.066
VII	5.00	49.0	8.96	6.04	8.08	**7.69**	1.497	0.408
	50.00	49.0	13.71	13.58	15.07	**14.12**	0.826	0.303
	100.00	49.0	19.01	20.23	19.21	**19.48**	0.655	0.270
	500.00	49.0	25.93	26.21	26.82	**26.32**	0.452	0.224
	1000.00	49.0	32.38	32.52	31.16	**32.02**	0.748	0.288

Tabla A6b. Inhibición peroxidación lipídica ejercida por el extracto y los compuestos de *S. strictum*, (continuación)

Muestra	[ppm]	Hora	% Inhibición peroxidación lipídica			Media	Ds	EEM
Control	0.00	22.3	1.589	1.599	1.574	1.585	0.012	0.036
II	4.95	22.3	21.15	17.75	20.77	**19.89**	1.867	0.455
	49.50	22.3	29.10	28.97	28.66	**28.91**	0.227	0.159
	99.00	22.3	39.70	40.90	40.33	**40.31**	0.600	0.258
	495.00	22.3	59.50	60.39	58.31	**59.40**	1.045	0.341
	990.00	22.3	71.74	70.98	70.35	**71.03**	0.695	0.278
Control	0	18.0	0.662	0.663	0.641	0.652	0.010	0.033
III	4.67	18.0	4.91	4.75	5.83	**5.16**	0.581	0.254
	46.67	18.0	13.96	9.97	11.35	**11.76**	2.025	0.474
	93.33	18.0	16.56	15.80	15.95	**16.10**	0.406	0.212
	466.67	18.0	24.54	26.38	24.23	**25.05**	1.161	0.359
	933.33	18.0	50.77	51.69	50.15	**50.87**	0.772	0.293
IV	4.67	18.0	22.85	21.78	19.48	**21.37**	1.724	0.438
	46.67	18.0	25.92	29.60	32.52	**29.35**	3.305	0.606
	93.33	18.0	76.53	75.77	76.07	**76.12**	0.386	0.207
	466.67	18.0	77.76	78.07	79.75	**78.53**	1.074	0.345
	933.33	18.0	84.97	84.36	85.74	**85.02**	0.692	0.277
V	5	18.0	81.60	81.90	81.60	**81.70**	0.177	0.140
	50	18.0	83.90	84.20	84.66	**84.25**	0.386	0.207
	100	18.0	86.04	84.97	84.97	**85.33**	0.620	0.262
	500	18.0	86.81	86.66	86.35	**86.61**	0.234	0.161
	1000	18.0	88.04	88.50	88.04	**88.19**	0.266	0.172

Anexo 7
Resultados del ensayo de citoprotección

Tabla A7a. Citoprotección de células HaCat ejercida por los extractos de *S. strictum* y *L. pallida*, y los compuestos lobarielina (VI), hematomato de metilo (I), ácido porfirílico (V) y β-orcinol carboxilato de metilo (III)

% supervivencia HaCat + OH• + Extracto de *L. pallida* (ELp)						
[ppm]	% Viabilidad celular					
	HaCat 1	**HaCat 2**	**HaCat 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH·	27.98	27.98	27.51	27.82	0.269	0.156
4.20	21.45	21.45	22.38	21.76	0.537	0.310
8.39	23.20	23.20	23.02	23.14	0.104	0.060
16.79	24.01	24.01	24.85	24.29	0.484	0.280
33.57	25.32	25.32	25.29	25.31	0.014	0.008
67.14	33.89	33.89	32.99	33.59	0.519	0.300
% supervivencia HaCat + OH• + Extracto de *S. strictum*						
[ppm]	% Viabilidad celular					
	HaCat 1	**HaCat 2**	**HaCat 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH·	30.34	29.86	31.41	30.53	0.793	0.458
4.28	21.56	20.26	21.92	21.25	0.872	0.503
8.57	25.88	25.74	26.89	26.17	0.624	0.360
17.13	26.05	25.98	27.38	26.47	0.786	0.454
34.27	27.83	27.48	28.95	28.08	0.771	0.445
68.54	33.83	33.32	34.99	34.05	0.856	0.494
% supervivencia HaCat + OH• + Lobarielina						
[ppm]	% Viabilidad celular					
	HaCat 1	**HaCat 2**	**HaCat 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH·	27.70	27.55	27.53	27.59	0.096	0.055
4.46	29.03	29.40	29.79	29.41	0.382	0.221
8.92	31.99	32.04	31.55	31.86	0.268	0.155
17.83	32.32	32.72	32.45	32.50	0.202	0.117
35.67	40.06	39.97	39.65	39.89	0.217	0.126
71.34	47.84	47.53	47.58	47.65	0.165	0.095
% supervivencia HaCat + OH• + Hematomato metilo						
[ppm]	% Viabilidad celular					
	HaCat 1	**HaCat 2**	**HaCat 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH·	30.66	31.23	31.74	31.21	0.540	0.312
4.20	30.66	31.25	31.79	31.23	0.564	0.326
8.39	32.52	33.22	33.60	33.11	0.548	0.316
16.79	35.41	35.34	36.13	35.63	0.433	0.250
33.57	40.16	40.51	40.50	40.39	0.199	0.115
67.14	67.48	67.75	68.98	68.07	0.801	0.462

HaCat 1, 2 y 3: tres ensayos independientes realizados por sextuplicado; **DS**: desviación estándar; **EEM**: error estándar de la media; **CTR**: Control de células no expuestas a estrés oxidativo; **OH•**: Control del máximo daño celular, en el que las células fueron expuestas a daño oxidativo por radical hidroxilo, formado in situ por fotolisis de H_2O_2 2.5 mM bajo radiación UV durante 20 minutos.

Tabla A7a. (Continuación)

% supervivencia HaCat + OH• + Acido porfirílico						
[ppm]	% Viabilidad celular					
	HaCat 1	**HaCat 2**	**HaCat 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH·	28.32	27.79	28.13	28.08	0.269	0.156
4.28	26.69	26.18	26.75	26.54	0.312	0.180
8.57	27.25	26.80	27.22	27.09	0.255	0.147
17.13	27.59	27.06	27.42	27.36	0.268	0.155
34.27	27.56	27.17	27.56	27.43	0.222	0.128
68.54	27.73	27.23	27.58	27.51	0.258	0.149
% supervivencia HaCat + OH• + β-orcinol carboxilato						
[ppm]	% Viabilidad celular					
	HaCat 1	**HaCat 2**	**HaCat 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH·	29.63	29.81	29.57	29.67	0.125	0.072
4.98	26.67	27.71	27.10	27.16	0.519	0.299
9.97	28.19	28.91	28.62	28.58	0.361	0.208
19.93	30.80	31.53	31.24	31.19	0.371	0.214
39.86	31.93	32.67	32.56	32.39	0.398	0.230
79.73	33.76	34.33	34.81	34.30	0.527	0.304

HaCat 1, 2 y 3: tres ensayos independientes realizados por sextuplicado; **DS**: desviación estándar; **EEM**: error estándar de la media; **CTR**: Control de células no expuestas a estrés oxidativo; **OH•**: Control del máximo daño celular, en el que las células fueron expuestas a daño oxidativo por radical hidroxilo, formado in situ por fotolisis de H_2O_2 2.5 mM bajo radiación UV durante 20 minutos.

Tabla A7b. Citoprotección de células HaCat ejercida por lobarielina (VI) y hematomato de metilo (I)

Supervivencia HaCat + OH• + Lobarielina						
[μM]	% Viabilidad celular					
	HaCat 1	**HaCat 2**	**HaCat 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH•	60.94	60.44	59.92	60.43	0.511	0.295
19.83	62.47	62.05	61.49	62.00	0.492	0.284
39.65	69.88	69.02	68.54	69.15	0.682	0.394
79.30	79.23	79.10	78.07	78.80	0.636	0.367
158.61	83.70	83.69	82.90	83.43	0.459	0.265
317.21	93.40	93.66	92.74	93.27	0.474	0.273
Supervivencia HaCat + OH• + Hematomato metilo						
[μM]	% Viabilidad celular					
	HaCat 1	**HaCat 2**	**HaCat 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH•	60.64	60.44	59.31	60.13	0.717	0.414
19.99	63.20	63.13	62.13	62.82	0.598	0.346
39.98	67.30	67.43	66.18	66.97	0.689	0.398
79.97	76.37	76.63	76.10	76.37	0.263	0.152
159.94	87.79	82.27	81.25	83.77	3.518	2.031
319.88	110.74	110.97	109.56	110.42	0.758	0.437

HaCat 1, 2 y 3: tres ensayos independientes realizados por sextuplicado; **DS**: desviación estándar; **EEM**: error estándar de la media;**CTR**: Control de células no expuestas a estrés oxidativo; **OH•**: Control del máximo daño celular, en el que las células fueron expuestas a daño oxidativo por radical hidroxilo, formado in situ por fotolisis de H_2O_2 0.75mM bajo radiación UV durante 45 minutos.

Tabla A7c. Neuroprotección ejercida por lobarielina (VI) y hematomato de metilo (I)

Supervivencia Neuronas + OH• + Lobarielina						
[μM]	% Viabilidad celular Neuronas					
	Neu 1	**Neu 2**	**Neu 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH•	20.67	21.20	21.85	21.24	0.586	0.338
38.87	21.22	21.67	22.11	21.67	0.449	0.259
77.75	27.10	28.18	27.59	27.62	0.539	0.311
155.50	47.21	47.05	46.84	47.03	0.183	0.106
310.99	50.05	50.95	51.61	50.87	0.785	0.453
Supervivencia Neuronas + OH• + Hematomato metilo						
[μM]	% Viabilidad celular Neuronas					
	Neu 1	**Neu 2**	**Neu 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH•	21.92	22.37	21.79	22.02	0.305	0.176
41.65	33.20	33.62	33.36	33.40	0.211	0.122
83.30	57.20	58.09	56.98	57.42	0.587	0.339
166.60	43.45	43.88	43.37	43.57	0.276	0.160
333.21	29.95	30.94	30.70	30.53	0.515	0.297

Neuronas 1, 2 y 3: tres ensayos independientes realizados por sextuplicado; **DS**: desviación estándar; **EEM**: error estándar de la media; **CTR**: Control de células no expuestas a estrés oxidativo; **OH•**: Control del máximo daño celular, en el que las células fueron expuestas a daño oxidativo por radical hidroxilo, formado in situ por fotolisis de H_2O_2 0.75mM bajo radiación UV durante 45 minutos.

Tabla A7d. Citoprotección de células HeLa ejercida por lobarielina (VI) y hematomato de metilo (I)

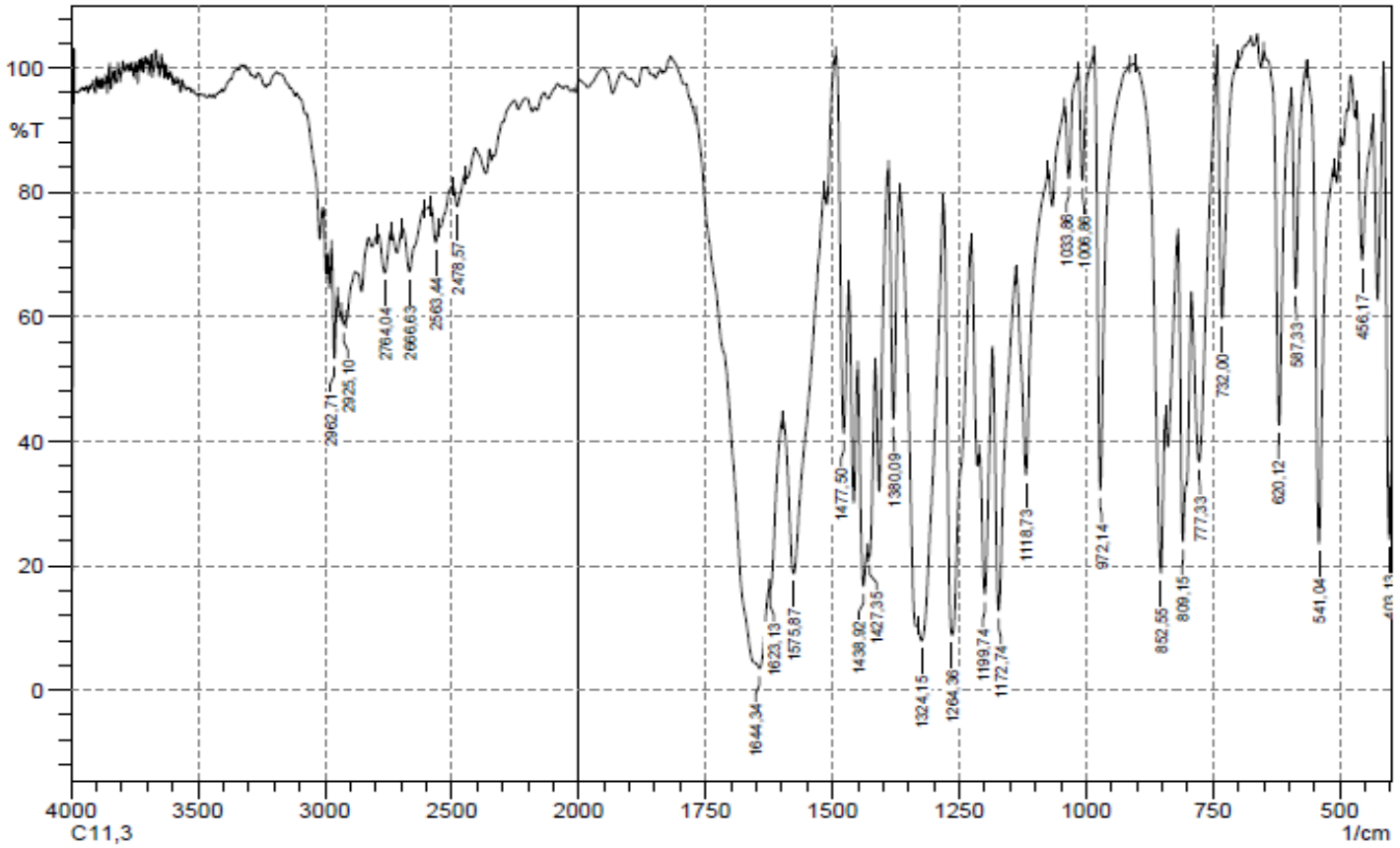
Supervivencia HeLa + OH• + Lobarielina						
[μM]	% Viabilidad celular					
	HeLa 1	**HeLa 2**	**HeLa 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH•	72.62	71.73	79.27	74.54	4.119	2.378
38.87	73.90	72.08	79.63	75.21	3.943	2.276
77.75	84.62	84.90	82.26	83.92	1.451	0.838
155.50	83.43	86.04	82.52	84.00	1.826	1.054
310.99	95.14	90.34	88.13	91.21	3.585	2.070
Supervivencia HeLa + OH• + Hematomato metilo						
[μM]	% Viabilidad celular					
	HeLa 1	**HeLa 2**	**HeLa 3**	**Media**	**Ds**	**EEM**
CTR	100.00	100.00	100.00	100.00	0.000	0.000
OH•	69.35	68.63	72.23	70.07	1.902	1.098
41.65	74.61	74.89	77.78	75.76	1.755	1.013
83.30	91.40	94.96	91.34	92.57	2.072	1.196
166.60	88.33	82.18	84.17	84.90	3.139	1.812
333.21	93.12	86.60	85.19	88.31	4.232	3.550

HeLa 1, 2 y 3: tres ensayos independientes realizados por sextuplicado; **DS**: desviación estándar; **EEM**: error estándar de la media; **CTR**: Control de células no expuestas a estrés oxidativo; **OH•**: Control del máximo daño celular, en el que las células fueron expuestas a daño oxidativo por radical hidroxilo, formado in situ por fotolisis de H_2O_2 0.75mM bajo radiación UV durante 45 minutos.

ESPECTROS

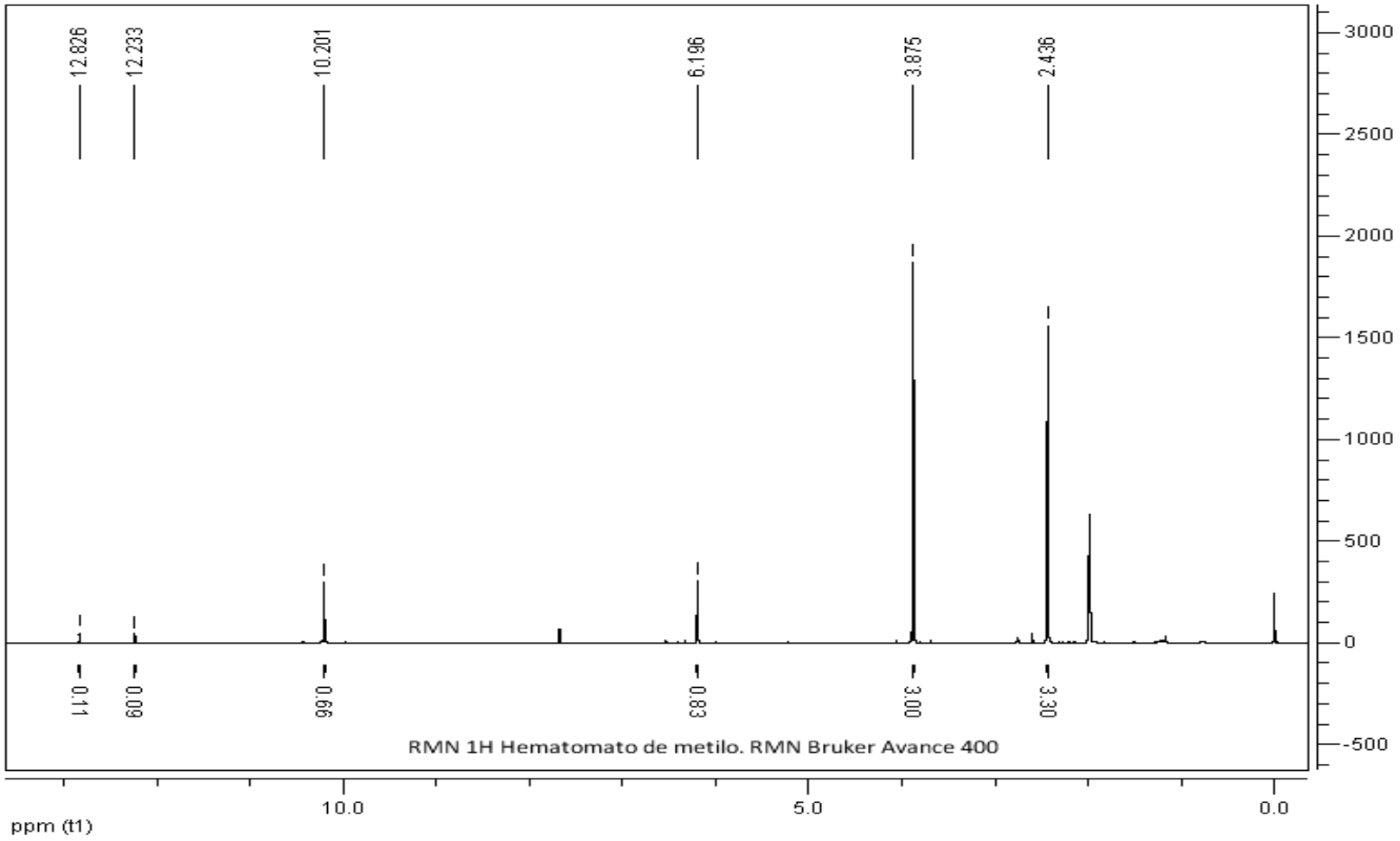
ESPECTROS 1

Espectro 1a. Espectro de Infrarrojo (IR), del hematomato de metilo (I)

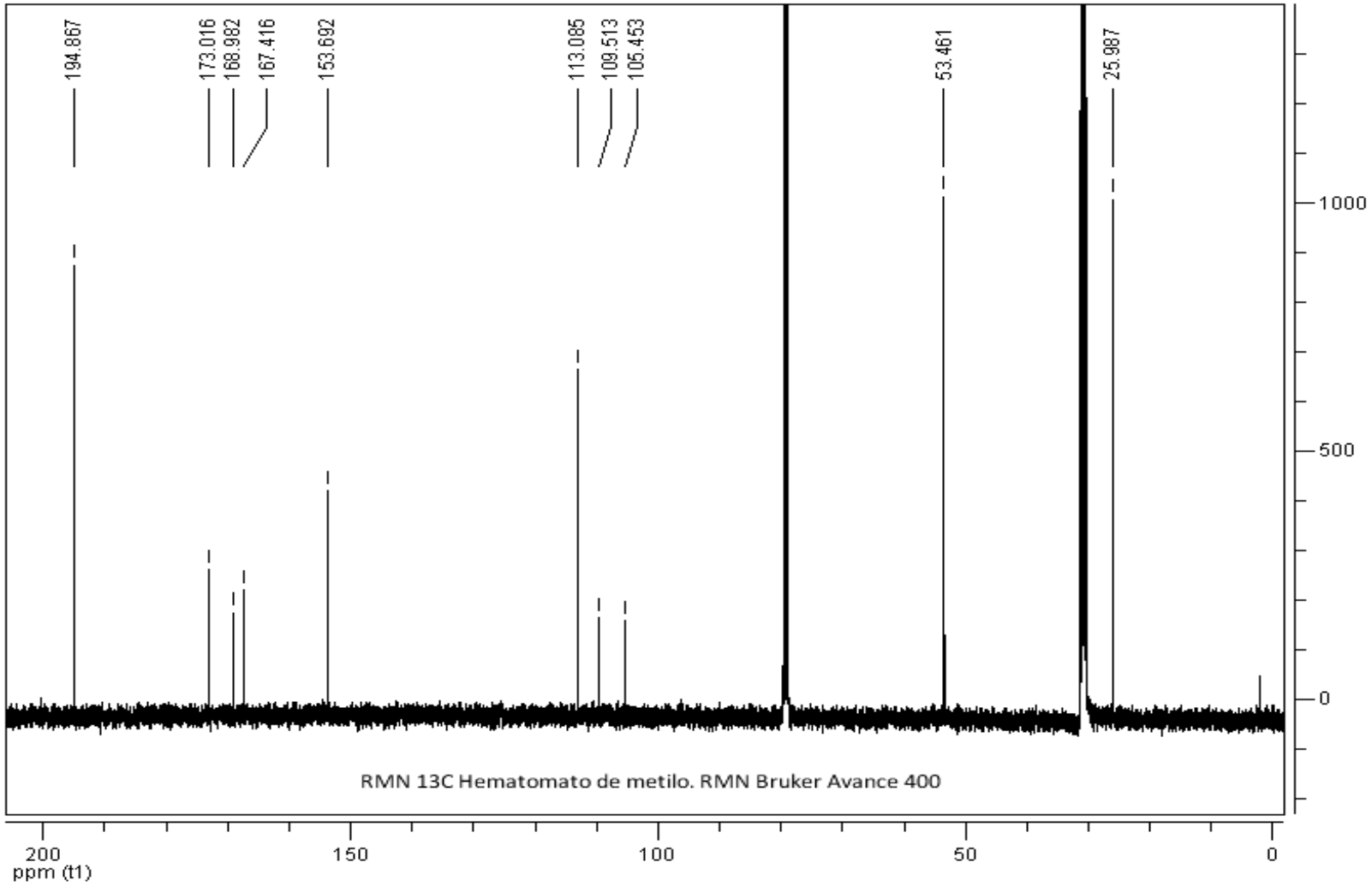


Shimadzu IR Prestige 21

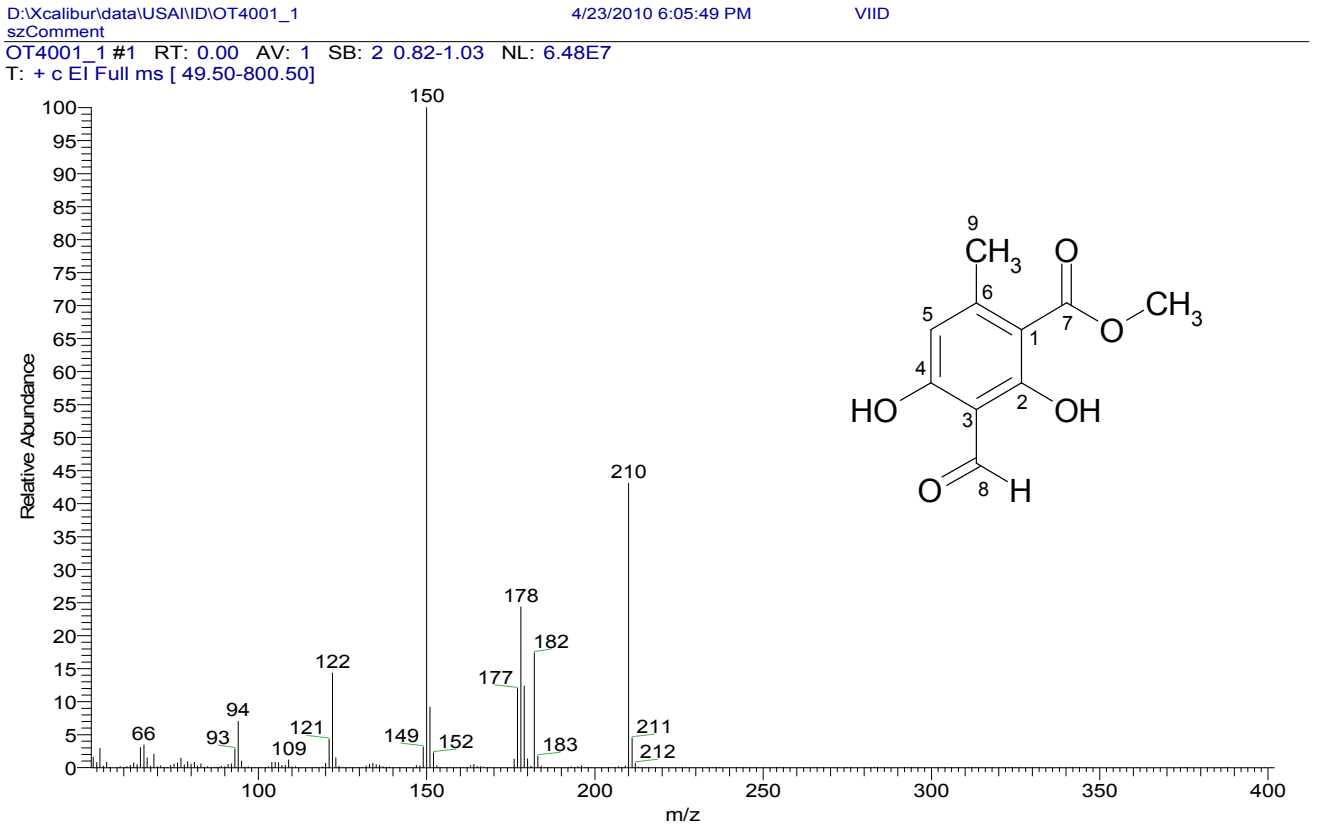
Espectro 1b. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ^{1}H del hematomato de metilo (I)



Espectro 1c. Espectro ^{13}C RMN del hematomato de metilo (I)

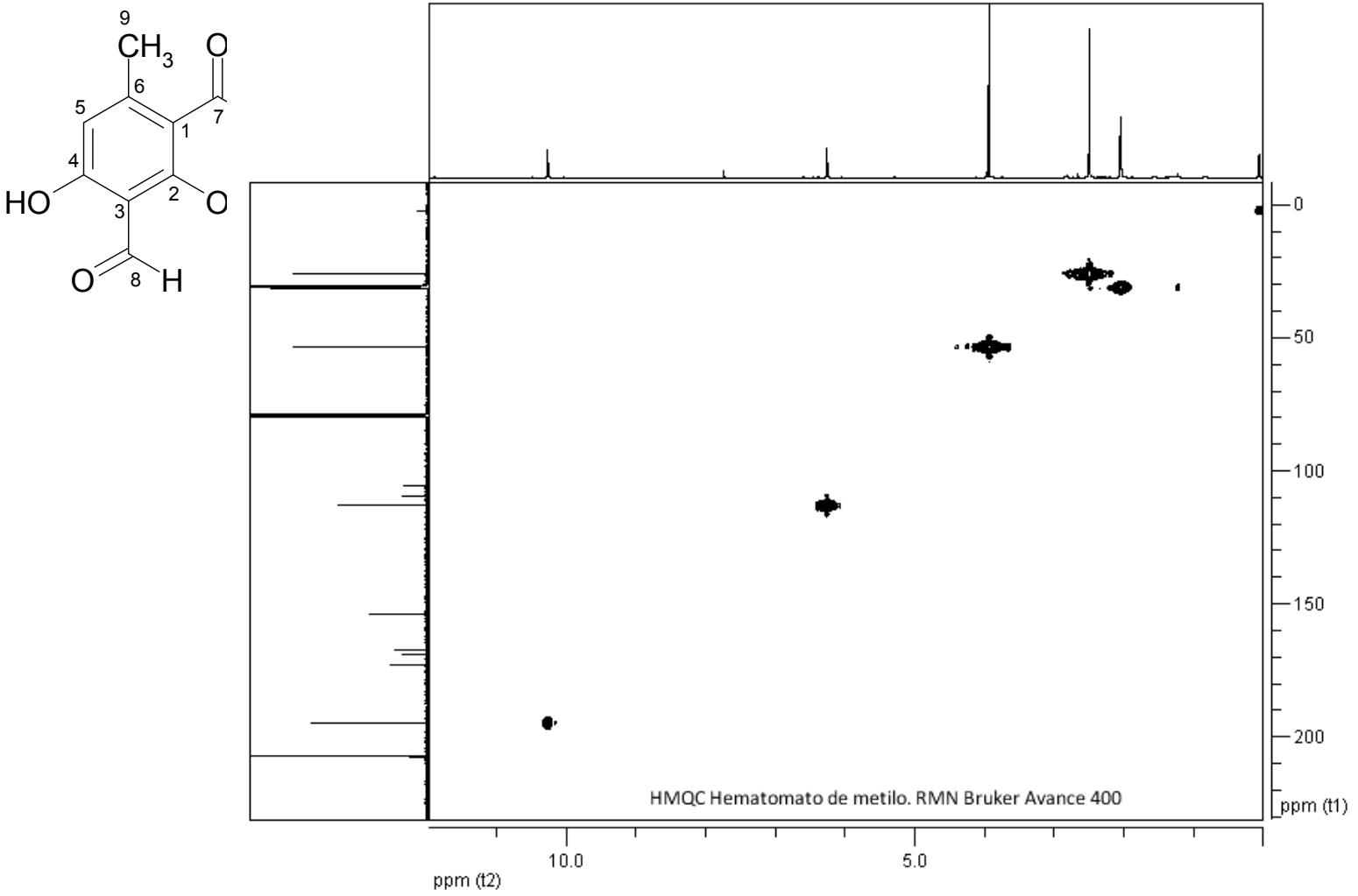


Espectro 1d. Espectro de masas IE, del hematomato de metilo (I)

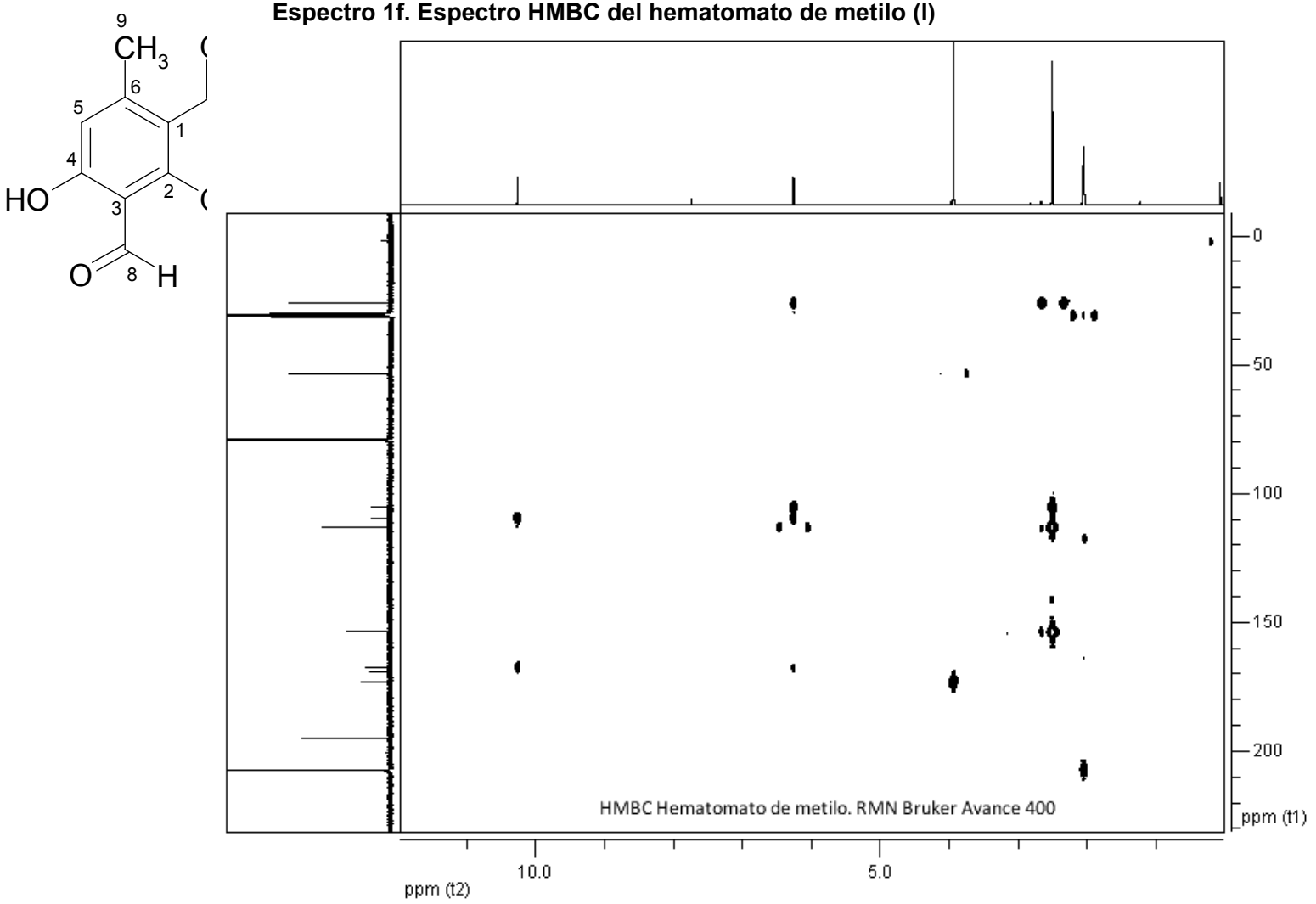


EM-IE Espectrómetro de masas DFS (Double Focus Sector) Thermo-Electron.

Espectro 1e. Espectro HMQC del hematomato de metilo (I)

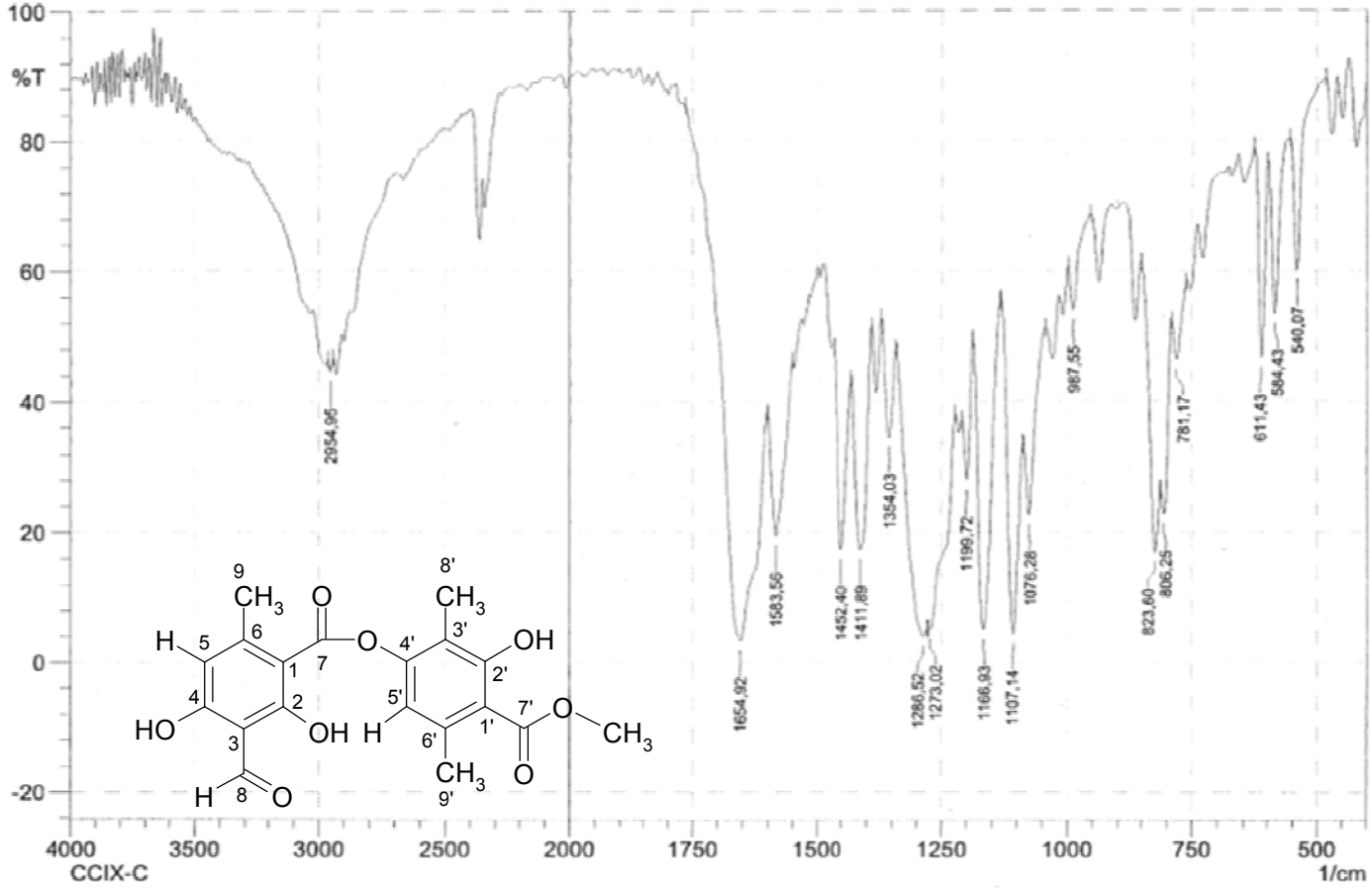


Espectro 1f. Espectro HMBC del hematomato de metilo (I)



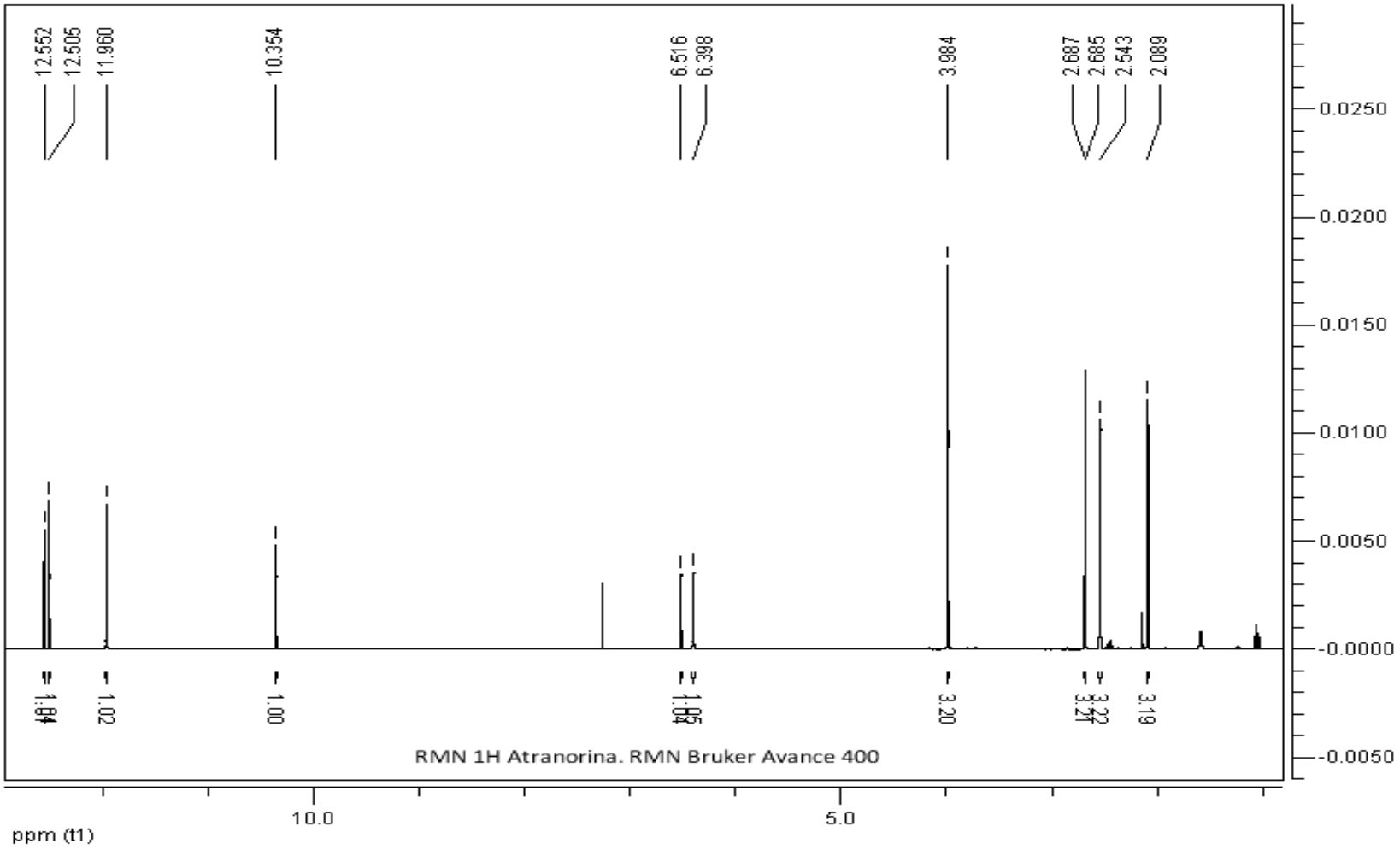
ESPECTROS 2

Espectro 2a. Espectro IR de la atranorina (II)

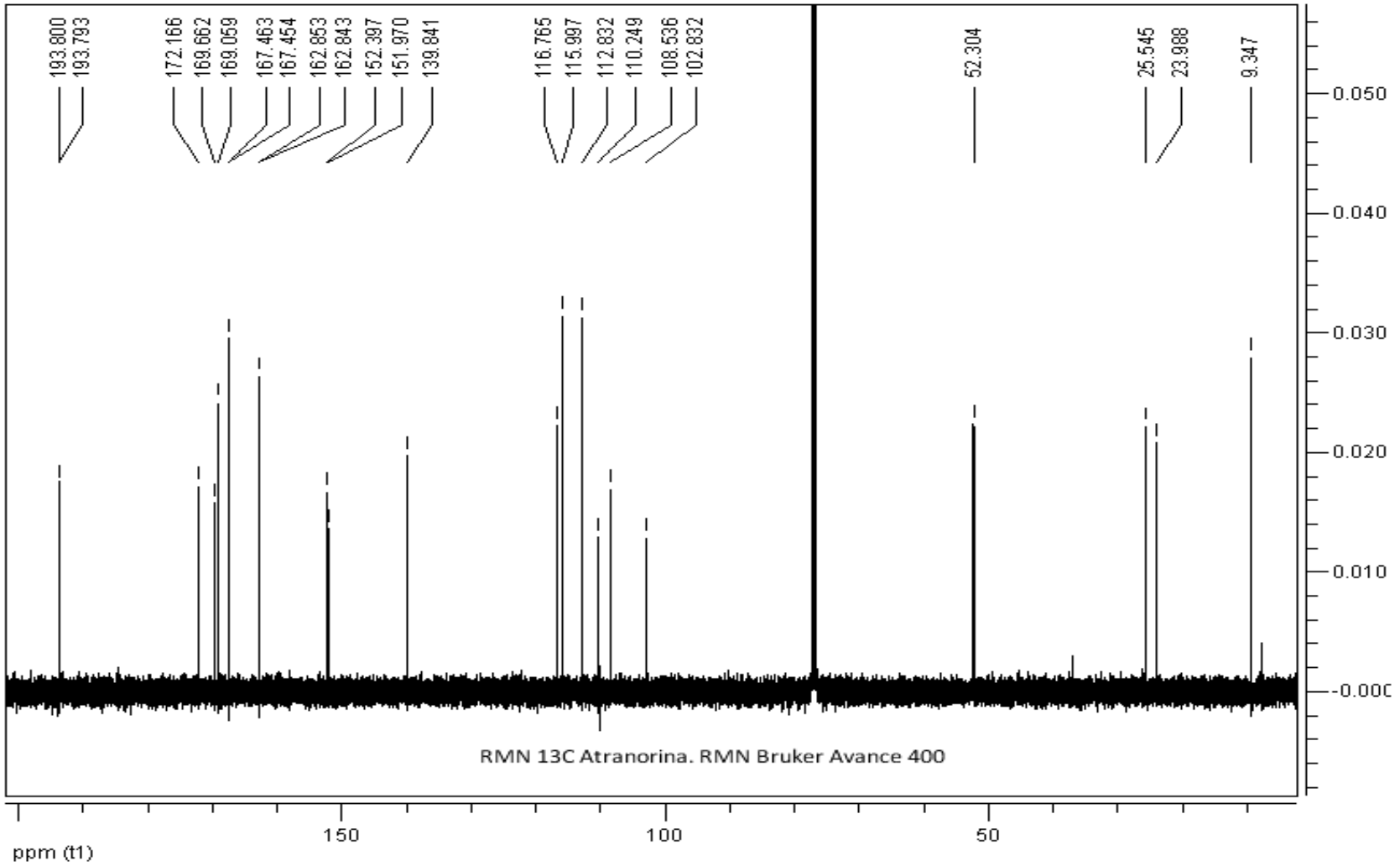


Shimadzu IR Prestige 21

Espectro 2b. Espectro ^{1}H RMN de la atranorina (II)

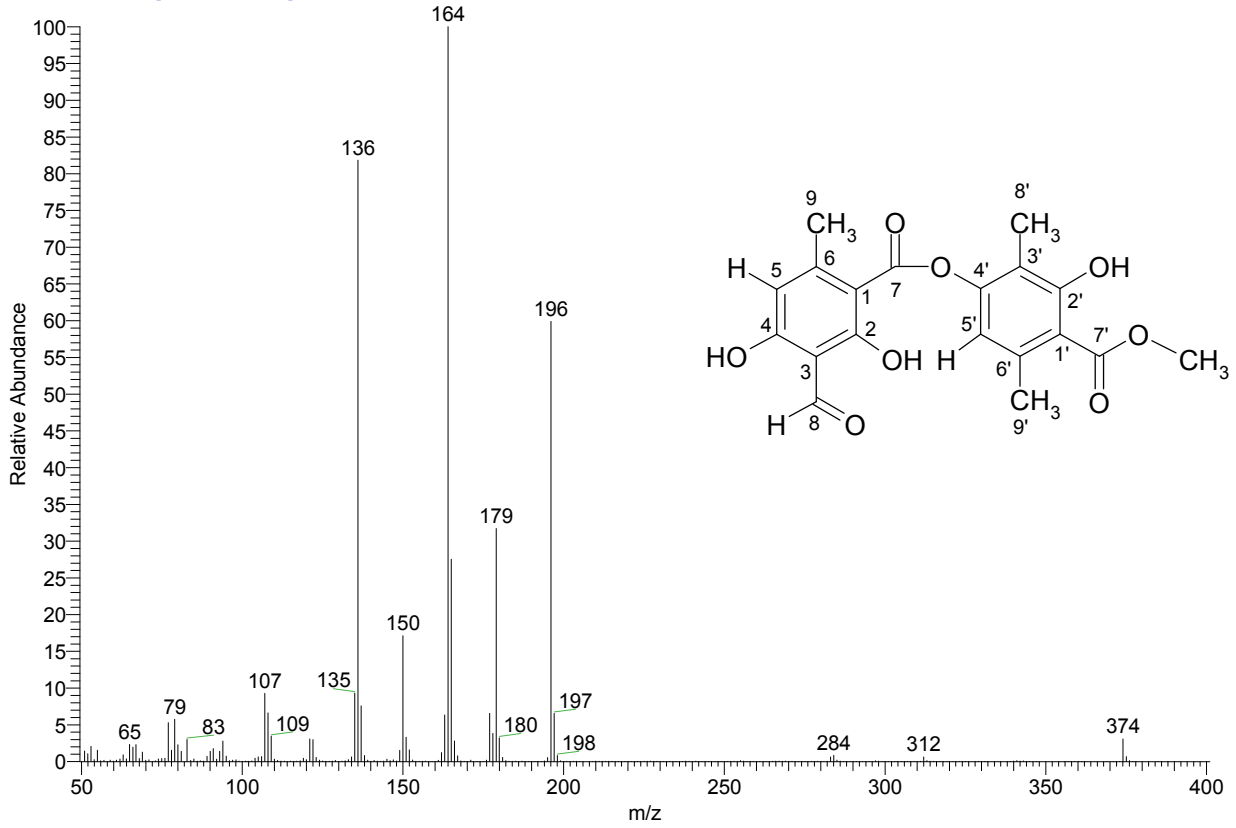


Espectro 2c. Espectro ^{13}C RMN de la atranorina (II)



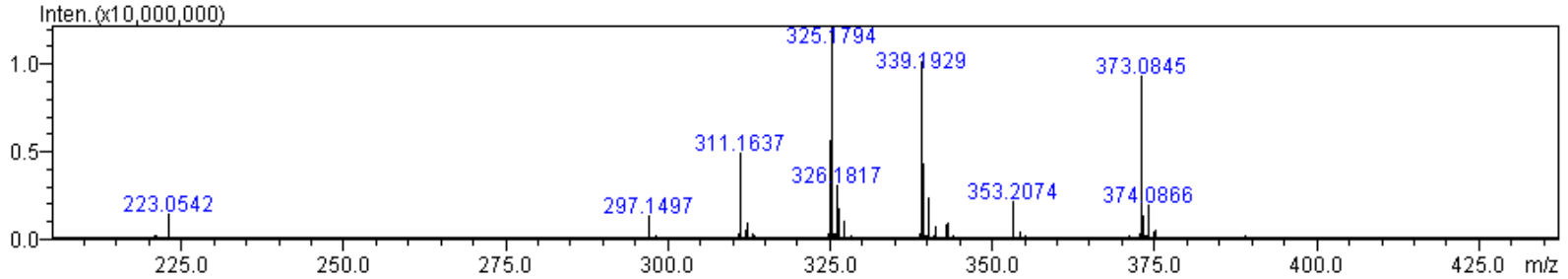
Espectro 2d. Espectro de masas IE , de la atranorina (II)

D:\Xcalibur\data\USAI\ID\OT4002_1 4/23/2010 6:18:22 PM IXC
szComment
OT4002_1 #8-9 RT: 1.44-1.64 AV: 2 SB: 3 3.08-3.49 NL: 2.44E7
T: + c EI Full ms [49.50-800.50]

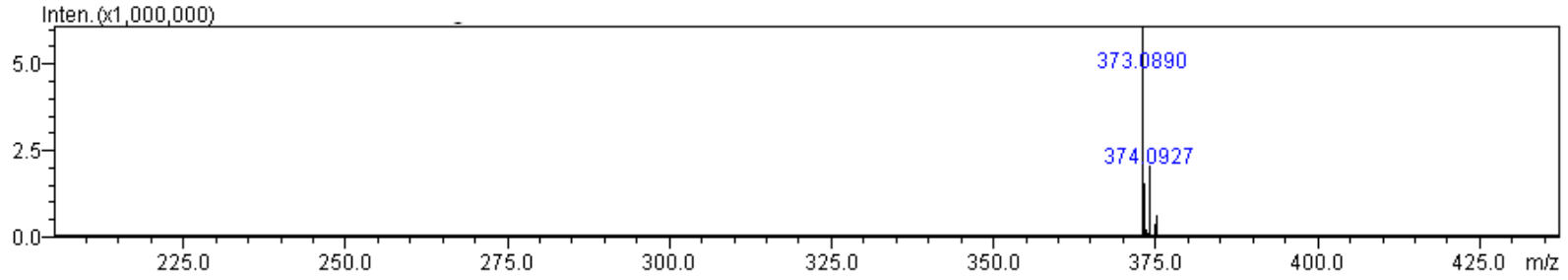


Espectrómetro de masas DFS (Double Focus Sector) Thermo-Electron.

Espectro 2e. Espectro de masas de alta resolución (AR), de la atranorina (II)

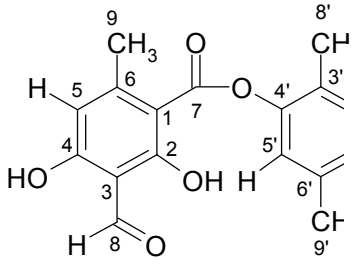


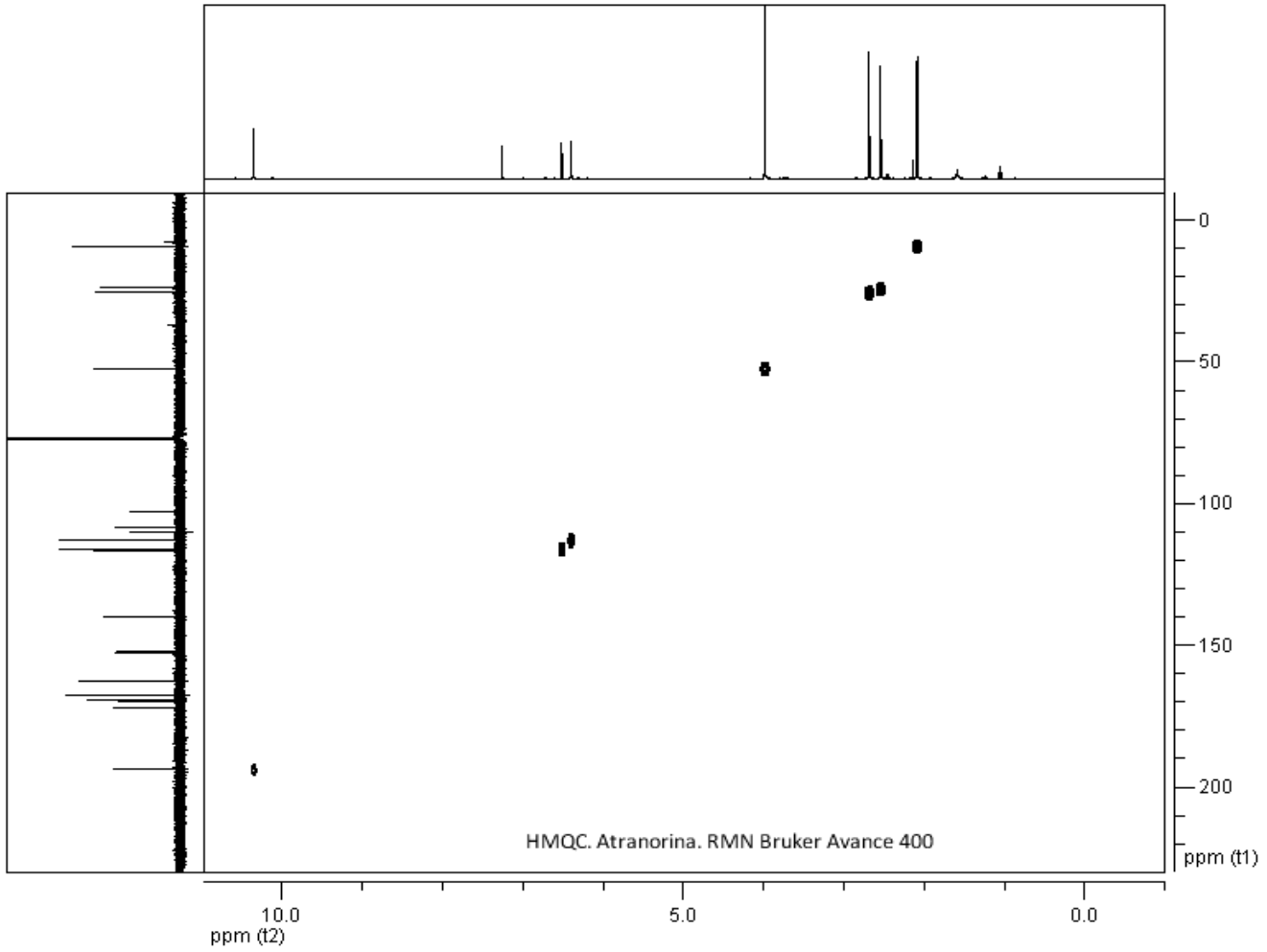
Modo positivo ampliado Espectrómetro Shimadzu LCMS-IT-TOF



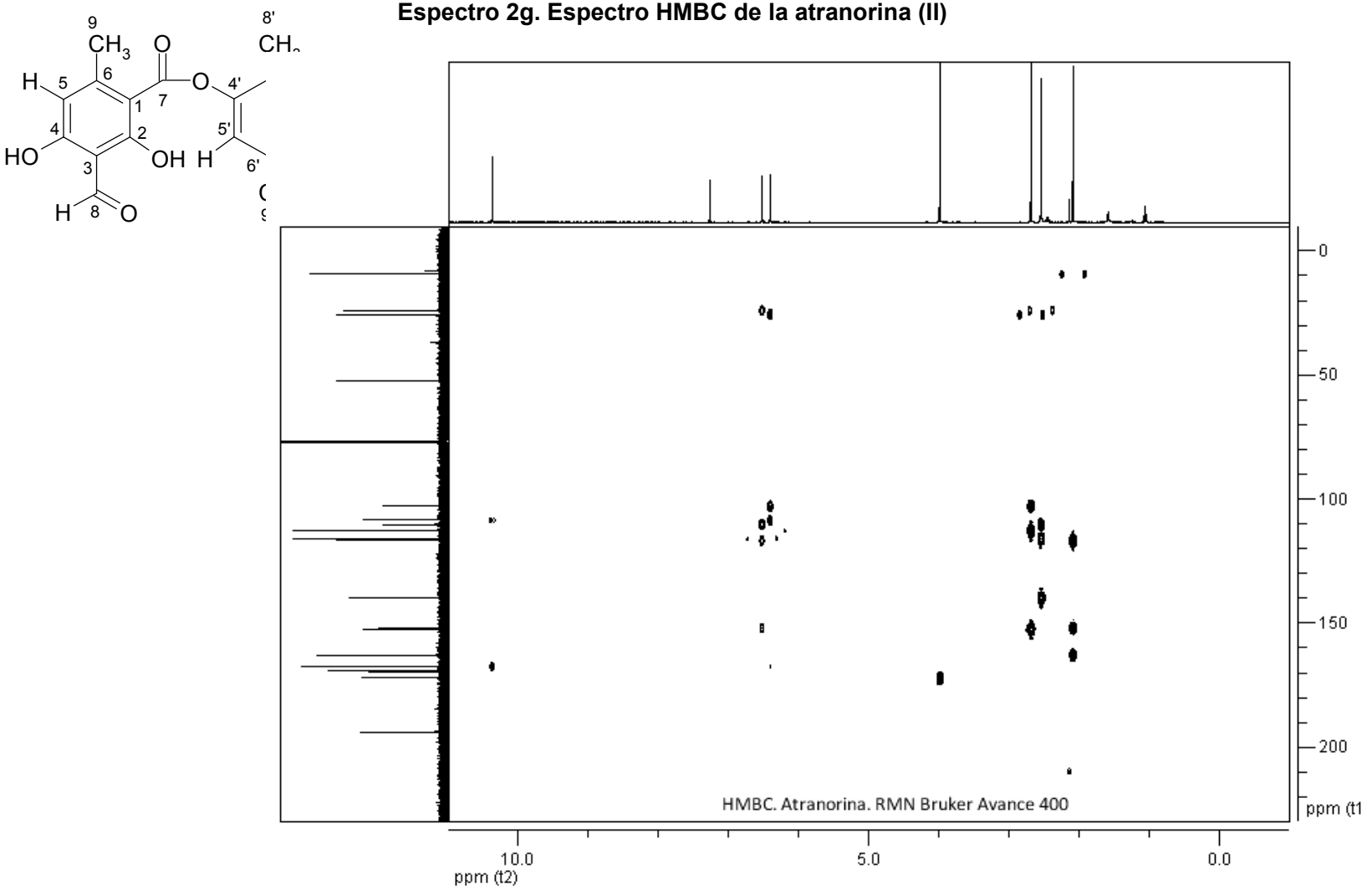
Modo negativo Espectrómetro Shimadzu LCMS-IT-TOF

Espectro 2f. Espectro HMQC de la atranorina (II)



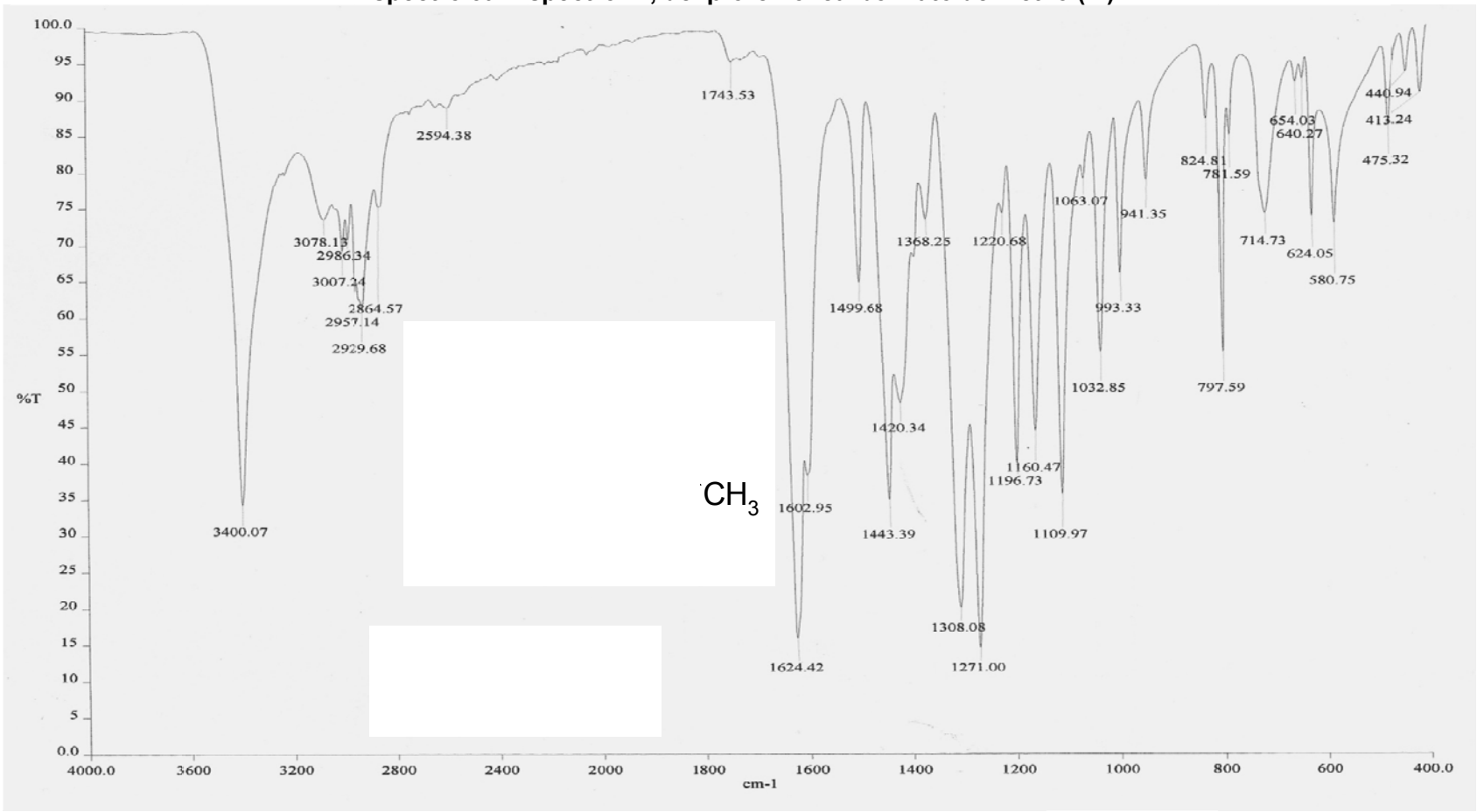


Espectro 2g. Espectro HMBC de la atranorina (II)

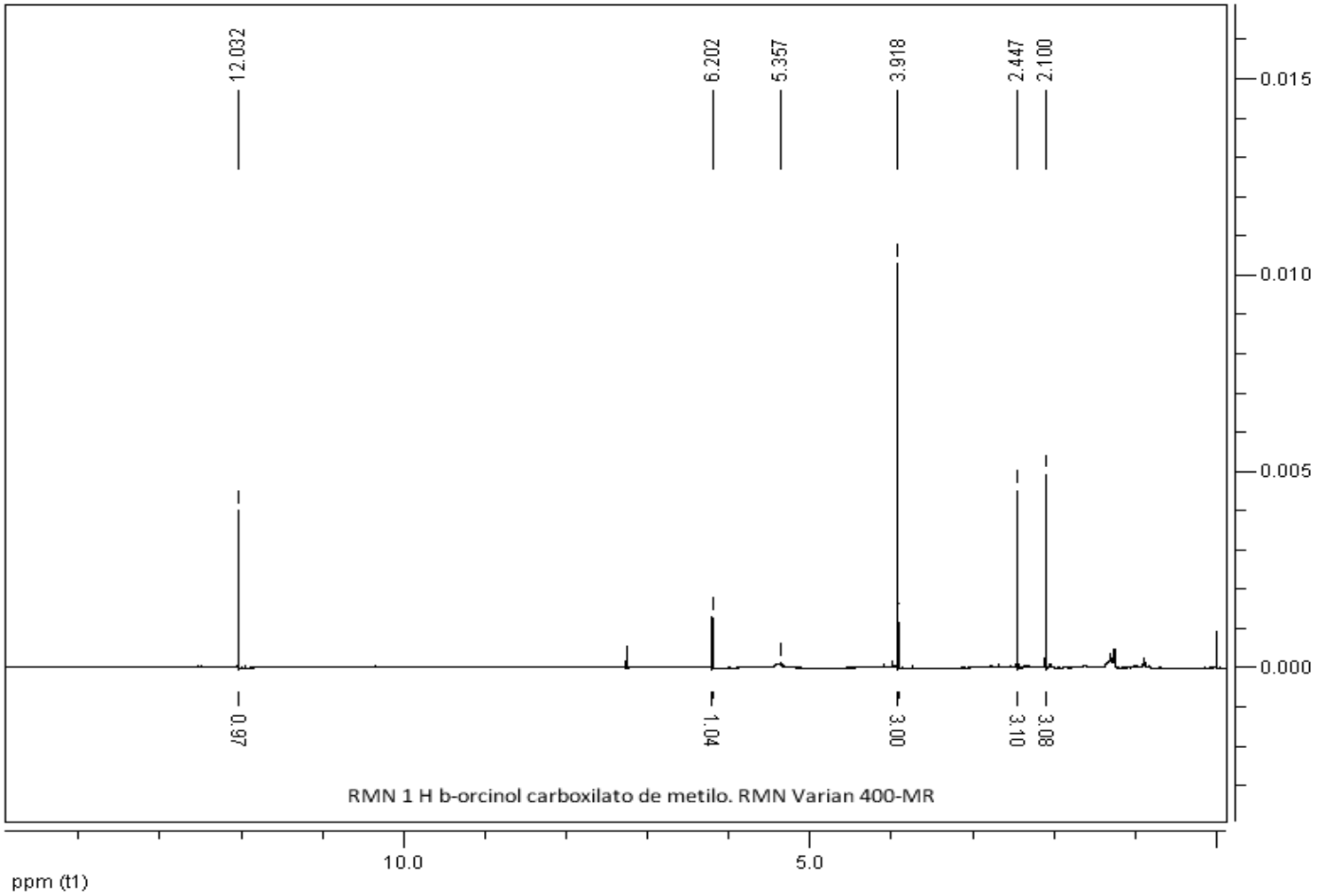


ESPECTROS 3

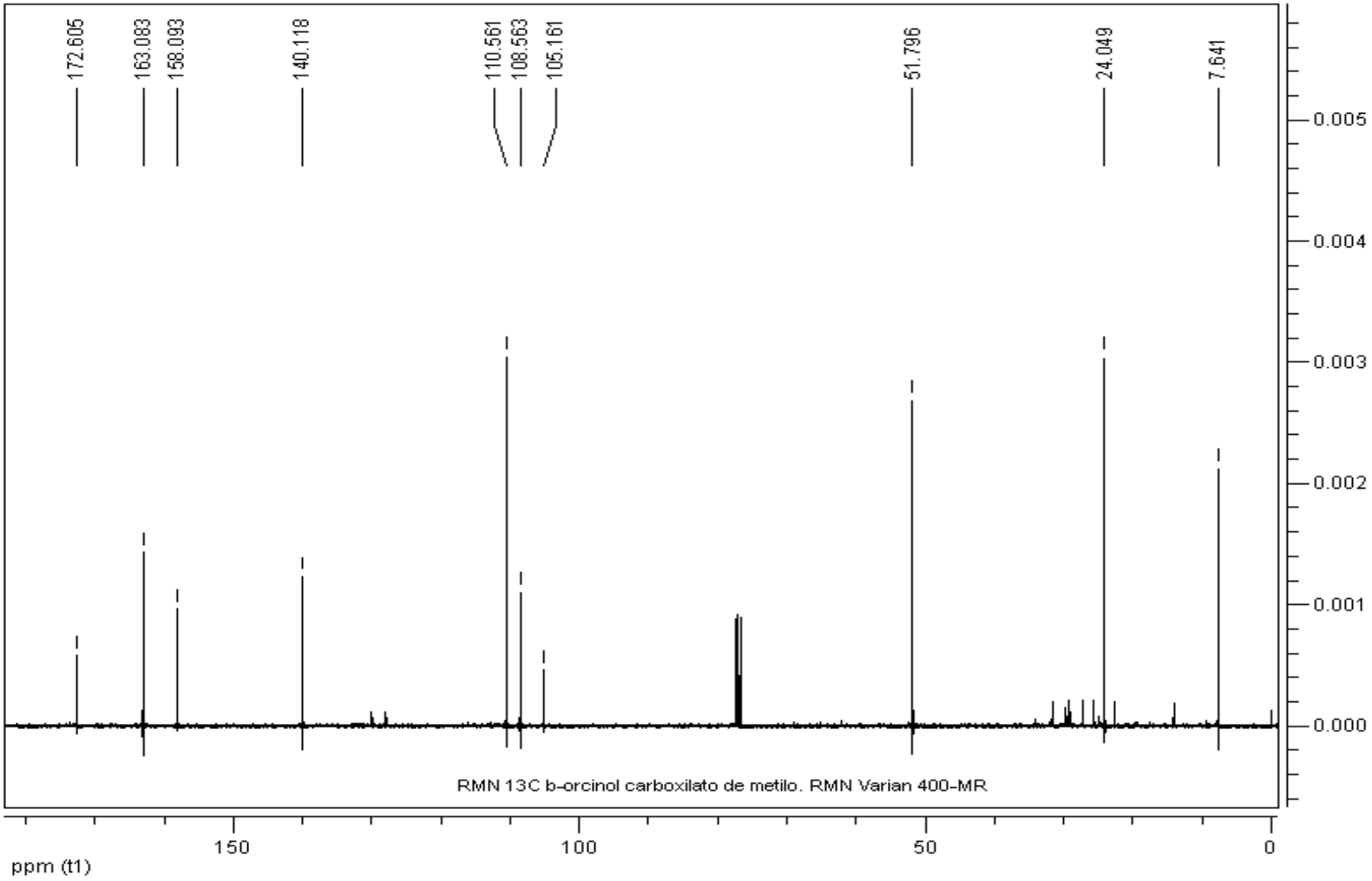
Espectro 3a. Espectro IR, del β-orcinol carboxilato de metilo (III)



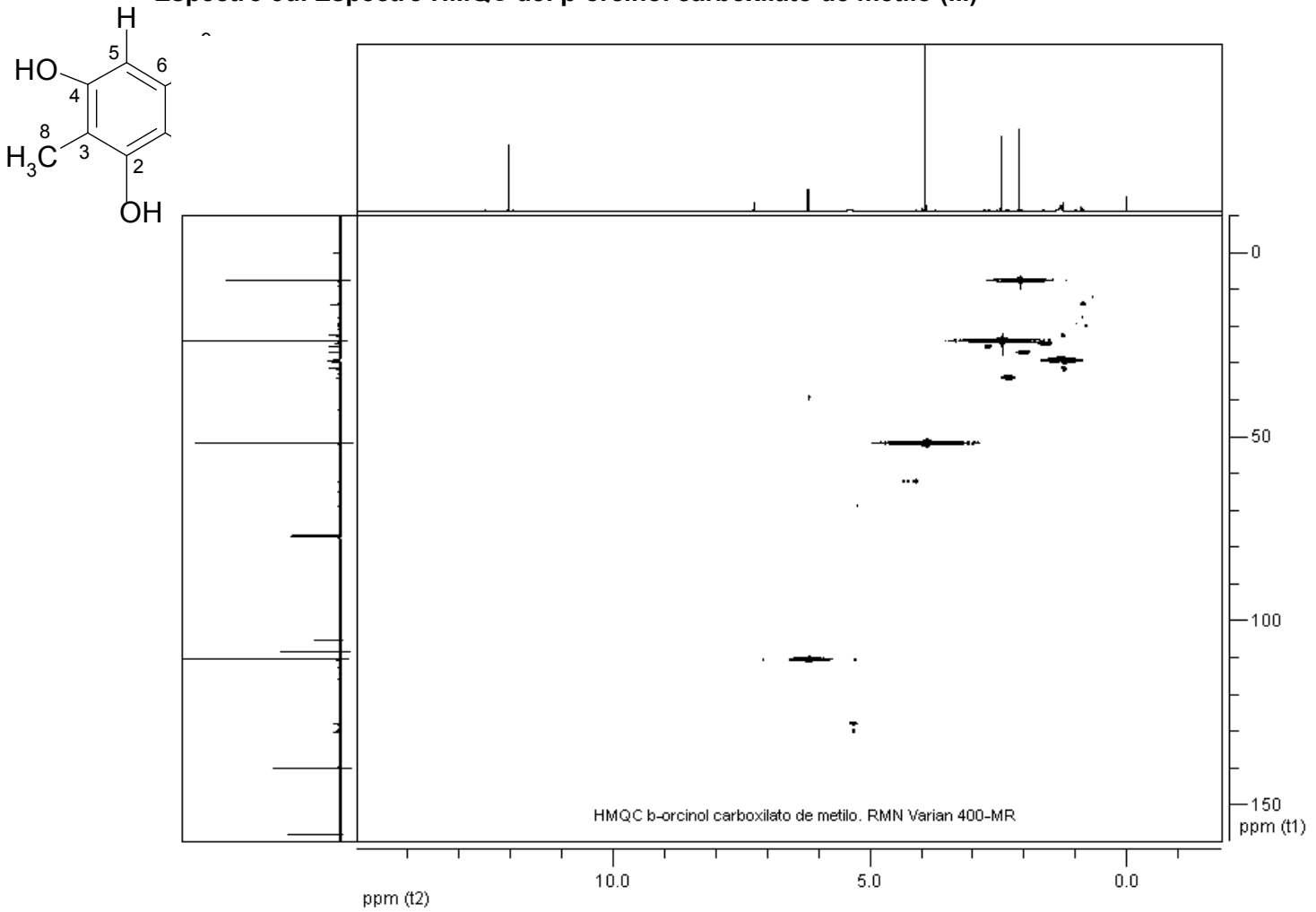
Espectro 3b. Espectro de ^{1}H RMN del β-orcinol carboxilato de metilo (III)



Espectro 3c. Espectro ^{13}C RMN del β-orcinol carboxilato de metilo (III)

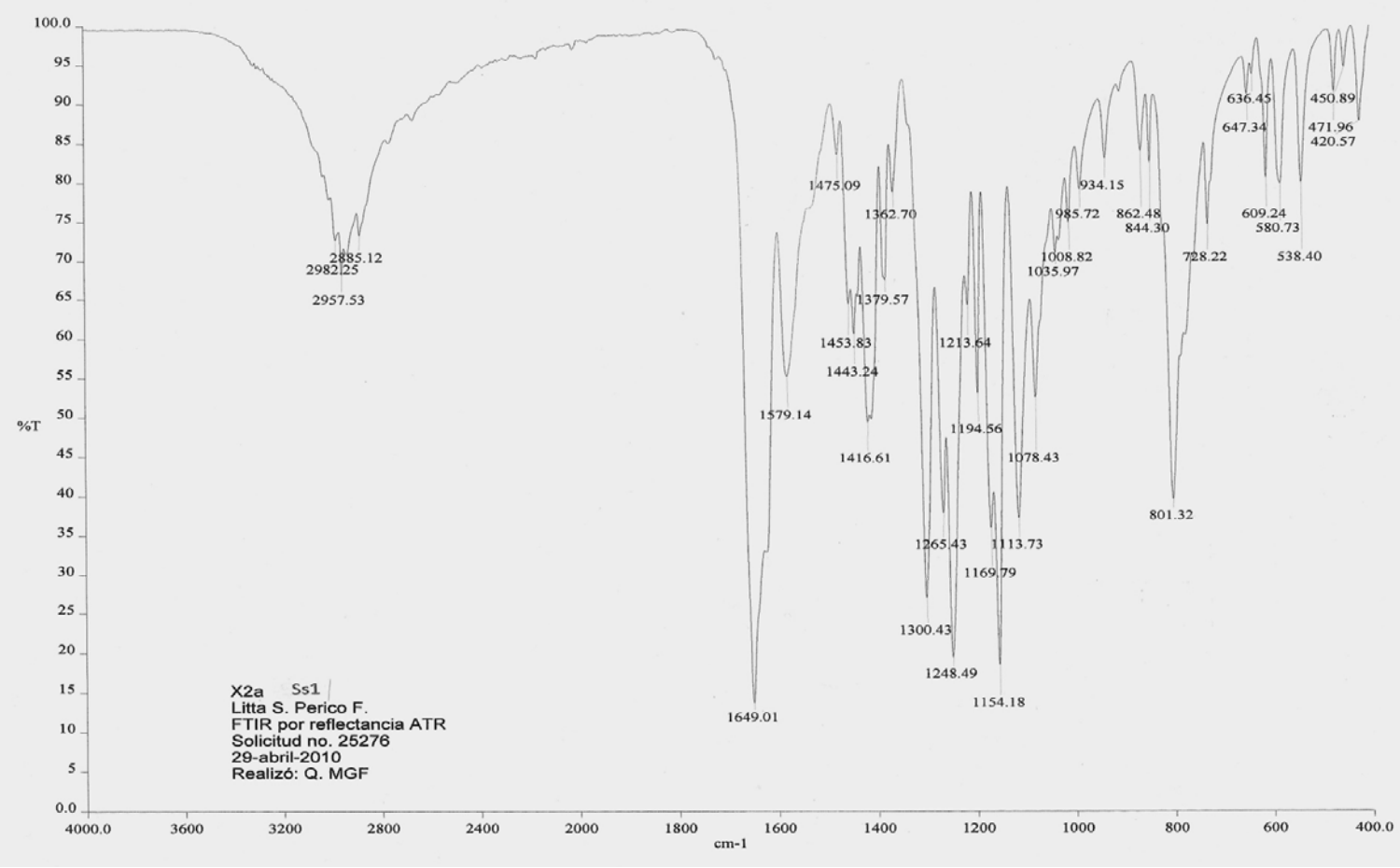


Espectro 3d. Espectro HMQC del β-orcinol carboxilato de metilo (III)

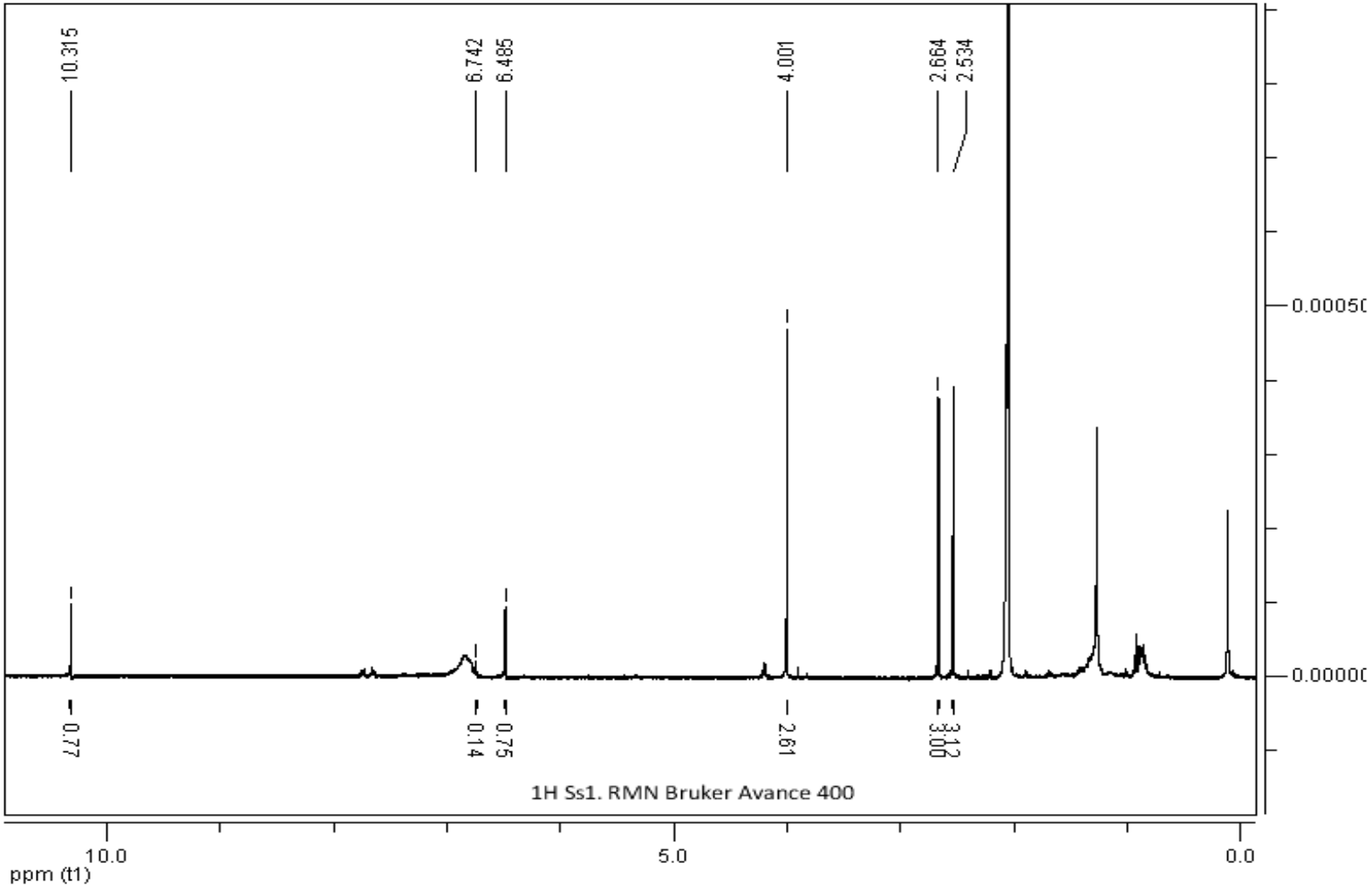


ESPECTROS 4

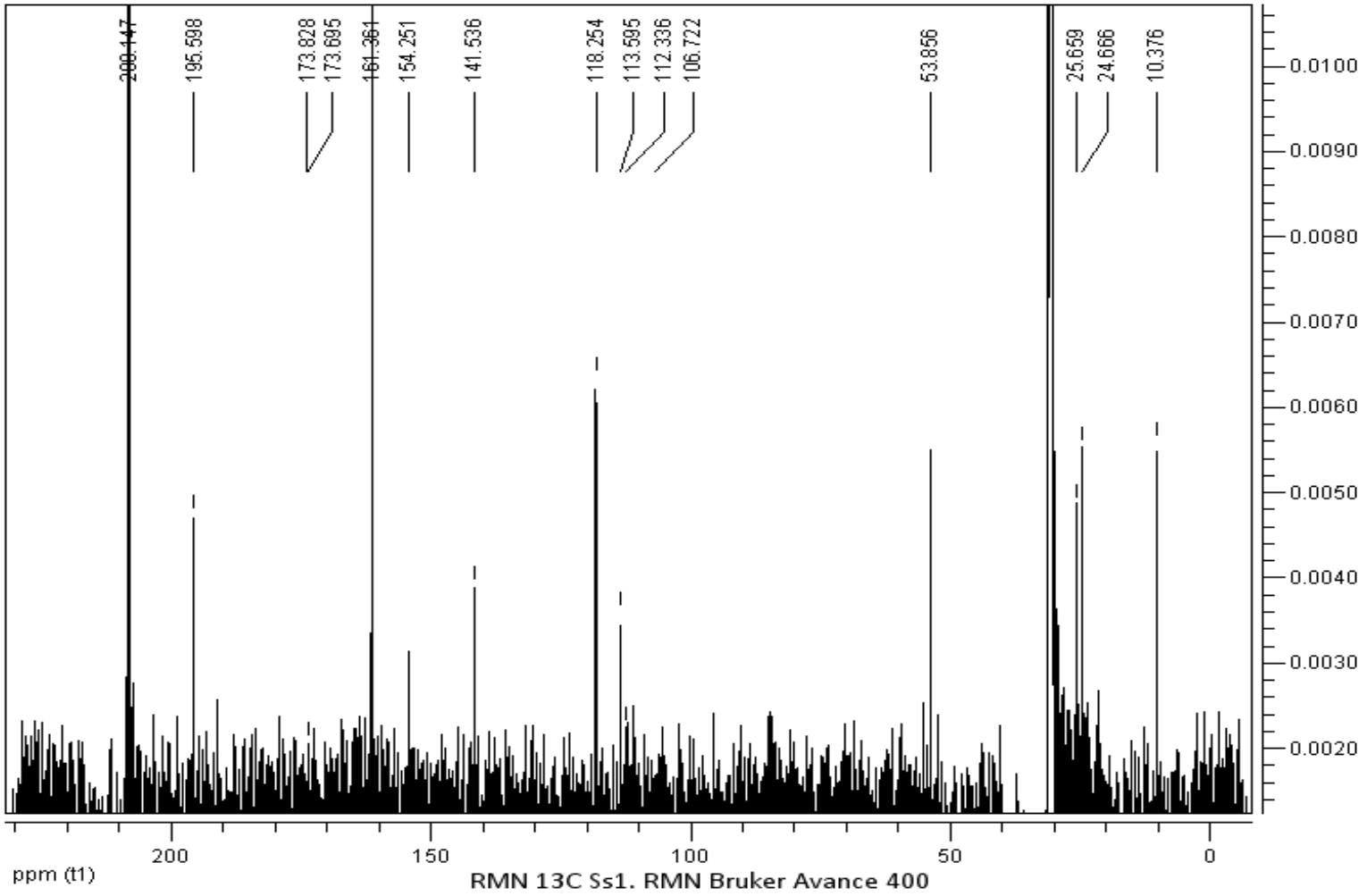
Espectro 4a. Espectro IR, del 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV)



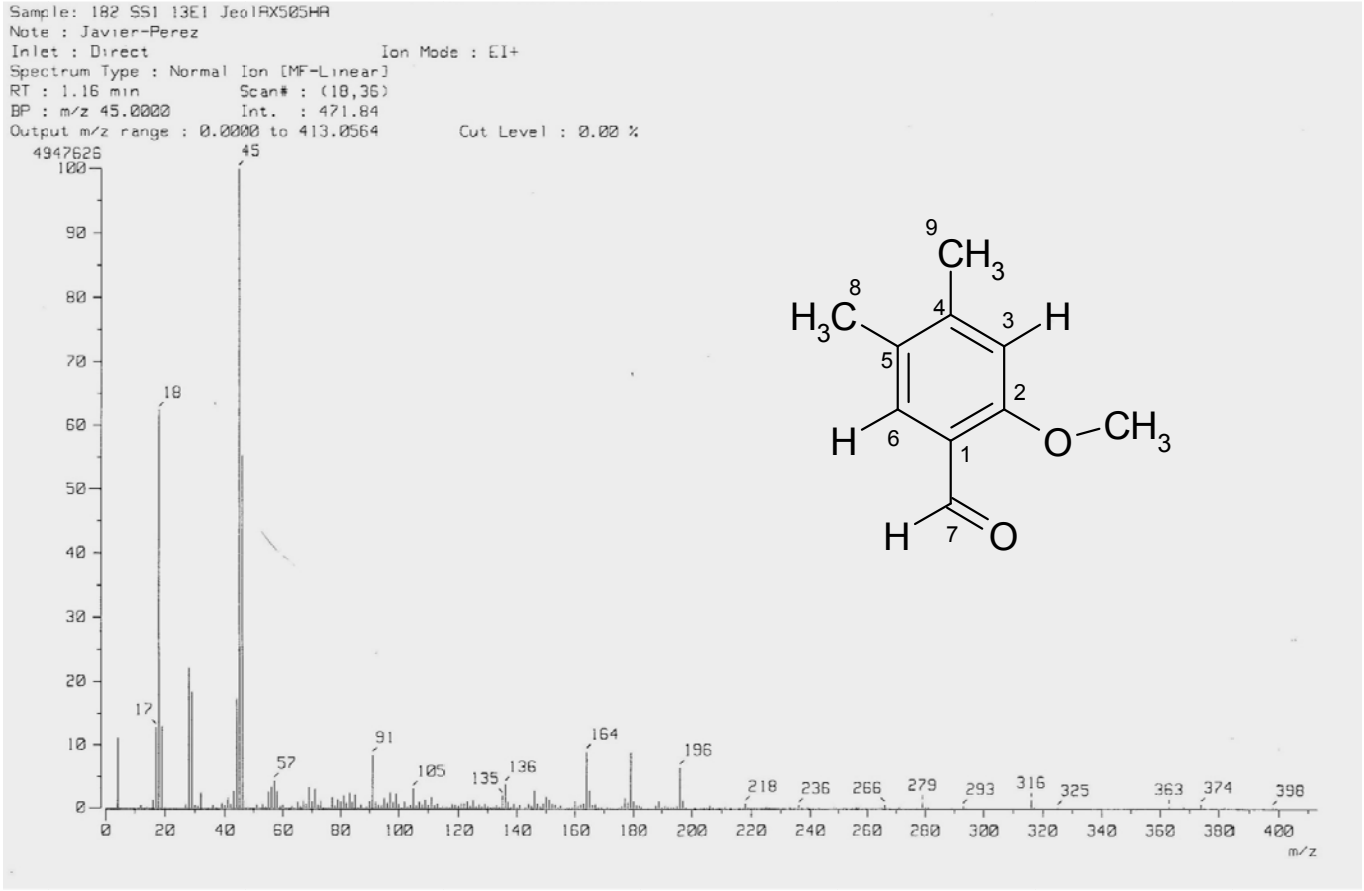
Espectro 4b. Espectro ^{1}H RMN del 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV)



Espectro 4c. Espectro ^{13}C RMN del 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV)

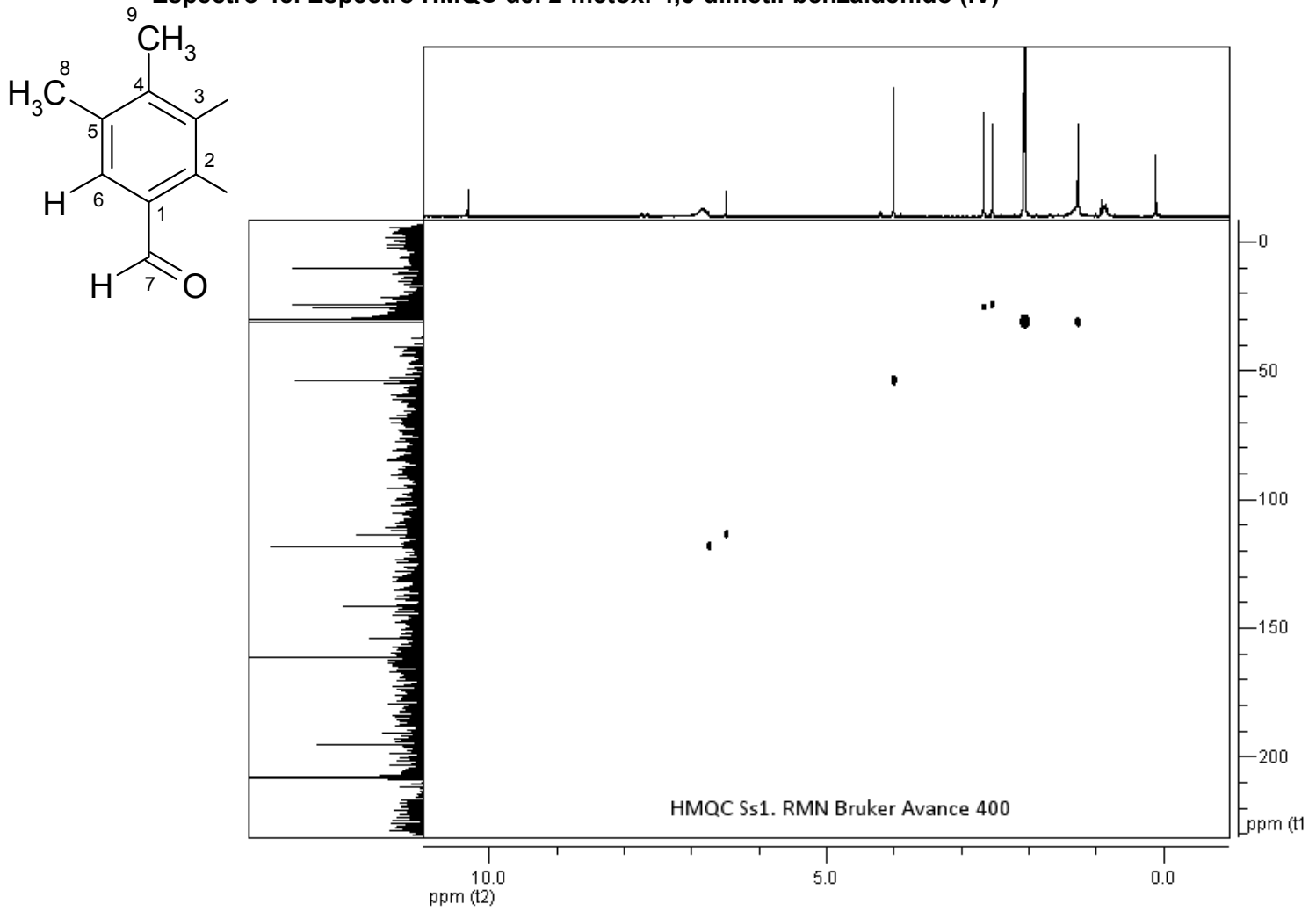


Espectro 4d. Espectro de masas IE, del 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV)

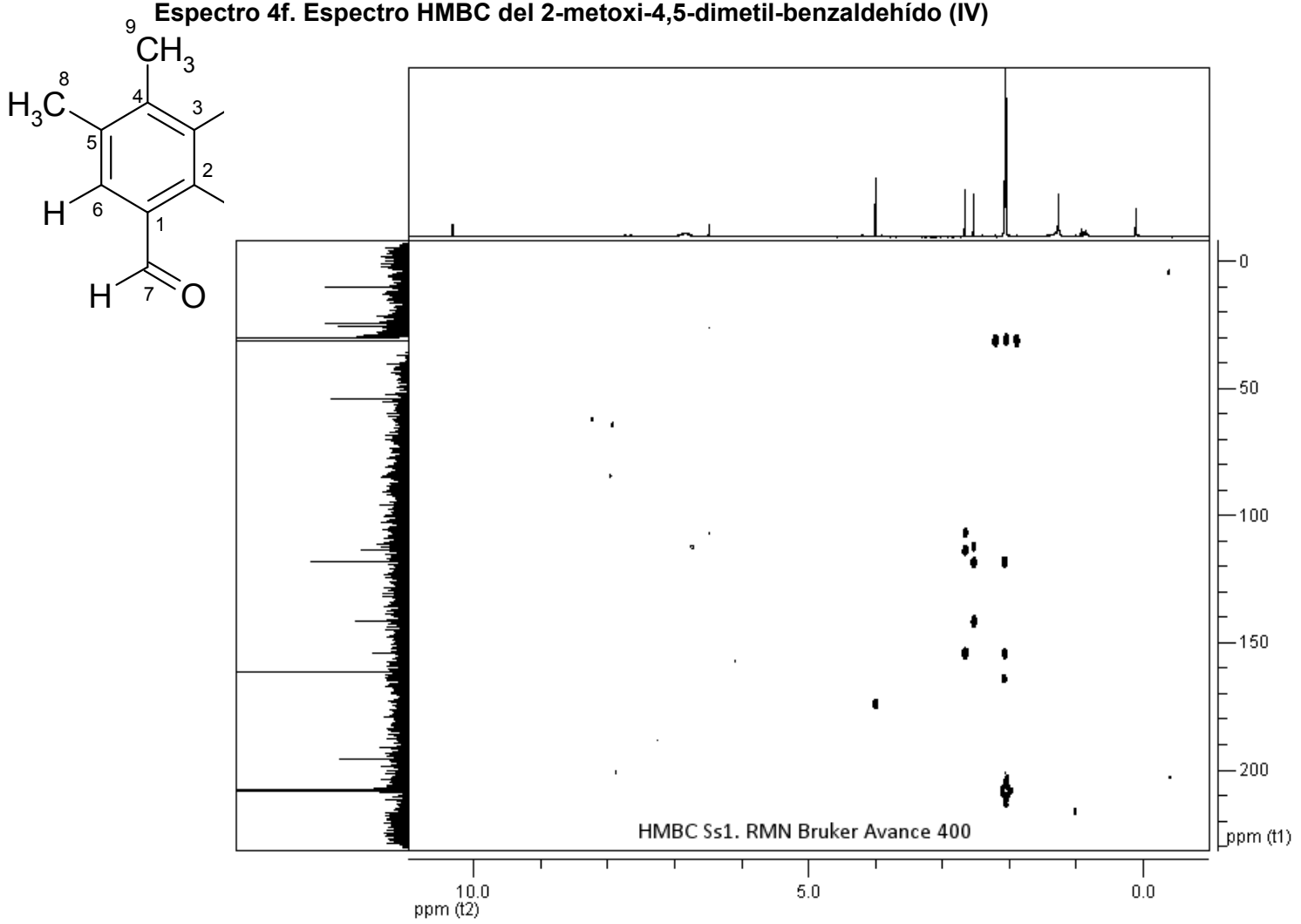


EM-IE compuesto IV. Espectrómetro de masas JEO 1AX505HA.

Espectro 4e. Espectro HMQC del 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV)

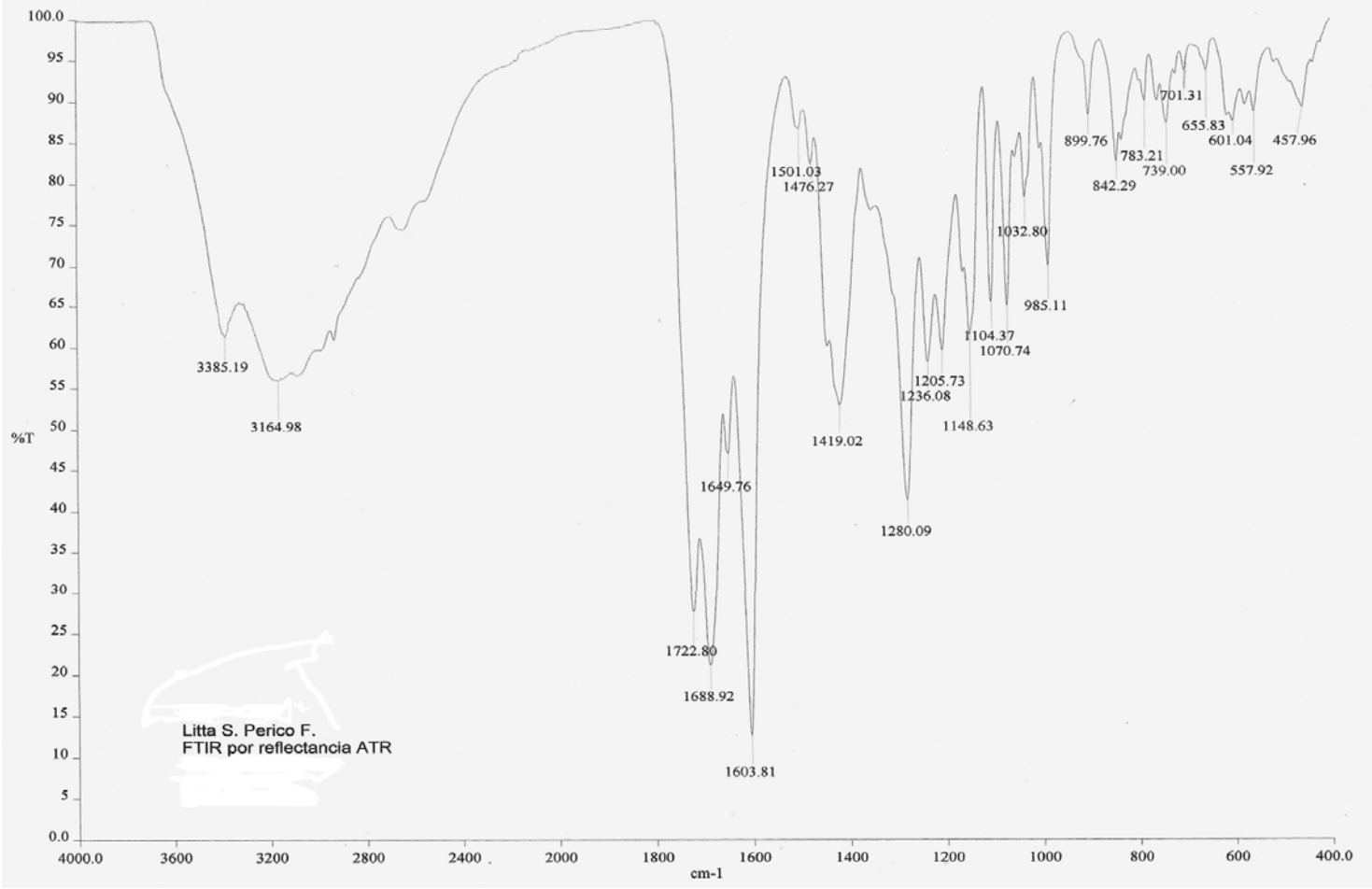


Espectro 4f. Espectro HMBC del 2-metoxi-4,5-dimetil-benzaldehído (IV)

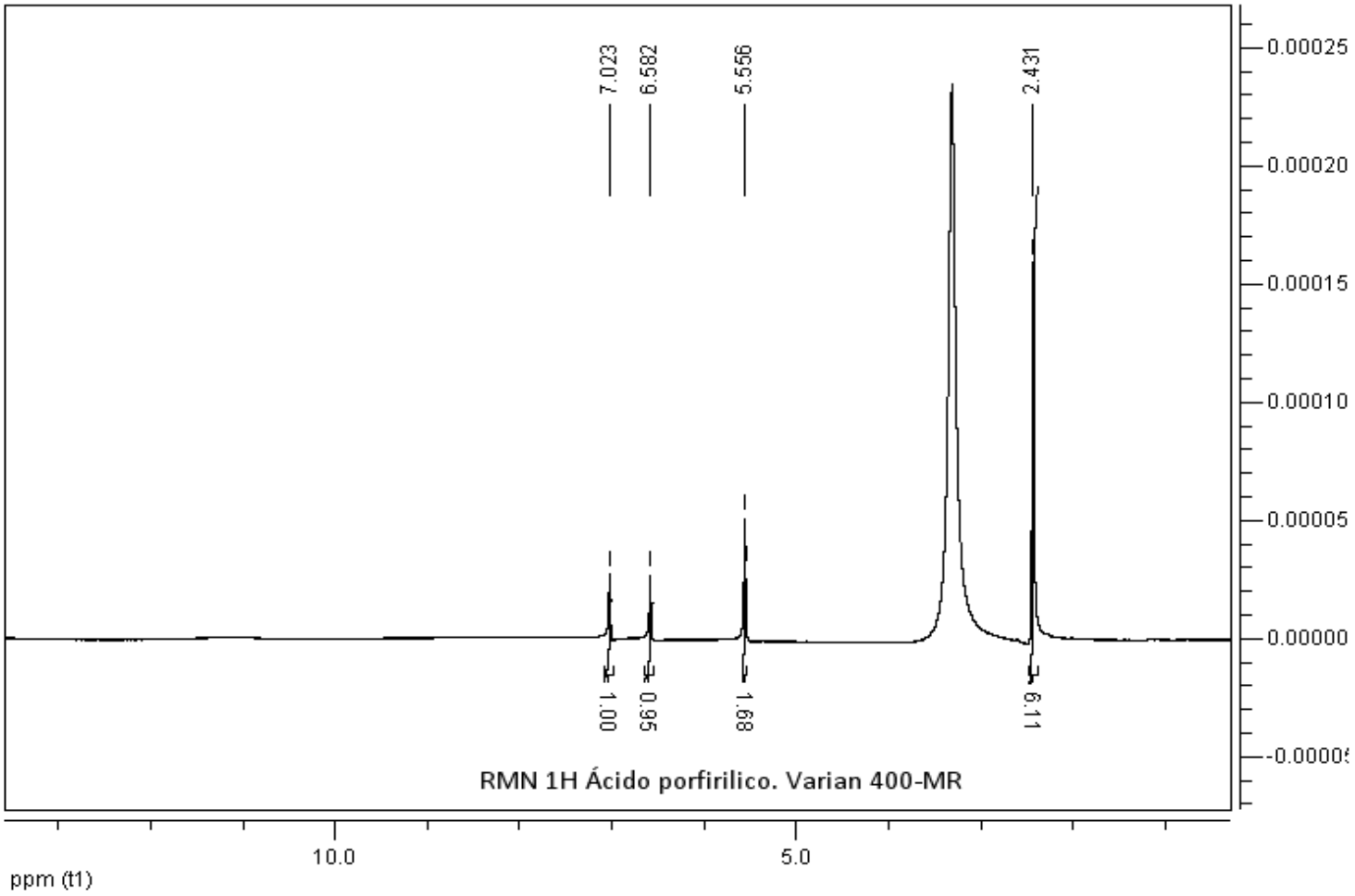


ESPECTROS 5

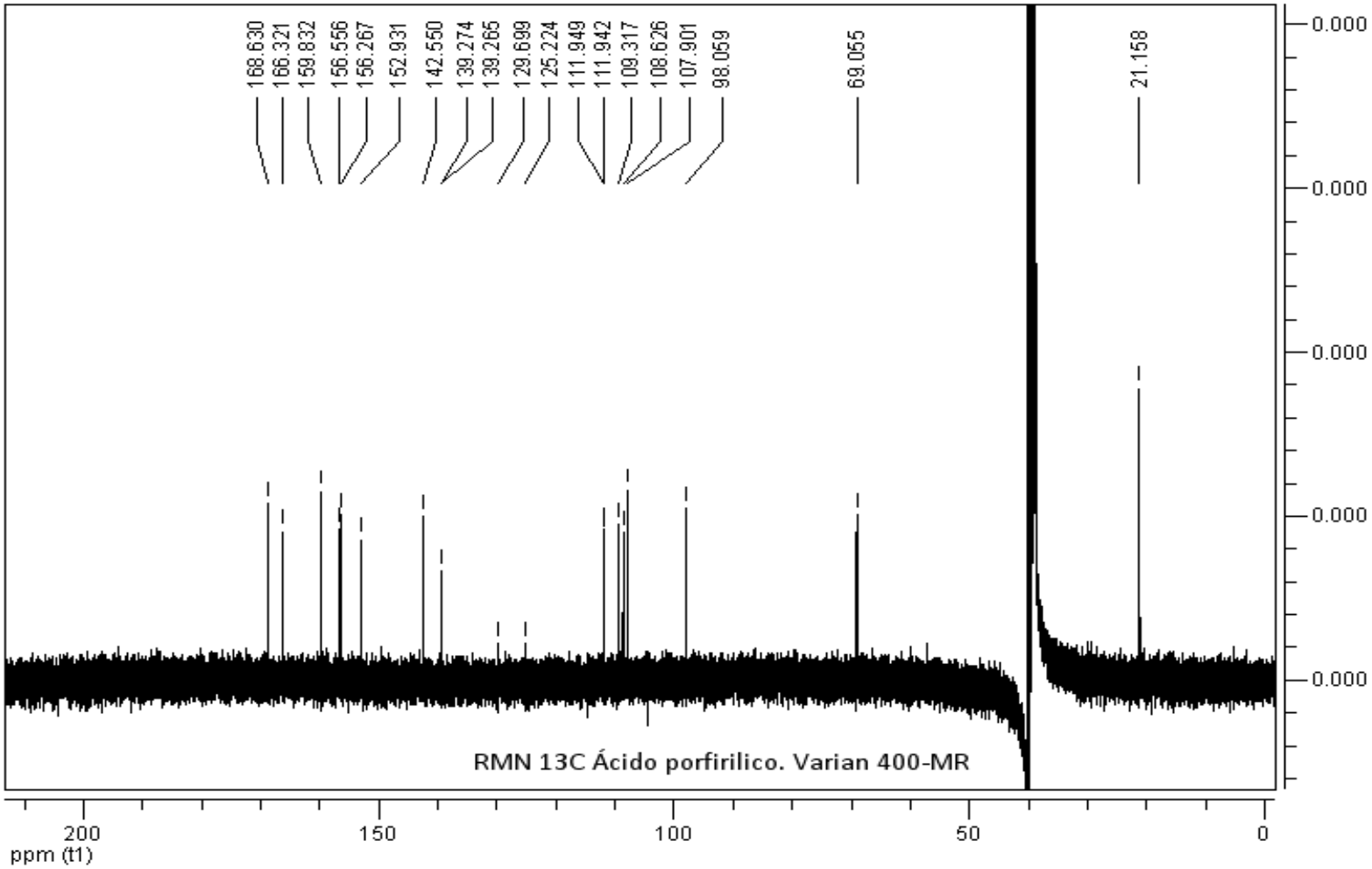
Espectro 5a. Espectro IR, del ácido porfirílico (V)



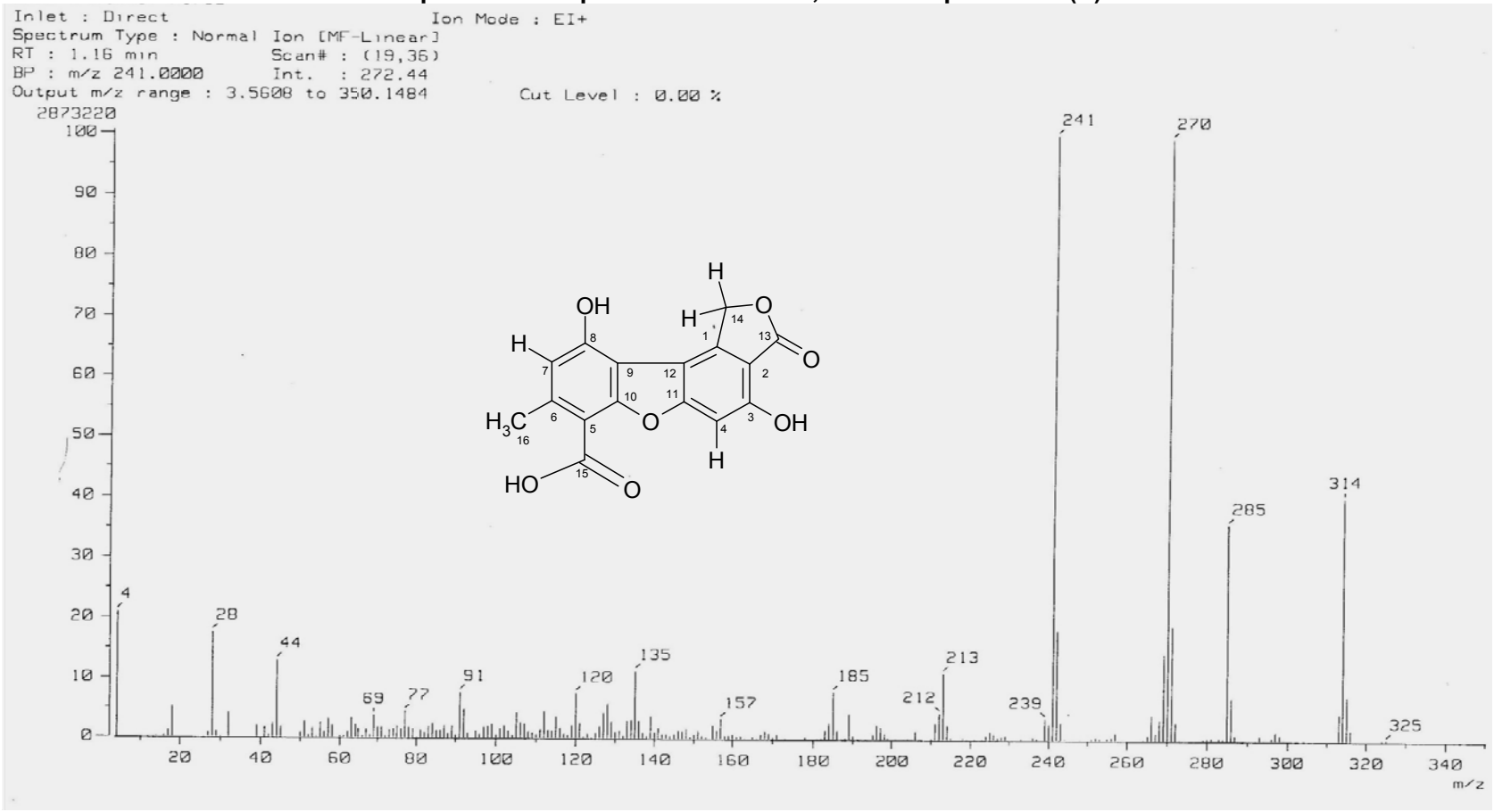
Espectro 5b. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{1}H RMN del ácido porfirílico (V)



Espectro 5c. Espectro ^{13}C RMN del ácido porfirílico (V)

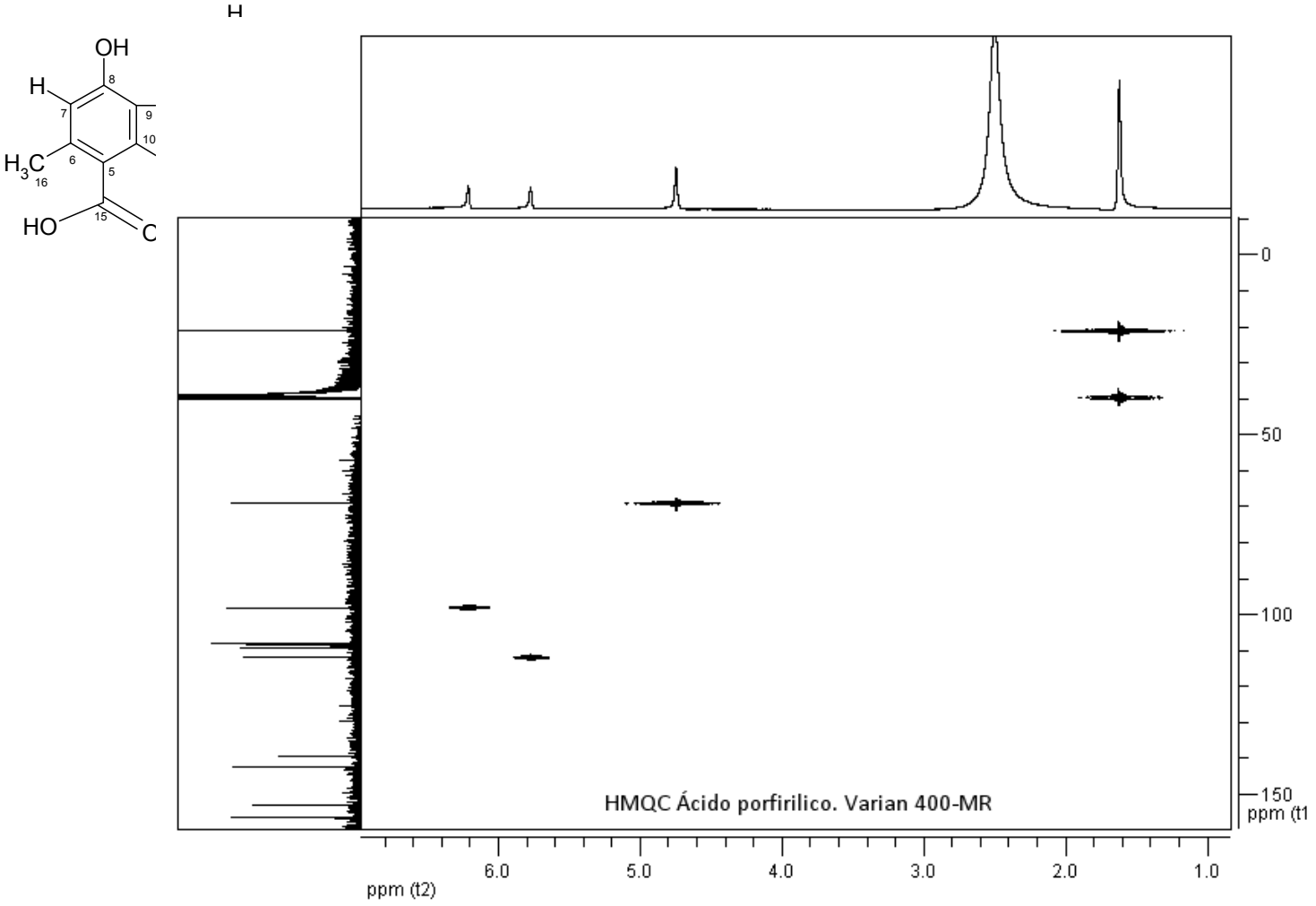


Espectro 5d. Espectro de masas IE, del ácido porfirílico (V)

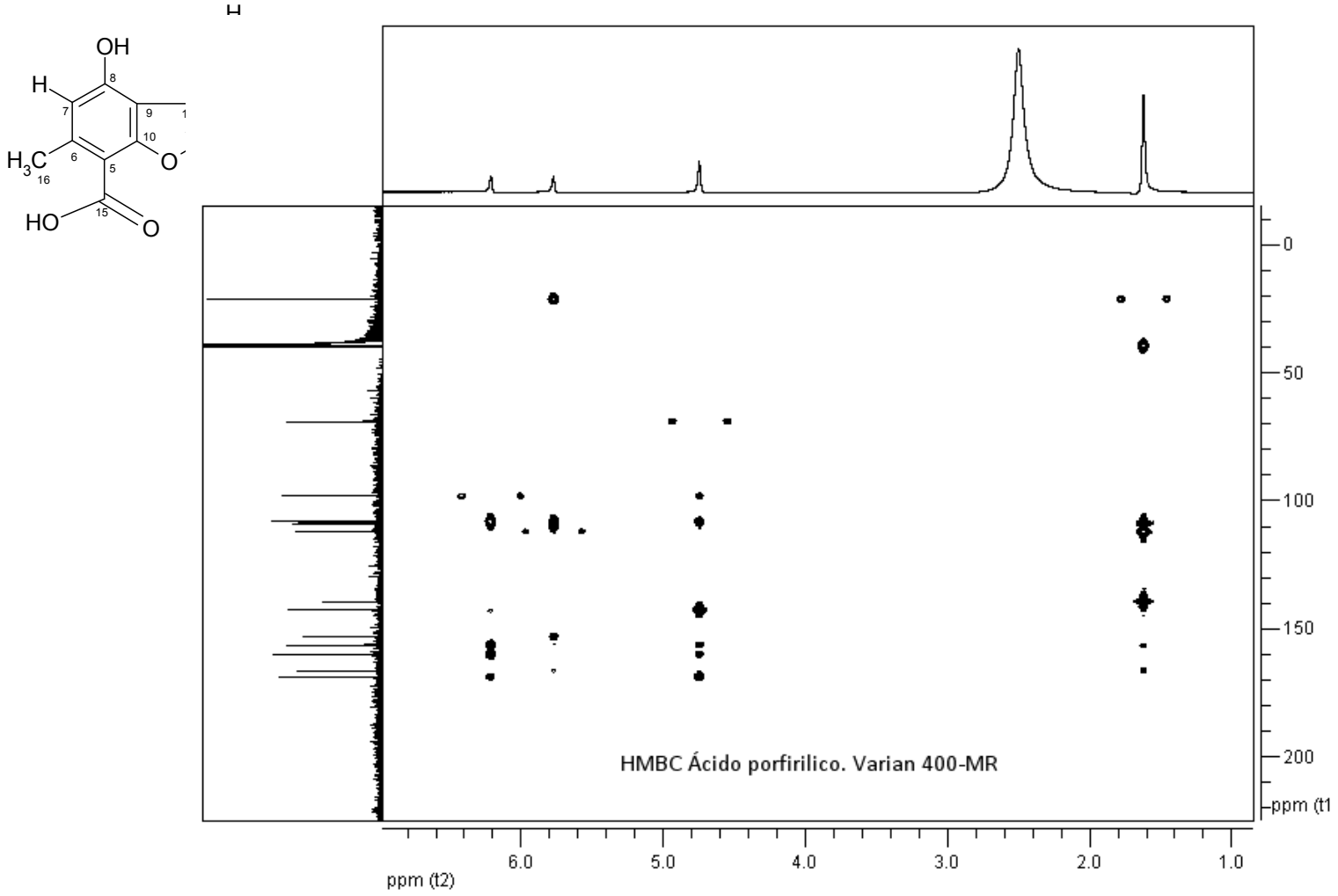


Espectrómetro de masas JEO 1AX505HA.

Espectro 5e. Espectro HMQC del ácido porfirílico (V)

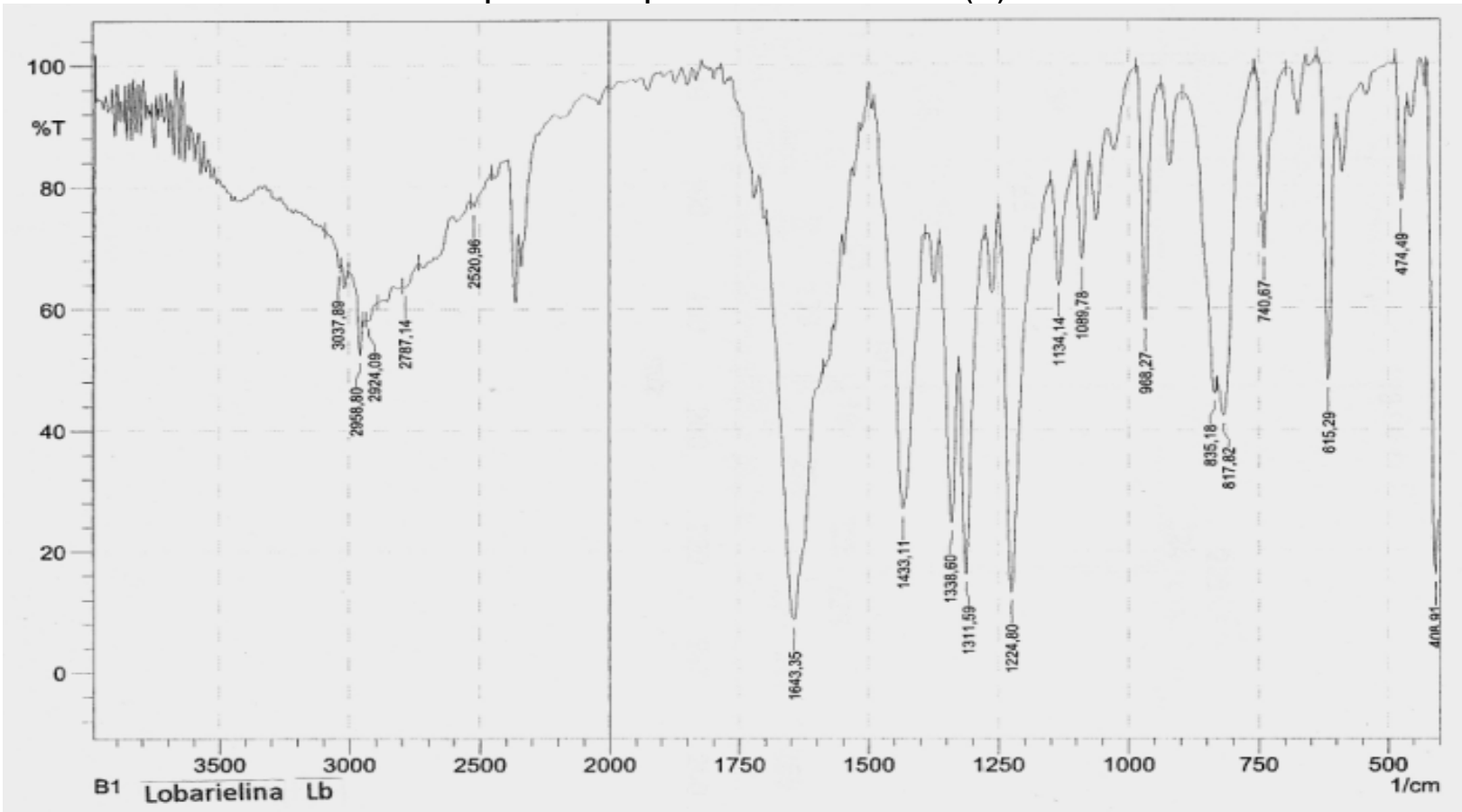


Espectro 5f. Espectro HMBC del ácido porfirílico (V)



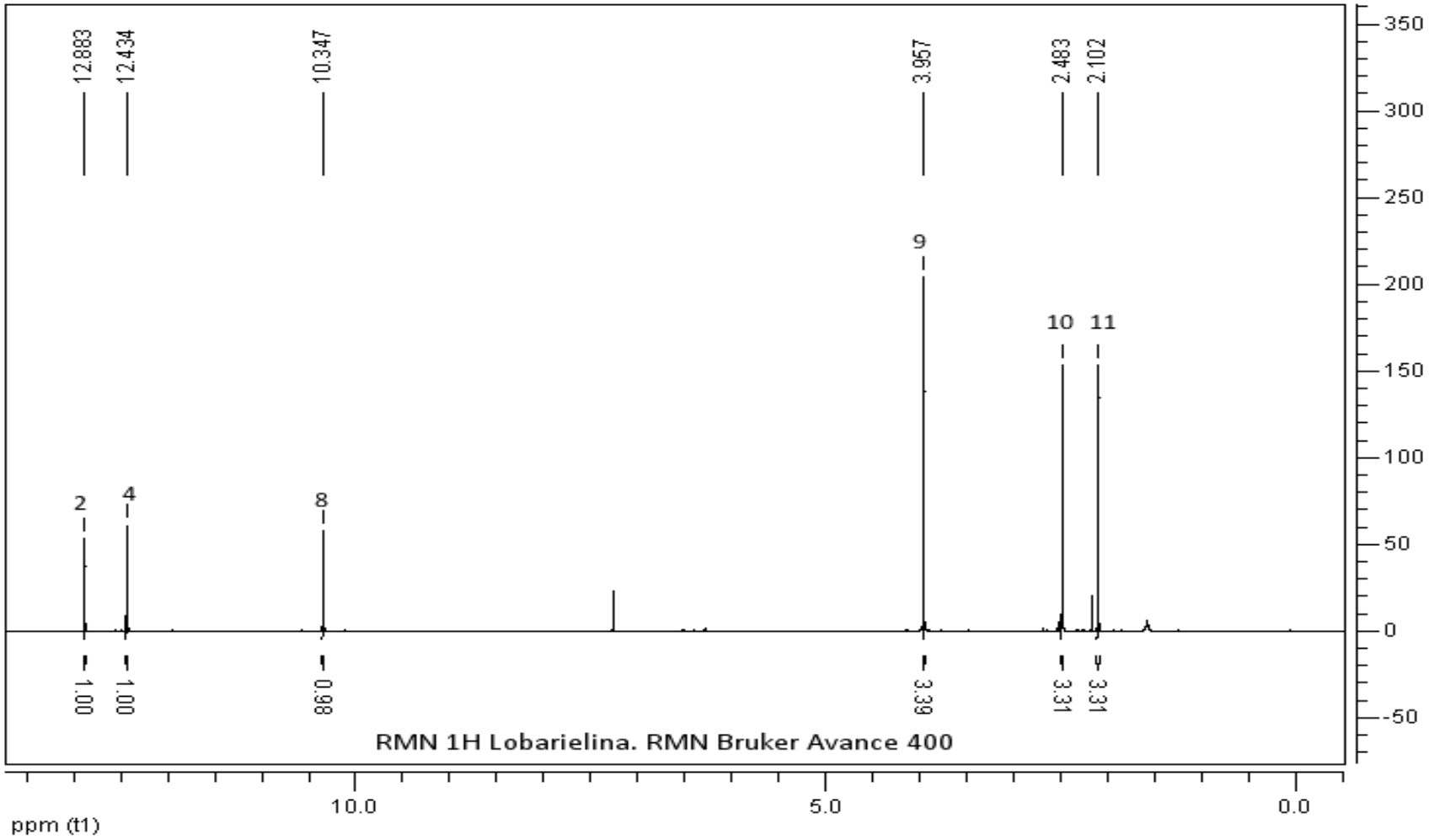
ESPECTROS 6

Espectro 6a. Espectro IR de la lobarielina (VI)

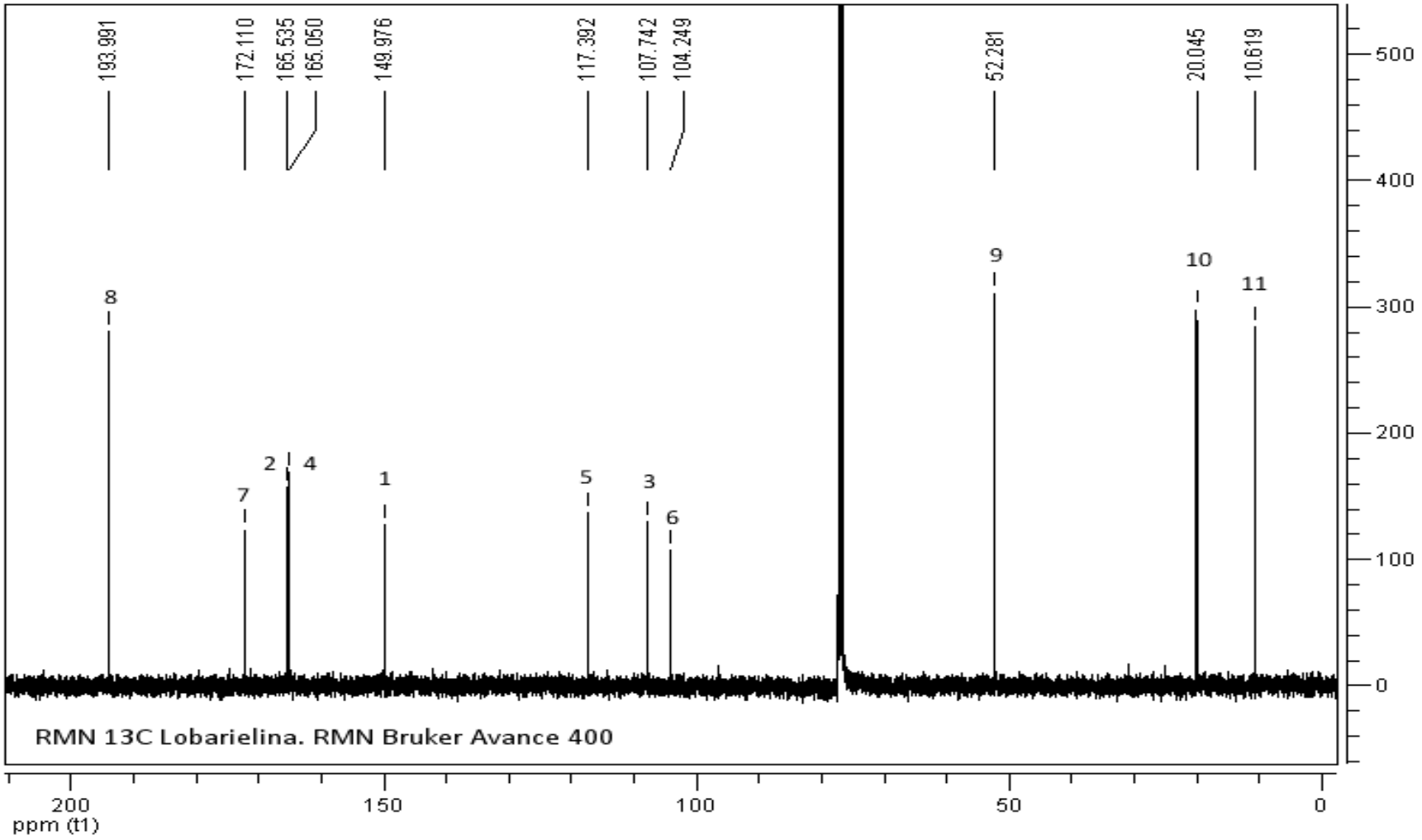


IR Lobarielina. Shimadzu IR Prestige 21

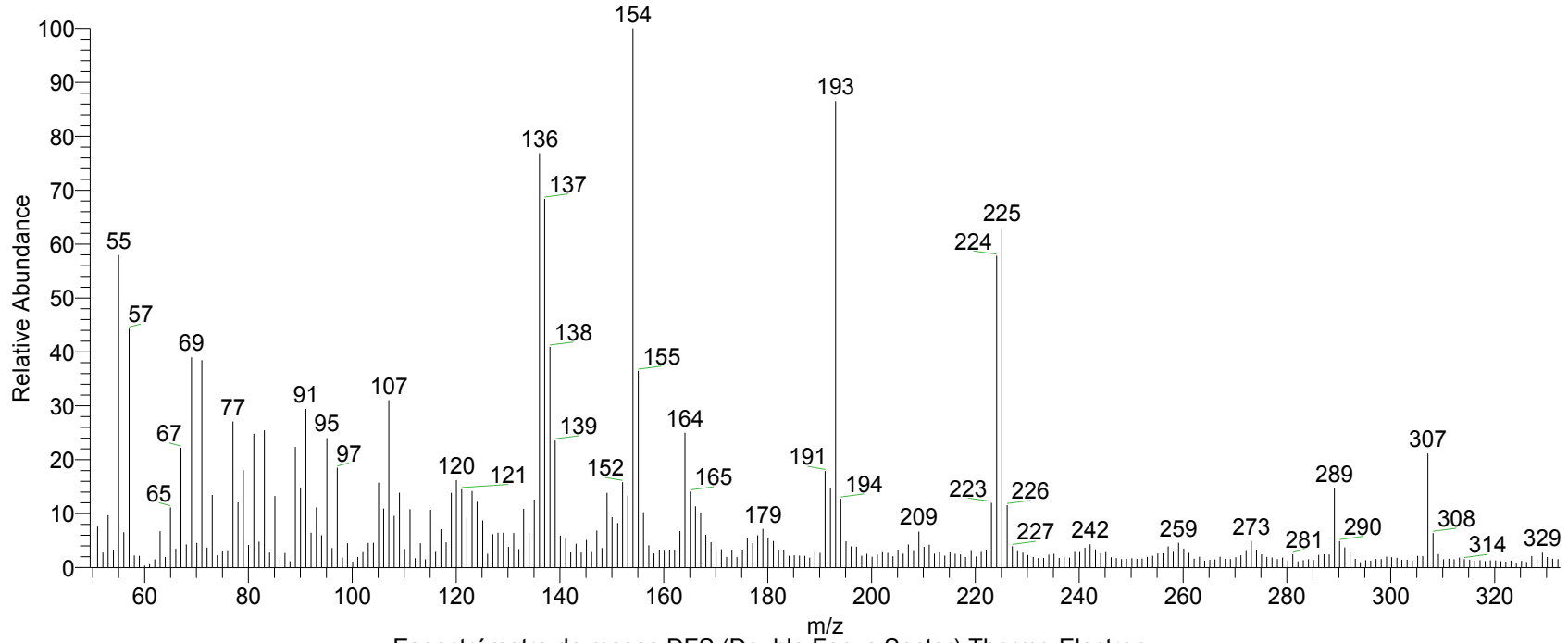
Espectro 6b. Espectro ^{1}H RMN de la lobarielina (VI)



Espectro 6c. Espectro ^{13}C RMN de la lobarielina (VI)

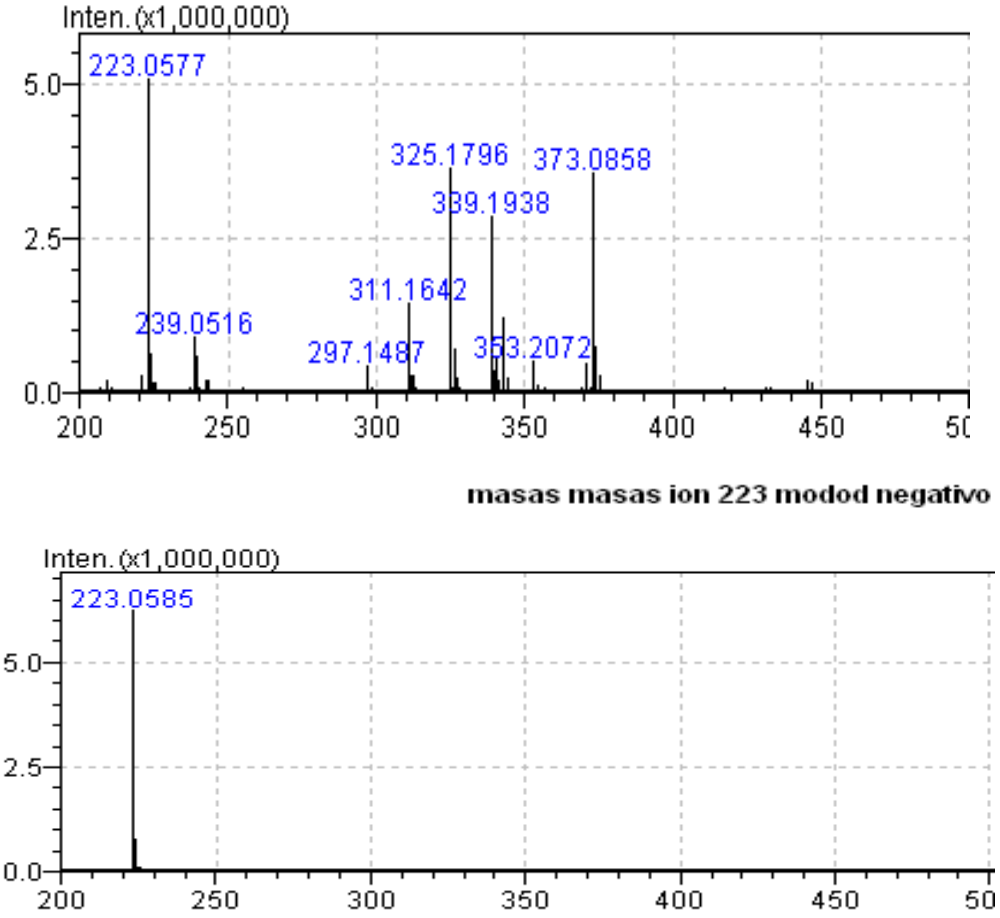


Espectro 6d. Espectro de masas FAB, de la Lobarielina (VI)



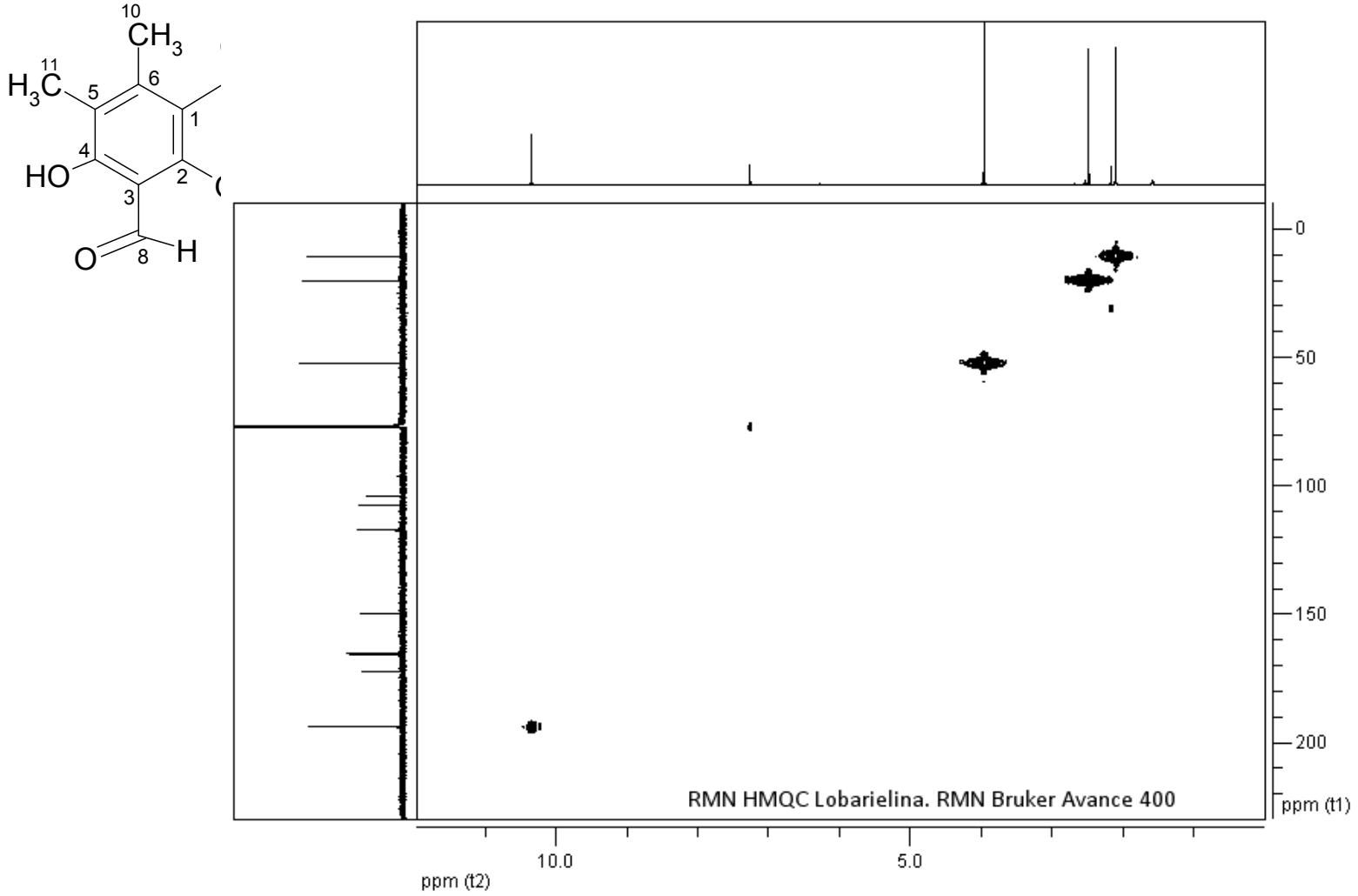
Espectrómetro de masas DFS (Double Focus Sector) Thermo-Electron.

Espectro 6e. Espectro de masas de alta resolución (HRESI), de la Lobarielina (VI)

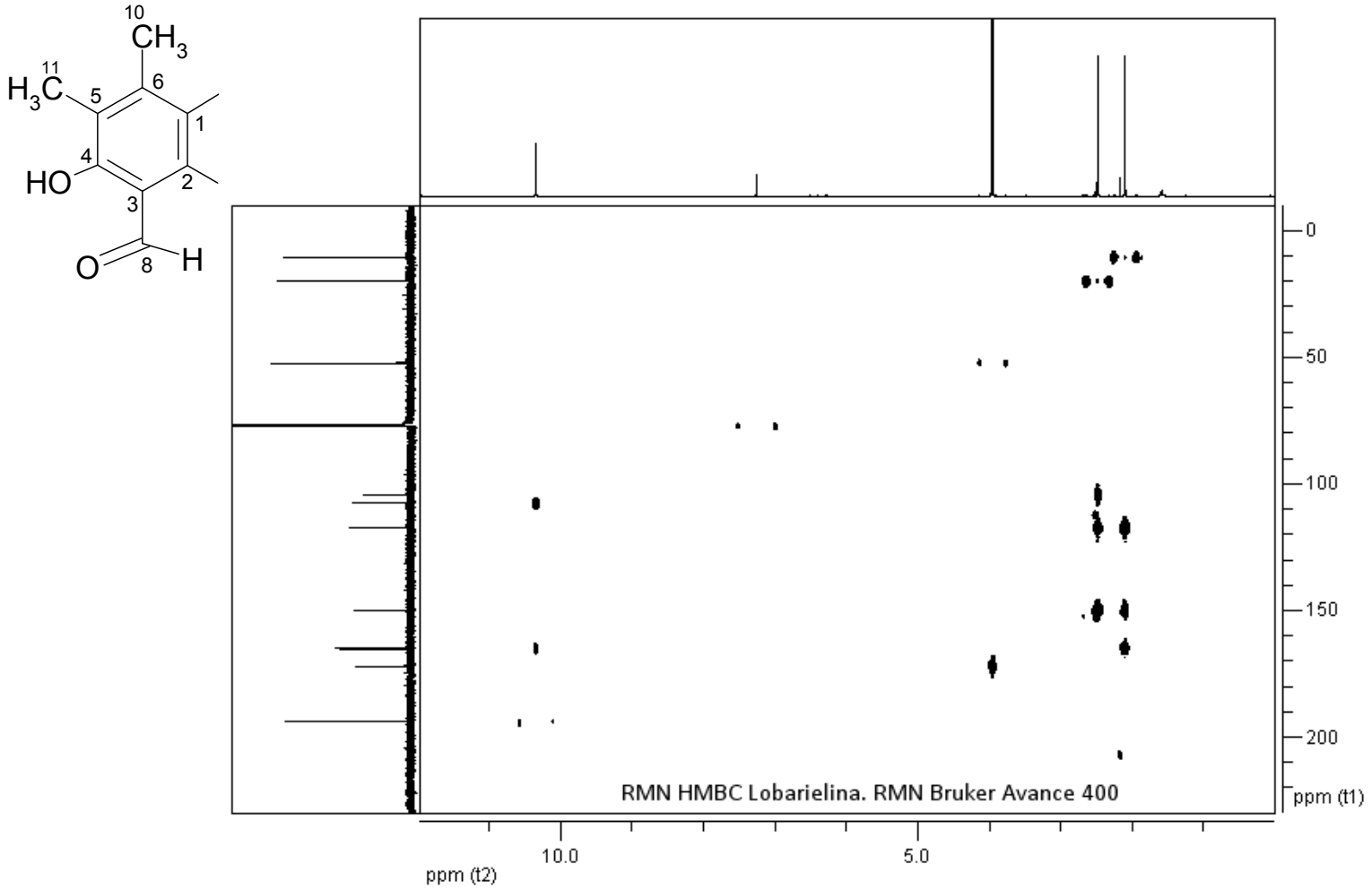


Espectro de masas por electrospray (ESI) de alta resolución. Espectrómetro Shimadzu LCMS-IT-TOF

Espectro 6f. Espectro HMQC de la lobarielina (VI)

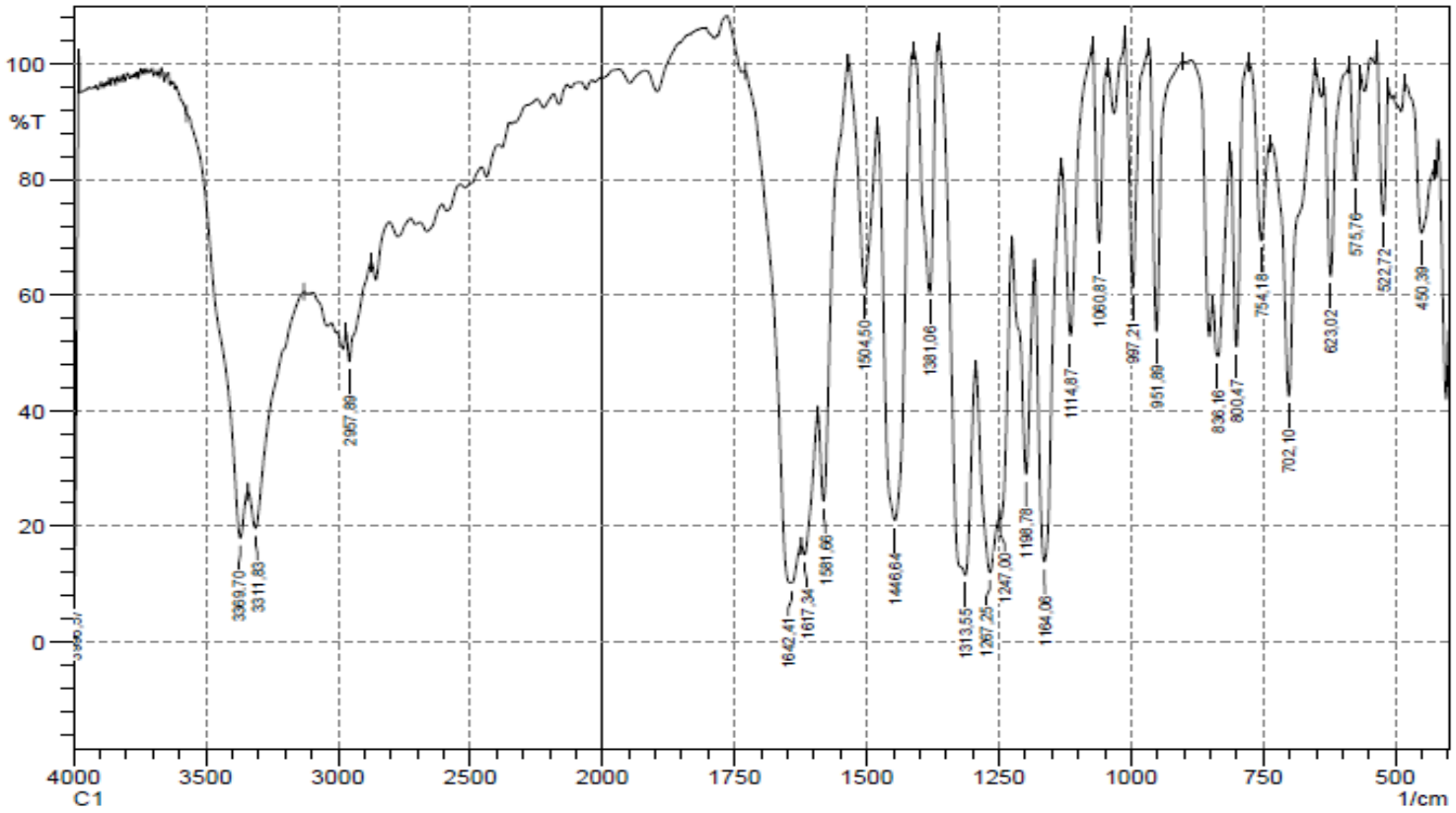


Espectro 6g. Espectro HMBC de de la Lobarielina (VI)



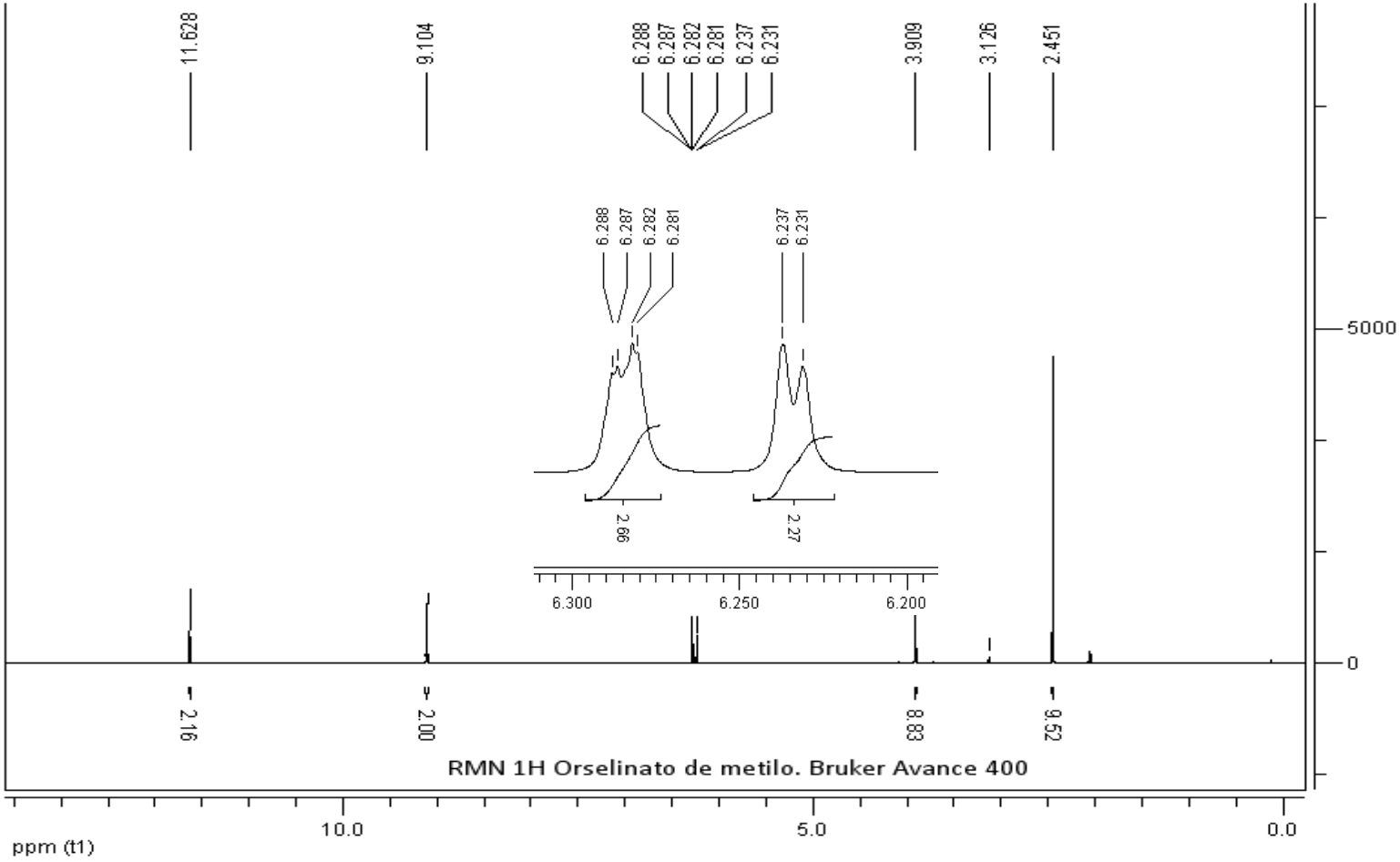
ESPECTROS 7

Espectro 7a. Espectro IR, del orselinato de metilo (VII)

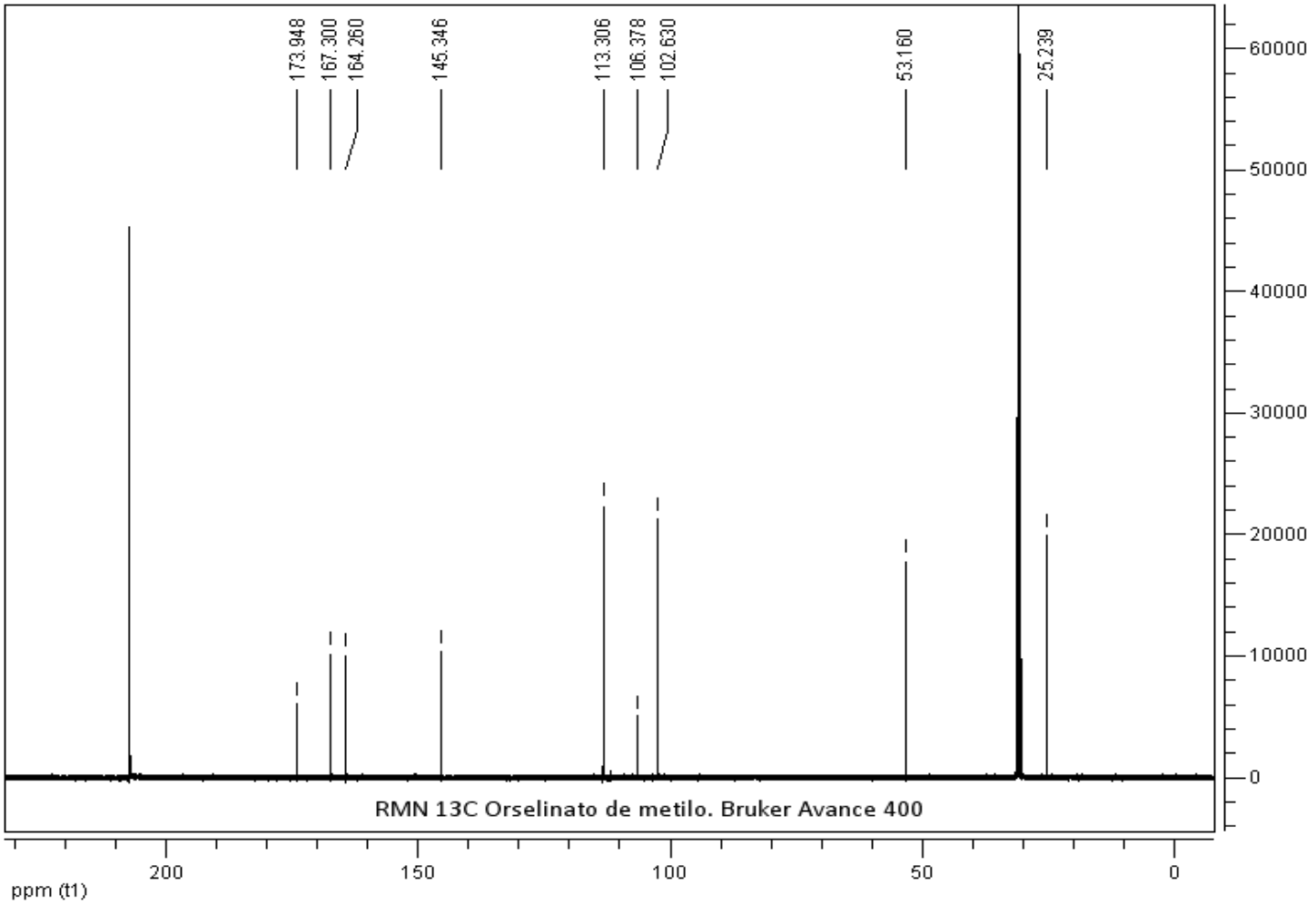


Shimadzu IR Prestige 21

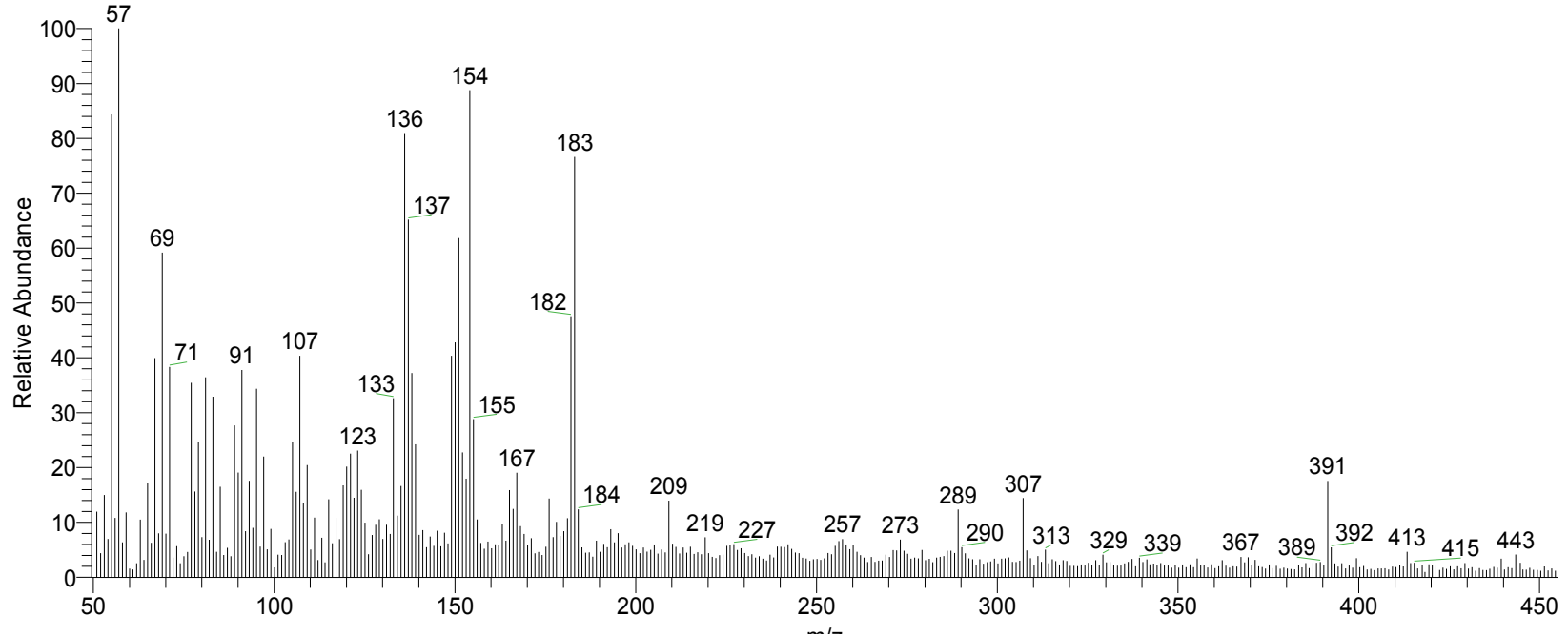
Espectro 7b. Espectro de ^{1}H RMN del orselinato de metilo (VII)



Espectro 7c. Espectro ^{13}C RMN del orselinato de metilo (VII)

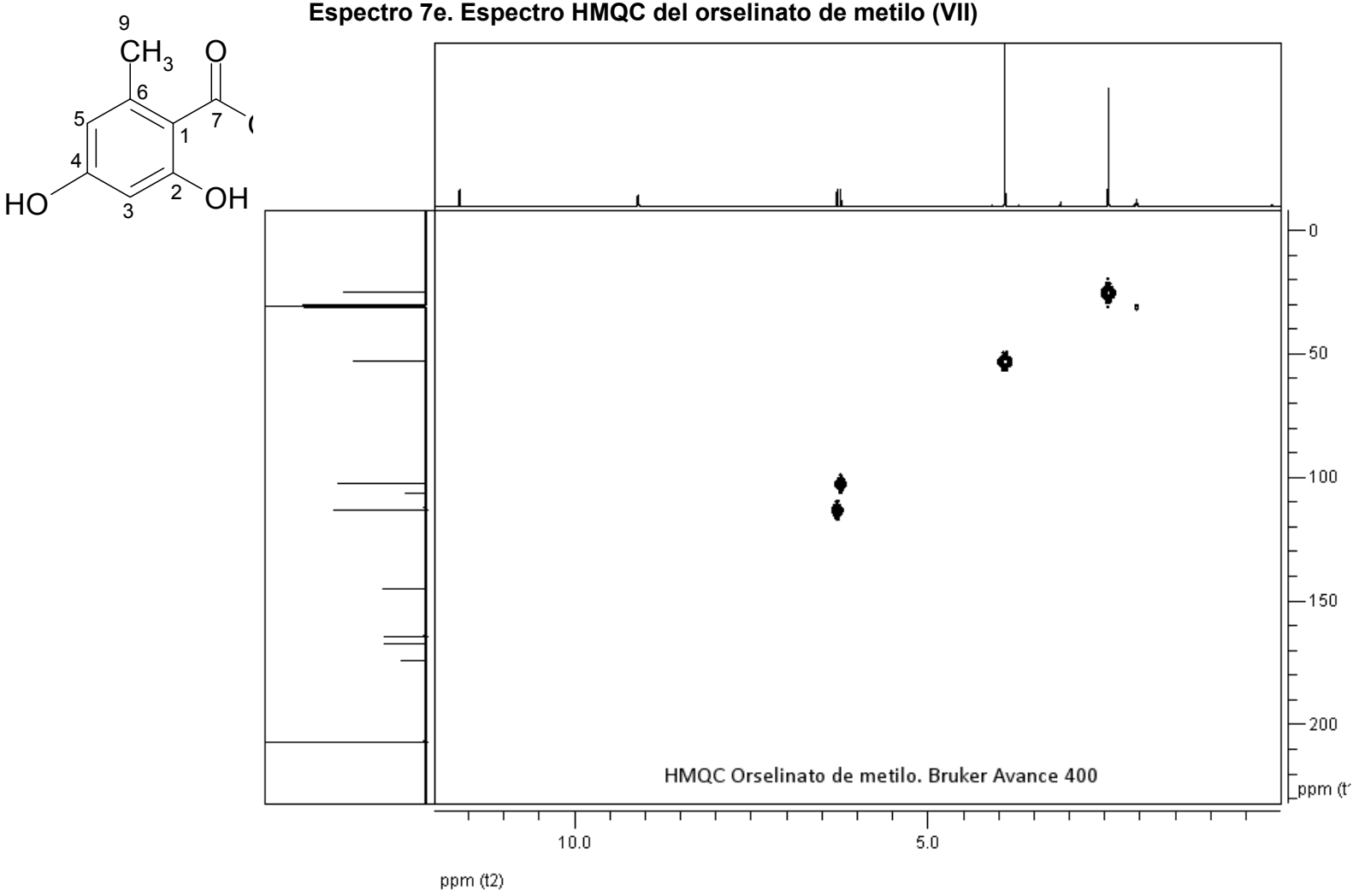


Espectro 7d. Espectro de masas FAB, del orselinato de metilo (VII)

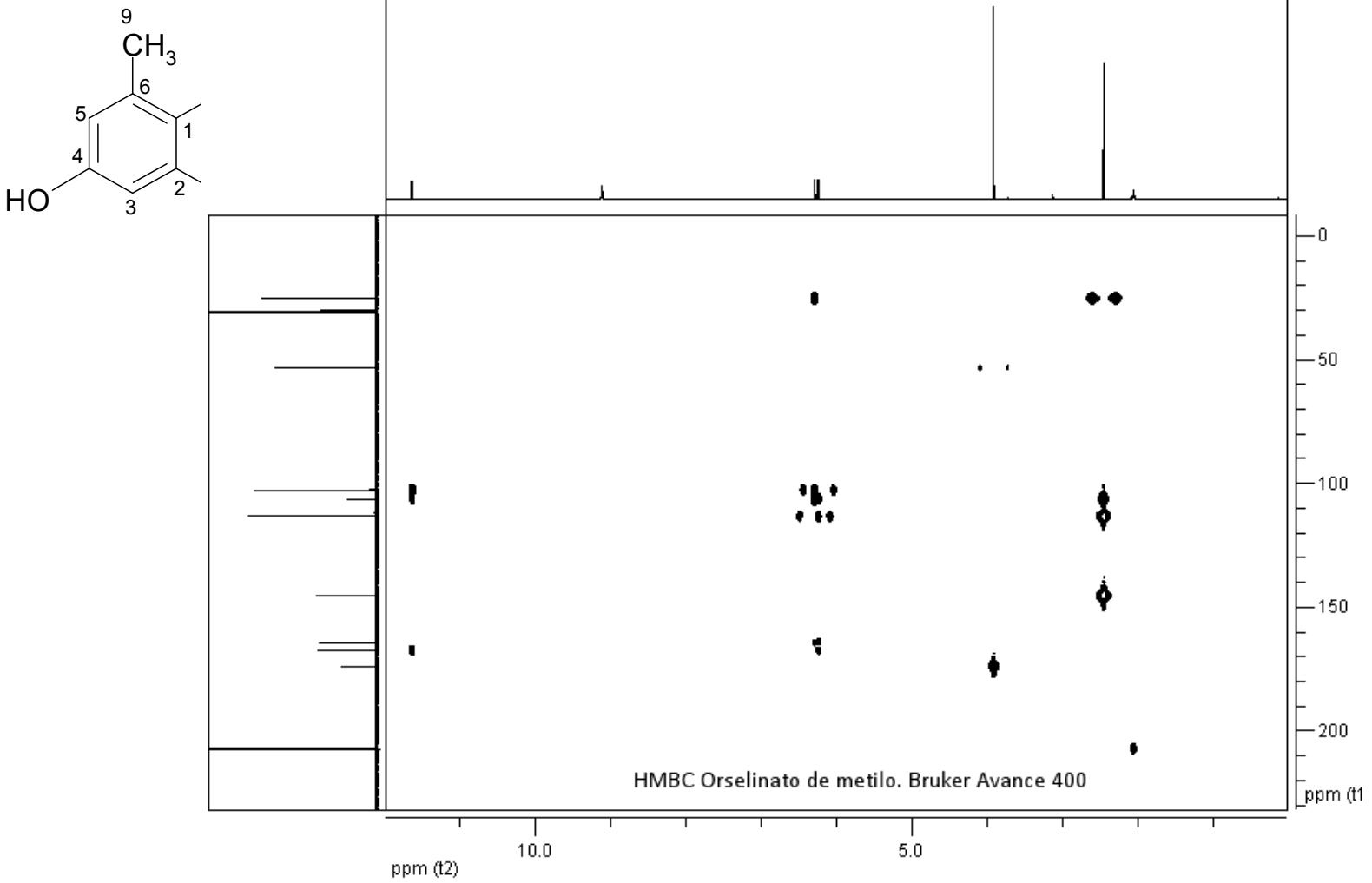


EM-FAB Orselinato de metilo. Espectrómetro de masas DFS (Double Focus Sector) Thermo-Electron

Espectro 7e. Espectro HMQC del orselinato de metilo (VII)

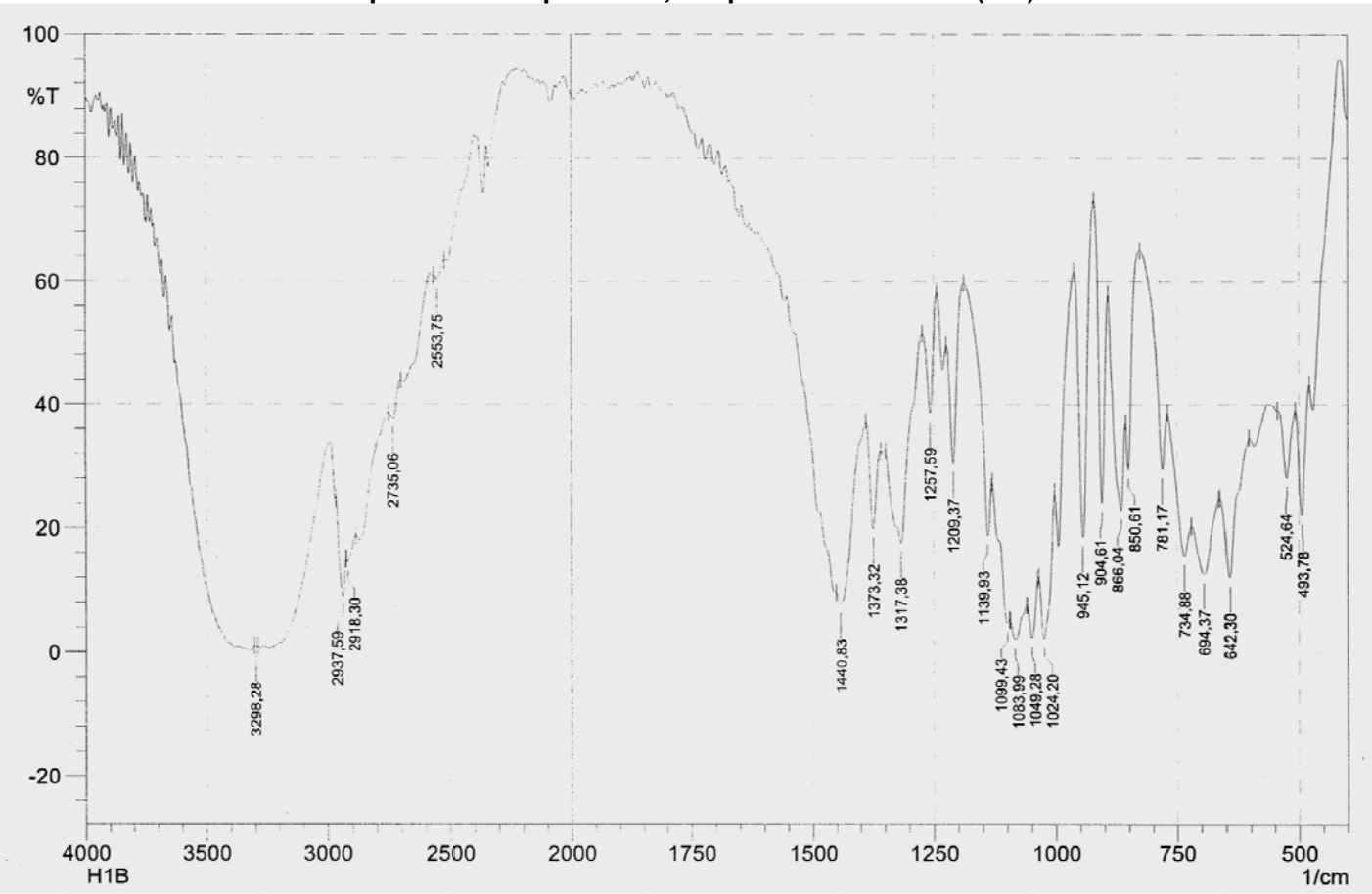


Espectro 7f. Espectro HMBC del orselinato de metilo (VII)



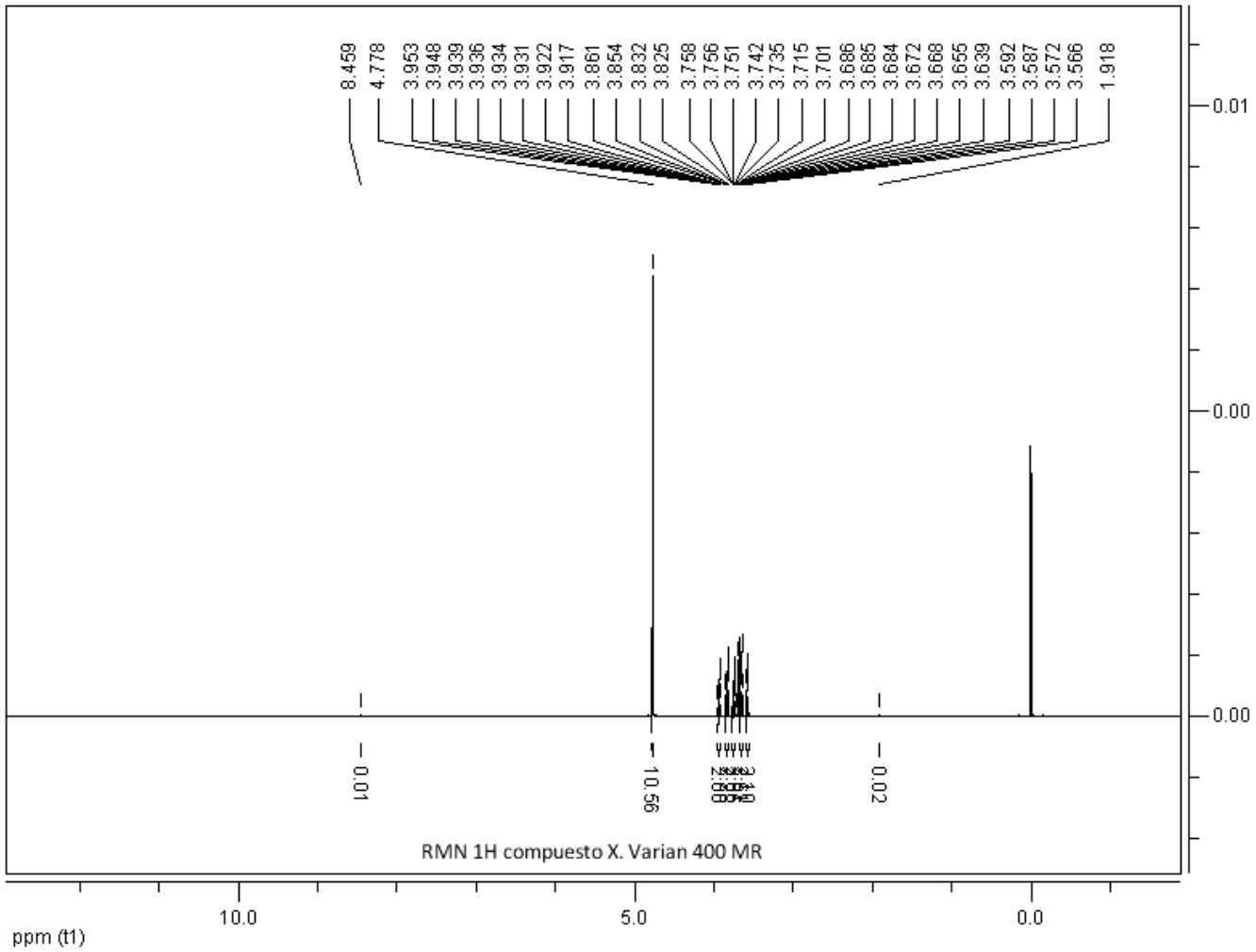
ESPECTROS 8

Espectro 8a. Espectro IR, del polihidroxialcohol (VIII)

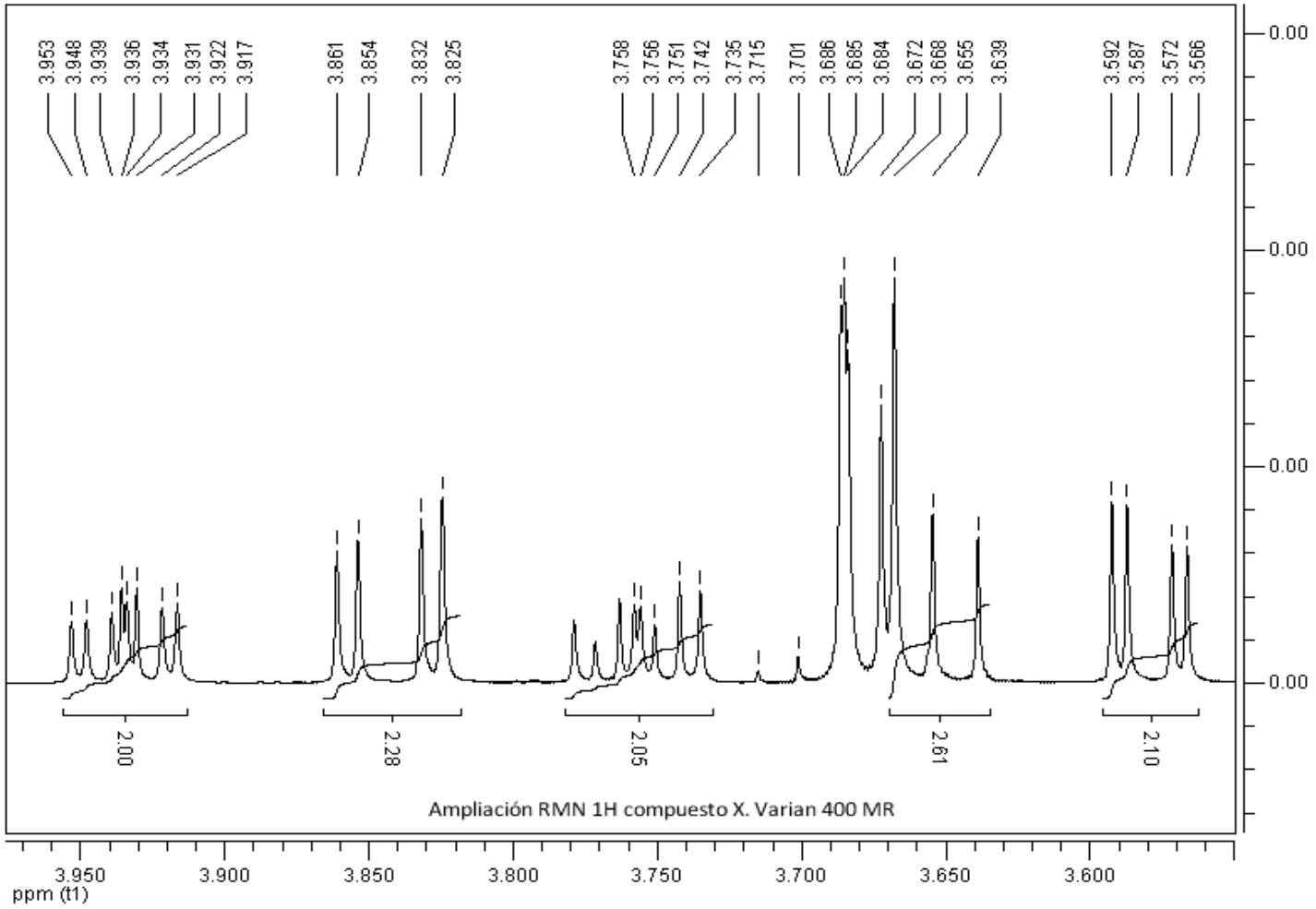


Shimadzu IR Prestige 21

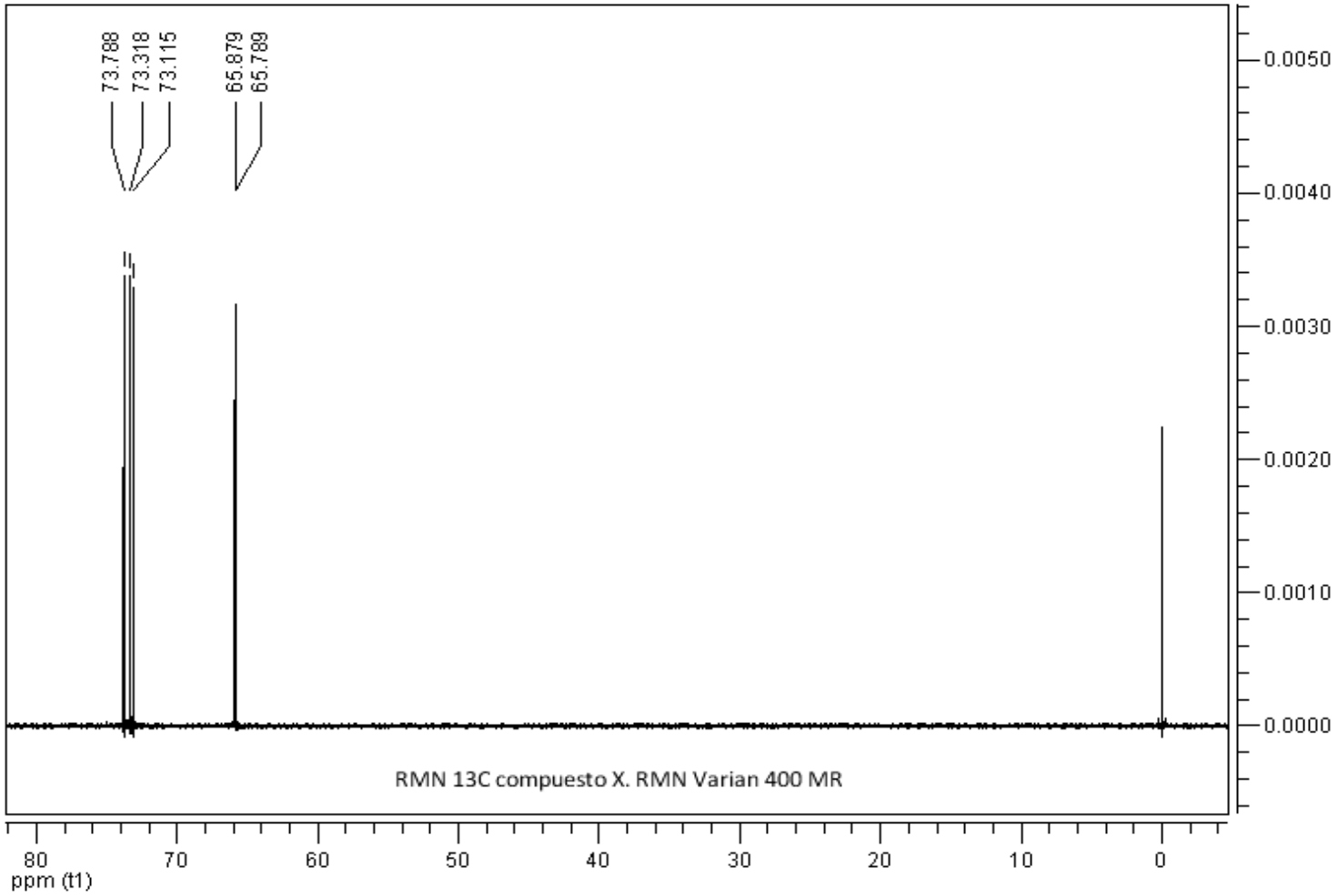
Espectro 8b. Espectro de ^{1}H RMN del polihidroxialcohol (VIII)



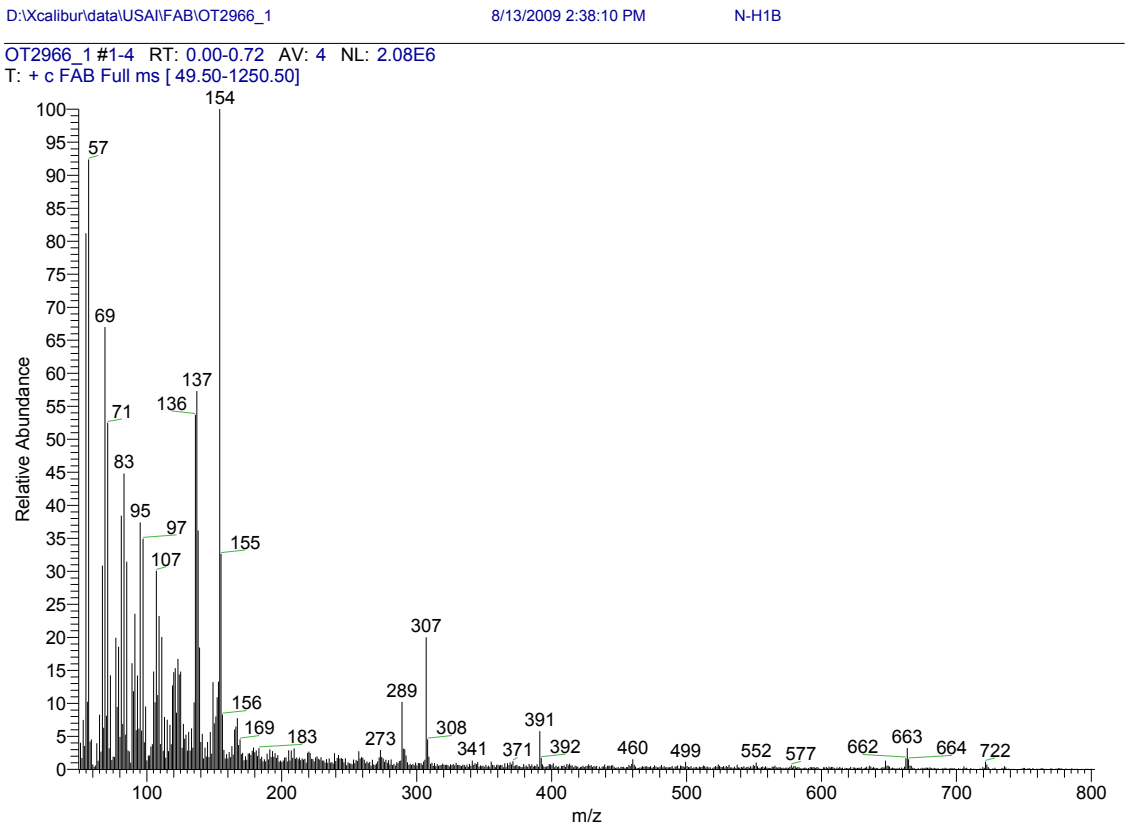
Espectro 8b. Espectro ^{1}H RMN del polihidroxialcohol (VIII) (ampliación)



Espectro 8c. Espectro ^{13}C RMN del polihidroxialcohol (VIII)

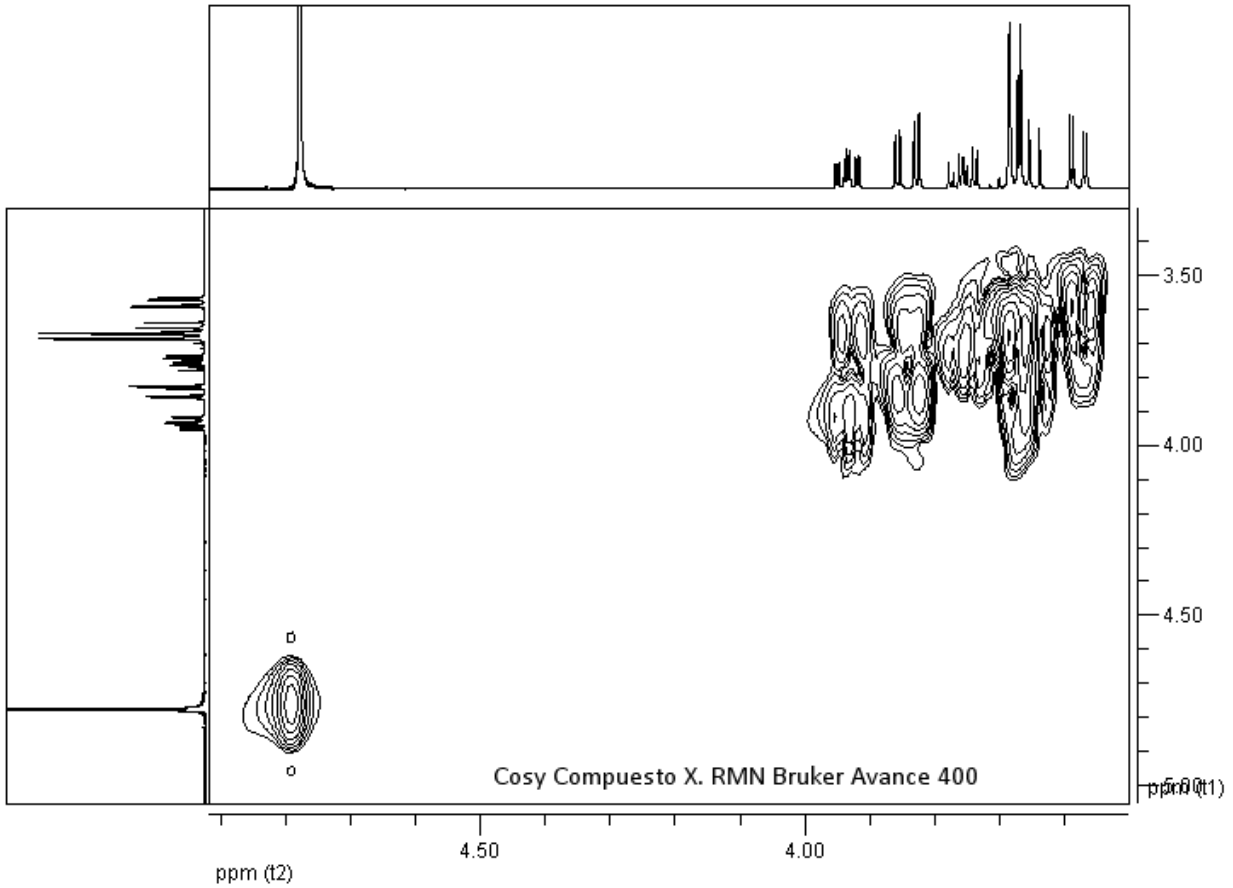


Espectro 8d. Espectro de masas FAB, del polihidroxialcohol (VIII) (VIII)

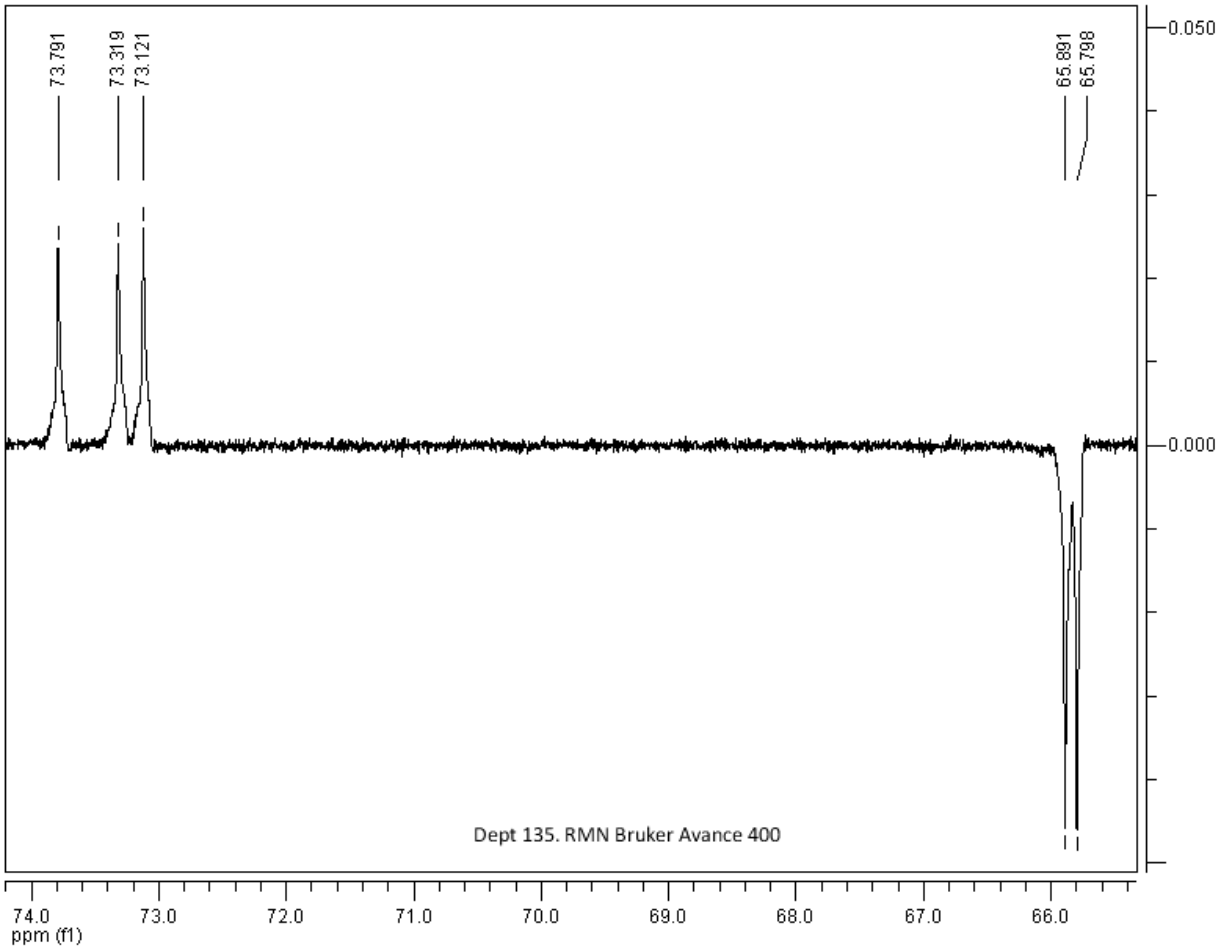


Espectrómetro de masas DFS (Double Focus Sector) Thermo-Electron.

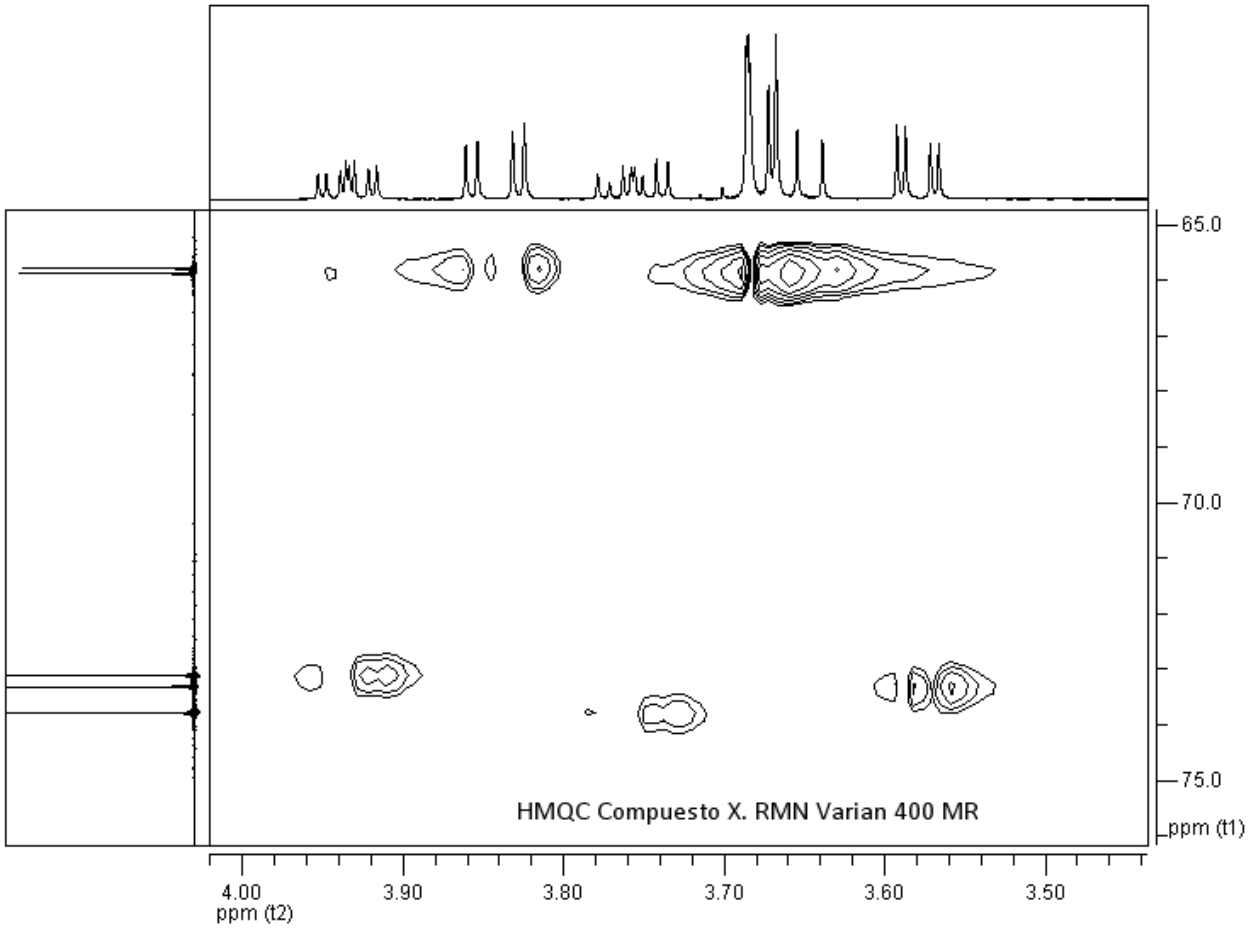
Espectro 8e. COSY del del polihidroxialcohol (VIII)



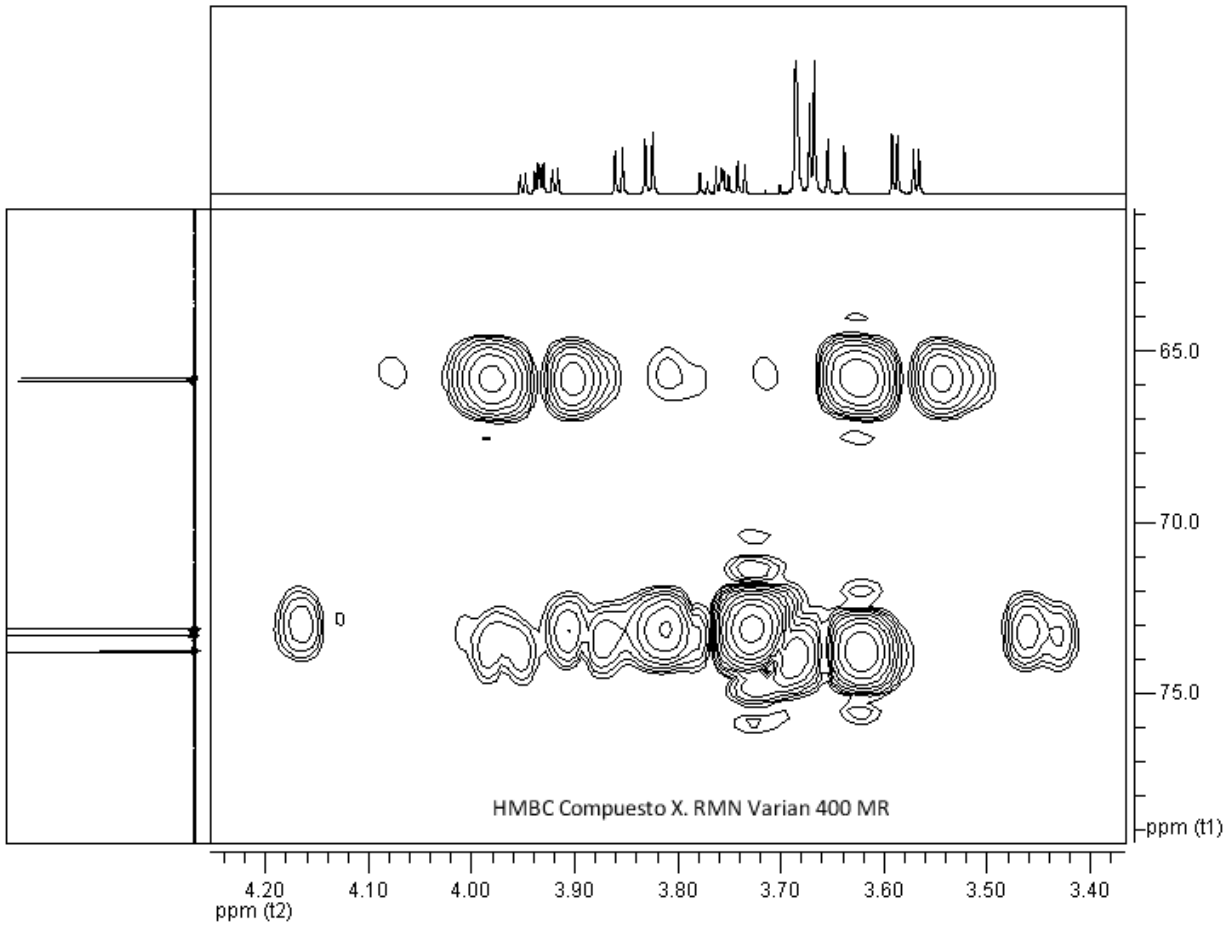
Espectro 8f. DEPT 135 del del polihidroxialcohol (VIII)



Espectro 8g. Espectro HMQC del del polihidroxialcohol (VIII)



Espectro 8h. Espectro HMBC del del polihidroxialcohol (VIII)



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÁDAMO, P., ARIENZO, M., PUGLIENSE, M., ROCA, V. & VIOLANTE, P. Accumulation history of radionuclides in the lichen *Stereocaulon vesuvianum* from Mt. Vesuvius (south Italy). En: Environ. Poll. Vol., 127. (2004); p. 455–461.
- AGELET, A. & VALLES, J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part III. Medicinal uses of non-vascular plants. En: J. Ethnopharm. Vol.; 84. (2003); p. 229-234.
- AGUIRRE, J. Diversidad de los musgos (Bryophyta) y líquenes de Colombia: Una evaluación con propósitos de conservación. Bogotá, 2006, 542p. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Biología.
- AHLUWALIA S. Comprehensive Experimental Chemistry. New Delhi: New Age Int. 1997. p 132.
- AIRAKSINEN, M., PEURA, P., ALA-FOSSI-SALOKANGAS, L., ANTERE, S., LUKKARINEN, J., SAIKKONEN, M., & STENBSCK, F. Toxicity of plant material used as emergency food during famines in Finl&. En: Journal of Ethnopharmacology Vol.; 18. (1986); p. 273-296.
- AMAROWICZ, R., PEGG, R., PAHIMI, P., BARL, M., & WEIL, J. Free-radical scavening capacity & antioxidant activity of selected plants species from the Canadian prairies. En: Food chemistry. Vol., 84 (2004); p. 551-562.
- ARIAS, S., MURILLO, R., PIÑEROS, M., BRAVO, M., HERN&EZ, G., PARDO, C., y otros. Prioridades de investigación para el control del cáncer en Colombia. En: Revista Colombiana de Cancerologia. Vol.; 11. (2007); p. 152-164.
- ARMSTRONG, Donald. Methods in molecular biology: Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols. New Jersey: Humana Press, 2002. p.319.
- ARUP, U., EKMAN, S., LINDBLOM, L. & MATTSSON, J. High performance thin chromatography (HPTLC), an improved technique for screening lichen substances. En: Lichenol. Vol.; 25. (1993); p. 61-71.
- ASLAN, A., GULLUCE, M., SOKMEN, M., ADIGUZEL, A., SAHIN, F. & OZKAN, H. Antioxidant & Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliacea, Dermatocarpon miniatum, Everinia divaricata, Evernia prunastri*, & *Neofuscella pulla*. En: Pharm. Biol. Vol.; 44. (2006); p. 247–252.
- AVELLO, M. y SUWALSKY, M. Radicales Libres, Estrés Oxidativo y Defensa Antioxidante Celular. En: Revista ciencia ahora Universidad de Concepción. Vol.; 17. (2006); p. 03.
- BACKOR, M. y FAHSELT, D. Tetrazolium reduction as an indicator of environmental stress in lichens & isolated bionts. En: Environ. Exper. Botan. Vol.; 53. (2005); p. 125–133.
- BACOROVA, M., BACKOR, M., MIKES, J., JENDZELOVSKY, R., & FEDOROCKO, P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, atranorin, usnic acid & gyrophoric acid. En: Toxicology in Vitro. (2010).
- BAFNA. A., MISHRA, S. In vitro antioxidant activity of methanol extract of rhizomes of *Curculigo orchioides* Gaertn. En: Ars Pharm. Vol., 46, No 2 (2005); p. 125-138.
- BARRERA, G., PIZZIMENTI, S. & DIANZANI, M. U. Lipid peroxidation: control of cell proliferation, cell differentiation and cell death. En: Molecular Aspects of Medicine. Vol., 29 (2008); p.1–8.
- BEHERA, B., VERMA, N., SONONE, A. & MAKHIJA, U. Antioxidant & antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. En: Biotech. Lett. Vol.; 27. (2005); p. 991–995.

- BEZIVIN, C., TOMASI, S., DEVEHAT, F. & BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine & human cancer cell lines. En: Phytom. Vol.; 10. (2003); p. 499–503.
- BIALY, TL., ROTHE, MJ. & GRANT-KELS, JM. Dietary factors in the prevention and treatment of nonmelanoma skin cancer and melanoma. En: Dermatol Surg Vol., 28 (2002); p.1143–1152.
- BLASCO, M., DOMEÑO, C. & NERIN, C. Use of lichens as pollution biomonitors in remote areas: comparison of PAHs extracted from lichens & atmospheric particles sampled in & around the Somport tunnel (Pyrenees). En: Environ. Sci. Technol. Vol.; 40. (2006); p. 6384-6391.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. & BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. En: LWT. Vol.; 28. (1995); p. 25-30.
- BREHM, L., STOECKLI-EVANS, H., TABACCHI, R. & BUERGI, H. B. The crystal structure of methyl b -orcinolcarboxylate (methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate. En: Helvetica Chimica. Vol., 66 (3, 1983); p.824-827.
- BRODO, I., DURAN, S. & SHARNOFF, S. Lichens of North America. En: Yale University Press. New Haven: (2001), P.795.
- CACCAMESE, S., COMPAGNINI, A., TOSCANO, R. & CASCIO, O. Methyl β-orcinolcarboxylate & atranol from the lichen *Stereocaulon vesuvianum*. En: J. Nat. Prod. Vol.; 49. (1986); p. 1159-1160.
- CAO, G., SOFIC, E. , & PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. En: Free Radical Biol. Med. Vol., 22 (1997); p. 749–760.
- CARMICHAEL, J., DEGRAFF, W., GAZDAR, A., MINNA, J. & MITCHELL, J. Evaluation of a tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. En: Can. Res. Vol.; 45. (1987); p. 936–42.
- CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. En: Chemistry and Physics of Lipids. Vol., 157 (2009); p.1–11.
- CHAPARRO, M. y AGUIRRE, J. Hongos liquenizados. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá: (2002), P.220.
- CHOUDHARY, M., AZIZUDDIN LALIL, S. & ATTA-UR-RAHMAN. Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen. *Usnea longissima*. En: Phytochem. Vol.; 66. (2005); p. 2346-2350.
- COCCHIETO, M., SKERT, N., NIMIS, P. & SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. En: Naturwiss. Vol.; 89. (2002); p. 137-146.
- CONTE, M. & Silva, P. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. En: Metroc. Pesq. Vol.; 1. (2007); p. 37-58.
- CORRECHE, E., CARRASCO, M., GIANNINI, F., PIOVANO, M., GARBARINO, J., & ENRIZ, D. Cytotoxic Screening Activity of Secondary Lichen Metabolites. En: Acta Farmacéutica Bonaerense. Vol., 24. No 4. (2002); p. 273.
- CUELLAR, M., QUILHOT, W., RUBIO, C., SOTO, C., ESPINOZA, I. & CARRASCO, H. Phenolics, depsides and triterpenes from the chilean lichen *Pseudocyphellaria nudata* (zahlbr.) D.j. Galloway. En: J. Chil. Chem. Soc. Vol., 53, (3, 2008); p.1624-1625.
- CUENDET, M., HOSTETTMANN, K., POTTERAT, O. & DYATMIKO, W. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties. En: Helv. Chim. Vol.; 80. (1997); p. 1144–1152.
- CULBERSON, CF. CULBERSON, WL. Johnson. Second Supplement to "Chemical & Botanical Guide to Lichen products". En: American Bryological & Lichenologial Society, Missouri Botanical Garden, St. Louis. (1977); p.400.
- CULBERSON, CF. Supplement to "Chemical & Botanical Guide to Lichen products". En: The Bryologist. Vol.; 73. (1970); p.177-377.
- DAVIES, J., WANG, H., TAYLOR, T., WARABI, K., HUANG, X. & &ERSEN, R. Uncialamycin, a New Enediyne Antibiotic. En: Organ. Lett. Vol.; 7. (2005); p. 5233-5236.
- DE LA COBA, F. AGUILERA, J. y LOPEZ, F. "(WO/2007/026038) Use of a mycosporin-type amino acid (shinorine) as an antioxidant. World intellectual property organization. (WO/2007/026038)". {En línea}. {Mayo de 2008} Disponible en: (http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=2007026038).
- DENISOV, E., & AFANAE'EV, L. Oxidation & Antioxidants in Organic Chemistry & Biology. Boca Ratón: Taylor & Francis Group Eds, 2005. 835-884p.

- DIAZ, M. Estudio del Potencial Antioxidante de una especie selecta de Liquen Colombiano del género *Usnea*. Bogotá, Colombia. 2008. Tesis Maestria. Universidad Nacional de Colombia.
- DURAN, N. & PASCUAL, R. Los hongos, algas y líquenes. España: FAPA Ediciones S.L., 1997. 160p.
- ERNST-RUSSELL, M., CHAI, C., HURNE, A., WARING, P., HOCKLESS, D. & ELIX, J. Structure revision & cytotoxic activity of the scabrosin esters, epidithiopiperazinediones from the lichen *Xanthoparmelia scabrosa*. En: Austral. J. Chem. Vol.; 52. (1999); p. 279–283.
- ERNST-RUSSELL, M., CHAI, C., WARDLAW, J. & ELIX, J. Euplectin & coneuplectin, new naphthopyrones from the lichen *Flavoparmelia euplecta*. En: Journal of Nat. Prod. Vol.; 63. (2000); p. 129-131.
- ERNST-RUSSELL, M., ELIX, J., CHAIN, C., WILLIS, A., HAMADA, N. & NASH, T. Hybocarpone, a novel cytotoxic naphthazarin derivative from mycobiont cultures of the lichen Lecanora hybocarpa. En: Tetra. Lett. Vol.; 40. (1999); p. 6321–6324.
- ESPIN, J., RIVAS, C., WICHERS, H. & VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural a new source of antiradical activity for foodstuff. En: J. Agric. Food Chem. Vol.; 48. No 6 (2000); p. 1588-1592.
- "Ethnolichenology. (s.f.). Ethnolichenology database". {En línea}. {Noviembre de 2010} Disponible en: (http://scratchpad.wikia.com/wiki/Ethnolichenology).
- ETSUO, N. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. En: Free Radical Biology & Medicine. Vol., 49 (2010); p.503–515.
- ETSUO, N. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. En: Free Radical Biology & Medicine. Vol., 47 (2009); p.469–484.
- FARRUGIA, L. *ORTEP*-3 for Windows a version of *ORTEP*-III with a Graphical User Interface (GUI). En: *J. Appl. Cryst.* Vol., 30, (1997); p. 565.
- FARRUGIA, L. *WinGX* suite for small-molecule single-crystal crystallography. En: *J. Appl. Cryst.* Vol., 32 (1997); p. 837-838.
- FERNANDÉZ, E., QUILHOT, W., RUBIO, C. & BARRE, E. Photosynthesis: Mechanisms and Effects: Lichens adaptation to altitude, vol. 5. Netherlands: Kluwer Academic publisher, 1998. p.4092-4096.
- FOX, Ch., MAASS, Wsg. & LAMB, Im. The occurrence of porphyrilic acid in the genus Stereocaulon & the identity of dendroidin. En: Jour. Jap. Bot. Vol.; 44. (1969); p. 361-366.
- GALATI, G., O'BRIEN, P.J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. En: Free Radical Biol. Med. Vol., 37 (2004); p. 287–303.
- GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. En: Journal of Lipid Research. Vol., 39 (1998); p.1529-1542.
- GOZE, I., ALIM, A., SIHOGLU TEPE, A., SOKMEN, M., SEVGI, K. & TEPE, B. Screening of the antioxidant activity of essential oil and various extracts of *Origanum rotundifolium* Boiss. From Turkey. En: Journal of Medicinal Plants Research. Vol., 3 (4, 2009); p.246-254.
- GREENBERG, M. E.; LI, X-M.; GUGIU, B. G.; GU, X.; QIN, J.; SALOMON, R. G. & HAZEN, S. L. The lipid Whisker model of the structure of oxidized cell membranes. En: J. Biol. Chem. Vol., 283 (2008); p.2385–2396.
- "Grupo Venezolano de Liquenologos. (s.f.). Líquenes de venezuela". {En línea}. {Noviembre de 2010} Disponible en: (http://sites.google.com/site/liquenesdevenezuela/).
- GULCIN, I., MSHVILDADZE, V., GEPDIREMEN, A. & ELIAS R. Screening of antiradical & antioxidant activity of monodesmosides & crude extract from Leontice smirnowii tuber. En: Phytom.Vol.; 13. (2006); p. 343–351.
- GULCIN, I., OKTAY, M., KUFREVIOGLU, I. & ASLA, A. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. En: J. Ethnopharm. Vol.; 79. (2002); p. 325-329.
- GULLUCE, M., ASLAN, A., SOKMEN, M., SAHINB, F., ADIGUZEL, A., AGAR, G. & SOKOMEN, A. Screening the antioxidant & antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis, Platismatia glauca, Ramalina pollinaria, Ramalina polymorpha* & *Umbilicaria nyleriana*. En: Phytom. Vol.; 13. (2006); p. 515–521.
- HALICIA, M., ODABASOGLUA, F., SULEYMANB, H., CAKIRC, A., ASL& A. & BAYIRA, Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity & mucosal damage caused by indomethacin in rats. En: Phytom. Vol.; 12. (2005); p. 656–662.

- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. C., 2007. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press:, New York.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis?. En: Trends in Pharmacological Sciences. Vol., 32 (3, 2011).
- HANA, D., MATSUMARUA, K., RETTORIB, D. & KAPLOWITZA, N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function & oxidative stress. En: Biochemical Pharmacology. Vol.; 67. (2004); p. 439–451.
- HARAGUCHI, H. Antioxidative plant constituents. En Tringali, C Ed.: Bioactive Compounds from Natural Sources. London: Taylor & Francis Group Eds., 2001. 338-376p.
- HARALDSDÓTTIR, S., GUÓLAUGSDÓTTIR, E., INGÓLFSDÓTIIR, K. & ÖGMUNDSDÓTTIR H. Anti-proliferative effects of lichen-derived lipooxigenase inhibitors on twelve human cancer cell lines of different tissue origin in vitro. En: Plant. Medic.Vol.; 70. (2004); p. 1098-1100.
- HENG CHOOI, Yit. Genetic Potential of Lichen-Forming Fungi in Polyketide Biosynthesis. Melbourne-Australia, 2008, Doctor of Philosophy. RMIT University.
- HENG, L. YOSHIKAZU, Y. JUNG A, K. SUNG, J. J. YOUNG JIN, K. & JAE-SEOUN, H. Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island). En: Polar Biol. Vol., 32 (2009); p.1033–1040.
- HENG, L., XINLI, W., YOSHIKAZU, Y., YANPENG, L., LISONG, W., SUNG, J. J., YOUNG JIN, K. & JAE-SEOUN, H. Antioxidant activities of edible lichen *Ramalina conduplicans* and its free radical-scavenging constituents. En: Mycoscience. Vol., 51 (2010); p.391–395.
- HIDALGO, M. "El Nuevo concepto de Prevención Integral de Salud en Chile: Análisis para detección de Estrés Oxidativo y Estado de Defensas Antioxidantes". Universidad de Valparaiso Chile, {En línea}. {Noviembre de 2007} Disponible en: (www.uv.cl/extension/ideasUV/005/013.html).
- HIDALGO, M., BASCU, L., QUILHOT, W., FERN&EZ, E. & RUBIO, C. Spectroscopic & Photochemical Properties of the Lichen Compound Lobaric Acid. En: Photochem. Photob. Vol.; 81. (2005); p. 1447-1449.
- HODZIC, Z., PASALIC, H., MEMISEVIC, A., SRABOVIC, M., SALETOVIC, M. & POLJAKOVIC, M. The Influence of Total Phenols Content on Antioxidant Capacity in the Whole Grain Extracts. En: European Journal of Scientific Research. Vol., 28 (3, 2009); p.471-477.
- HSU, C-Y. Antioxidant activity of extract from *Polygonum aviculare* L. En: Biol Res. Vol., 39 (2006); p.281-288.
- HUNECK, S. & YOSHIMURA, I. Identification of lichen substances. Springer, Austria, (1996); p. 493.
- HUNECK, S. Die Sekundarstoffe einiger Flechten. En: Phytochemistry. Vol.; 11. (1972); p. 1493-1495.
- HUNECK, S. New Results on the chemistry of lichen substances. En: Progr. Chem. Organ. Nat. Prod. Vol.; 80. (2001); p. 1-239.
- HUNECK, S. Sekundastoffe einiger *Stereocaulon*-Arten. En: Phytochemistry. Vol.; 13. (1974); p. 2313-2314.
- HUNECK, S. The significance of lichens & their metabolites. En: Naturwissenschaften. Vol.; 86. (1999); p. 559-570.
- HYLANDS, P. J. & INGOLFSDOTTIR, K. The isolation of methyl β-orsellinate from *Stereocaulon alpinum* and comments on the isolation of 4,6-dihydroxy-2- methoxy-3-methylacetophenone from *Stereocaulon species*. En: Phytochemistry. Vol., 24 (1, 1985); p.127-129.
- "INBIO. Instituto Nacional de Biodiversidad: Familia Stereocaulaceae". Costa Rica. {En línea}. {Enero de 2008} Disponible en: (http://www.inbio.org/bims/k04/p23/c59131/o59190/f59327/g059329.htm).
- "Index fungorum. Durietzia pallida." {En línea}. {Enero de 2008} Disponible en: (www.indexfungorum.org/Names/HomoSpecies.asp?RecordID=406318).
- INGÓLFSDÓTTIR, K., CHUNG, G., SKÚLASON, V., GISSURARSON, S. & VILHELMSDÓTTIR, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. En: Eur. J. Pharm. Scienc. Vol.; 6. (1998); p. 141–144.

- INGOLFSDOTTIR, K., GUDMUNDSDOTTIR, G., ÖGMUNDSDOTTIR, H., PAULUS, K., HARALDSDOTTIR, S., KRISTINSSON, H., y otros. Effects of tenuiorin & methyl orsellinate. En: Phytomedicine. Vol.; 9. (2002); p. 654.
- INGÓLFSDÓTTIR, K., LEE, S., BHAT, K., LEE, K., CHAI, H., KRISTINSSON, H., SONG, L., GILLS, J., GUDMUNDSDÓTTIR, J., MATA-GREENWOOD, E., JANG, M. & PEZZUTO, J. Evaluation of selected lichens from icel& for cancer Chemopreventive & cytotoxic activity. En: Pharm. Biol. Vol.; 38. (2000); p. 313–317.
- IQB. Instituto químico biológico. "Vademecum. Úsnico ácido." {En línea}. {Enero de 2011} Disponible en: (http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/u006.htm)
- IZQUIERDO, Jaime. Estudio de la actividad antioxidante y anticonvulsiva del extracto metanólico del liquen *Flavopunctelia flaventior*. Bogotá, 2008. Trabajo de grado (Químico Farmacéutico). Universidad Nacional De Colombia. Facultad de Ciencias.
- JOHNSON, D. & GU, L. Autooxidation & antioxidants. Swarbrick J, Baylon J, Eds.: Encyclopedy of pharmaceutical technology. New York, Marcel Dekker Inc., Vol.; 1. (1995); p. 415-449.
- JOULAIN, D. & TABACCHI, R. Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: oakmoss. En: Flavour and Fragrance Journal. Vol., 24 (2, 2009); p.49-61.
- KATALINIC, V., MILOS, M., KULISIC, T. & JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. En: Food Chemistry. Vol., 94 (2006); p.550–557.
- KHANUJA, S., TIRUPPADIRIPULIYUR, K., GUPTA, K., CH&, P., GARG, A., SRIVASTAVA, K., VERMA, CH., SAIKIA, D., DAROKAR, P. & SHASANY, K. "(WO/2004/087128) Methyl β-orcinolcarboxylate from lichen (*Everniastrum cirrhatum*) for use for the treatment of fungal infections & cancer. World Intellectual property organization". {En línea}. {Enero de 2008} Disponible en: (http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=WO2004087128&DISPLAY=STATUS).
- KIRCHNER, G. & DAILLANT, O. The potential of lichens as long-term biomonitors of natural & artifcial radionuclides. En: Environ. Poll. Vol.; 120. (2002); p. 145–150.
- KOHLHARDT-FLOEHR, C., BOEHM, F., TROPPENS, S., LADEMANN, J. & TRUSCOTT, T. G. Prooxidant and antioxidant behaviour of usnic acid from lichens under UVB-light irradiation – Studies on human cells. En: Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. Vol., 101 (2010); p.97–102.
- KOPARAL, A., AYAZ, B., & TURK, H. In vitro cytotoxic activities of (-)-usnic acid & (+)-usnic acid on V79, A549, & human lymphocyte cells & their non-genotoxicity on human lymphocytes. En: Natural Product Research. Vol.; 20. No 14 (2006); p.1300.
- KOSANIĆ, M. & RANKOVIĆ, B. Lichens as possible sources of antioxidants. En: Pak J Pharm Sci. Vol., 24 (2, 2011); p. 165-170.
- KOSANIĆ, M., RANKOVIĆ, B. & VUKOJEVIĆ, J. Antioxidant properties of some lichen species. En: J Food Sci Technol. (2010).
- KRISHNAIAH, D., SARBATLY, R. & NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. En: Food and bioproducts processing. Article in press (2010).
- KRISTMUNDSDÓTTIR, T., JÓNSDÓTTIR, E., OGMUNDSDÓTTIR, H. & INGÓLFSDÓTTIR, K. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. En: Eur. J. Pharm. Scienc. Vol.; 24. (2005); p. 539–543.
- KUANG, Y., ZHOU, G., WEN, D. & LIU, S. Heavy Metals in Bark of Pinus massoniana (Lamb.) as an Indicator of Atmospheric Deposition Near a Smeltery at Qujiang, China. En: Env Sci Pollut Res. Vol.; 14. (2007); p. 270–275.
- KUMAR, S. & MÜLLER, K. Lichen Metabolites. 1. Inhibitory action against leucotriene B4 biosyntesis a non redox mechanism. En: J. Nat. Prod. Vol.; 62. (1999); p. 817-820.
- KUMAR, S. & MÜLLER, K. Lichen Metabolites. 2. Antiproliferative & Cytotoxic Activity of Gyrophoric, Usnic, & Diffractaic Acid on Human Keratinocyte Growth. En: J. Nat. Prod. Vol.; 62. (1999); p. 821-823.
- KUMAR, S., & MULLER, K. Lichen Metabolites. 2. Antiproliferative & Cytotoxic Activity of Gyrophoric, En: Journal of Natural Product. Vol.; 62. (1999); p. 821.
- KUNCHEVA, M., PAVLOVA, K., PANCHEV, I. & DOBREVA, S. Emulsifying power of mannan & glucomannan produced by yeasts. En: Inter. J. Cosm. Scienc. Vol.; 29. (2007); p. 377–384.
- KUPCHAN, S., & KOPPERMAN, H. l-Usnic Acid: Tumor Inhibitor Isolated from Lichens. En: Experiencia. Vol.; 31. No 6 (1975); p. 625.

- LACALLE, A. "Antioxidantes en alimentación: Diferentes formas de expresar su actividad antioxidante. Tipos de unidades y métodos de Análisis. Neiker tecnalia (Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario); En: Agencia catalana de seguridad alimentaria: El control analítico en la seguridad alimentaria y los nuevos retos, ciclo de conferencias. Barcelona. {En línea}. {Marzo de 2008} Disponible en: (http://www.gencat.net/salut/acsa/Du12/html/ca/dir1311/dd16054/antioxidants.pdf).
- LAMBERT, J.D., SANG, S., & YANG C.S. Possible Controversy over Dietary Polyphenols: Benefits vs Risks. En: Chem. Res. Toxicol. Vol., 20 (2007); 583-585
- LAUTERWEIN, M., OETHINGER, M., BELSNER, K., PETERS, T. & MARRE, R. In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (1)-Usnic Acid, & (2)-Usnic Acid against Aerobic & Anaerobic En: Microorganisms. Antim. Agen. Chem. Vol.; 39. (1995); p. 2541–2543.
- LAWREY, J. Lichen allelopathy: a review; In: Inderjit K, Dakshini M, Einhellig F, Eds., Allelopathy: Organisms, Processes, & Applications. Washington, D.C., American Chemical Society Books. (1995); 26-38p.
- LEAL A., VALENCIA-ISLAS N., & ROJAS-ARAQUE J. Evaluación del potencial antioxidante y citotóxico del extracto metanólico y fracciones primarias de *Hypotrachyna sp.,* colectada en zona del páramo de Sumapáz, Colombia. En: Congreso GLAL-8 (Grupo Latinoamericano de Liquenólogos). Perú. 2007.
- LOGAN, S. The Behavior of a Pair of Partially Miscible Liquids. En: J. Chem. Educ. Vol.; 75. (1998); p. 339-342.
- LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, F., TOMASI, S., ELIX, J. A., BERNARD, A., ROUAUD, I., URIAC, P. & BOUSTIE, J. Stictic Acid Derivatives from the Lichen *Usnea articulata* and Their Antioxidant Activities. En: J. Nat. Prod. Vol., 70 (2007); p.1218-1220.
- LUMBSCH H. Analysis of Phenolic Products in Lichens for Identification & Taxonomy; In: Kranner I, Beckett R, Varma A. Eds: Protocols in Lichenology, Springer Lab Manual, Frankfort. (2002); p. 281-295.
- MAISUTHISAKUL, P., SUTTAJIT, M. & PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content & free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. En: Food Chem. Vol.; 100. (2007); p. 1409–1418.
- MARTÍNEZ, J. Evaluación de la actividad antioxidante de Extractos orgánicos de semillas de heliocarpus Terebinthinaceus. México, 2007, Tesis de Grado. Universidad tecnológica de la mixteca. p. 15-19.
- MASAKI, H. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. En: Journal of Dermatological Science. Vol., 58 (2010); p.85–90.
- MATTSON, M. P. Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. En: Experimental Gerontology. Vol., 44 (2009); p.625–633.
- MAYER, M., O'NEILL, M., MURRAY, K., SANTOS-MAGALHAES, N., CARNEIRO-LEAO, A., THOMPSON, A., y otros. Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer. En: Anti-Cancer Drugs. Vol.; 16. No 8 (2005); p. 805.
- MEI, R., JAE-SEOUN, H., JAE, K., KYOUNG-WUK, P., SEONG-CHAN, P., CHI-NAM, S., y otros. Anti-proliferative effects of *Lethariella zahlbruckneri* extracts in human HT-29 human colon cancer cells. En: Food & Chemical Toxicology. Vol.; 47. (2009); p. 2157.
- MENÉNDEZ, J. Diseño de fármacos basado en la química de radicales libres. Madrid: Avendaño C. Eds., Introducción a la Química Farmacéutica. Mc Graw Hill, 2001. 575-610p.
- MILLOT, M., TOMASI, S., STUDZINSKA, E., ROUAUD, I., & BOUSTIE, J. Cytotoxic Constituents of the Lichen *Diploicia canescens*. En: Journal of Natural Products. Vol.; 72. (2009); p. 2177.
- MIYAGAWA, H., YAMASHITA, M., UENO, T. & HAMADA, N. Hypostrepsilalic acid from a cultured lichen mycobiont of *Stereocaulon japonicum*. En: Phytochem. Vol.; 46. (1997); p. 1289-1291.
- MONCADA, B. & FORERO, E. El género *Pseudocyphellaria* vain. (Lobariaceae - ascomycetes liquenizados) en Colombia. En: Caldasia. Vol.; 28. (2006); p. 197-215.

- MORALES GONZÁLEZ, J. A., FERNANDEZ ALBA, B. M., VARGAS, N. & MADRIGAL, E. Los antioxidantes y las enfermedades crónico degenerativas. Universidad autónoma del estado de Hidalgo, México (2009); p.738.
- MORATA ROYSE, Anna. Tesis maestría. Catalunya, 2010, p.20 -21. Estudio de la capacidad antioxidante de la Borraja. Universidad Politécnica de Catalunya. Ingeniería Química.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth & survival: application to proliferation & cytotoxicity assays. En: J. Immun. Meth. Vol.; 65. (1983); p. 55–63.
- MUKAI, K., MORIMOTO, H., KIKUCHI, S. & NAGATA S. Kinetic study of free-radical-scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K & tocopherol quinone) in solution. En: Biochim. Biophys. Acta, 1157. (1993); p. 313-317.
- MÜLLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. En: App. Microb. Biotech. Vol.; 56. (2001); p. 9-16.
- NAIK, G., PRIYADARSINI, K., SATAV, J., BANAVALIKAR, M., SOHONI, D., & BIYANI M. Comparative antioxidant activity of individual herbal componentes used in Ayurvedic medicin. En: Phytochemistry. Vol., 63 (2003); p. 97-104.
- NARANJO D., ROJAS-ARAQUE J., VALENCIA-ISLAS N., & AGUIRRE J. Potencial antioxidante y citotóxico del extracto metanólico y fracciones primarias de *Cladonia sp*., del páramo de Sumapáz, Colombia. En: Congreso GLAL-8 (Grupo Latinoamericano de Liquenólogos). Perú. 2007
- NARDELLI, M. Parst: a system of fortran routines for calculating molecular structure parameters from results of crystal structure analyses. En: Computers & Chemistry. Vol., 7, No 3, (1983); p. 95-98.
- NARDELLI, M. *PARST*95 - an update to *PARST*: a system of Fortran routines for calculating molecular structure parameters from the results of crystal structure analyses. En: *J. Appl. Cryst.* Vol., 28 (1995); p. 659.
- National Cancer Institute (NCI). (s.f.). Explicación básica de lo que es el cáncer. {En línea}. {8 Noviembre de 2010} Disponible en: (http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es/explicacion-basica).
- "National Toxicology Program. NTP nomination for usnic acid & Usnea barbata herb: Submitted by the Food & Drug Administration, Division of Dietary Supplement Programs. The National Institute of Environmental Health Department of Health & Human Services. U.S". {En línea}. {Marzo de 2008} Disponible en: (http://ntp-server.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/Chem_Background/ExSumPdf/UsnicAcid.pdf
- NEERAJ VERMA, B. C. BEHERA, A. S. & URMILA, M. Lipid peroxidation and tyrosinase inhibition by lichen symbionts grown in vitro African Journal of Biochemistry Research. Vol., 2 (12, 2008); p.225-231.
- NEMEIKAITE-CENIENE, A., IMBRASAITE, A., SERGEDIENE, E. & CENAS, N. Quantitative structure–activity relationships in prooxidant cytotoxicity of polyphenols: Role of potential of phenoxyl radical/phenol redox couple. En: Archives of Biochemistry and Biophysics. Vol., 441 (2005); p.182–190.
- NOBILI, S., LIPPI, D., WITORT, E., & DONNINI, M. Natural compounds for cancer treatment & prevention. En: Pharmacological Research. Vol.; 59. (2009); p. 365-378.
- NOGUCHI, N. & NIKI, E. Phenolic antioxidants: a rationale for design & evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis. En: Free radical biol. Med. Vol.; 28. (2000); p. 1538-1546.
- NYARKO, B., ADOMAKO, D., SERFOR-ARMAH, Y., DAMPARE, S., ADOTEY, D. & AKAHO, E. Biomonitoring of atmospheric trace element deposition around an industrial town in Ghana. En: Rad. Phys. Chem. Vol.; 75. (2006); p. 954–958.
- ODABASOGLU, F., ASLAH, A., CAKIR, A., SULEYMAN, H., KARAGOZ, Y., BAYIR, Y. & HALICI, M. Antioxidant activity, reducing power & total phenolic content of some lichen species. En: Fitoter. Vol.; 76. (2005); p. 216-219.
- ODABASOGLU, F., ASLAN, A., CAKIR, A., SULEYMAN, H., KARAGOZ, Y., HALICI, M. & BAYIR, Y. Comparison of Antioxidant Activity & Phenolic Content of Three Lichen Species. En: Phytother. Res. Vol.; 18. (2004); p. 938–941.
- ODABASOGLU, F., CAKIR, A., SULEYMANC, H., ASLAN, A., BAYIR, Y., HALICI, M. & KAZAZ, C. Gastroprotective & antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. En: J. Ethnopharm. Vol.; 103. (2006); p. 59–65.

- ÖGMUNDSDÓTTIR, H., ZOËGA, G., GISSURARSON, S. & INGÓLFSDÓTTIR, K. Anti-proliferative effects of lichen-derived inhibitors of 5-lipoxygenase on malignant cell-lines & mitogen-stimulated lymphocytes. En: J. Pharmacy Pharmacol. Vol.; 50. (1998); p. 107–115.
- OKUYAMA, E., UMEYAMA, K., YAMAZAKI, M., KINOSHITA, Y. & YAMAMOTO, Y. Usnic acid & diffractaic acid as analgesic & antipyretic components of Usnea diffracta. En: Plant. Medic. Vol.; 61. No 2. (1995); p. 113-15.
- OLAFSDOTTIR, E. & INGÓLFSDOTTIR, K. Polysaccharides from Lichens: Structural Characteristics & Biological Activity". En: Plant. Medic. Vol.; 67. (2001); p. 199-208.
- ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K. & APAK, R. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. En: Trends in Analytical Chemistry. Vol., 30 (4, 2011); p.652 664.
- PARANAGAMA, P., KITHSIRI, E., BURNS, A., MARRON, M., GUNATILAKA, M., ARNOLD, A., y otros. Heptaketides from Corynespora sp. Inhabiting the Cavern Beard Lichen, *Usnea cavernosa*: FirstReport of Metabolites of an Endolichenic Fungus. En: Jurnal of Natural Product. Vol.; 70. (2007); p. 1700.
- PAUDEL, B., BHATTARAI, H., LEE, J., HONG, S., SHIN, H. & YIM, J. Antioxidant activity of polar lichens from King George Isl& (Antarctica). En: Polar Biol. Springer-Verlag. (2007).
- PEDRASA, M. Estudio fitoquimico, microbiologico y farmacologico de *Lophopappus tarapacanus* (Phil.) Cabr. Asteraceae; Especie vegetal de la región alto&ina. Santiago de chile, 2004, p. 28-29.Tesis de grado. Universidad de chile. Facultad de ciencias quimicas y farmaceuticas.
- PEREIRA, E., NASCIMENTO, S., LIMA, R., SILVA, N., OLIVEIRA, A., B&EIRA, E., BOITARD, M. & LEGAZ, M. Analysis of *Usnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. En: Tokai J. Exp. Clinical Med. Vol.; 19. (1994); p. 47-52.
- PERRY, N., BENN, M., BRENNAN, N., BURGESS, E., ELLIS, G., GALLOWAY, D., LORIMER, S. & TANGNEY, R. Antimicrobial, antiviral & cytotoxic Activity of new zeal& lichens. En: Lichenol. Vol.; 31. (1999); p. 627–636.
- POKORNY J., YANISHLIEVA N., & GORDON M. Antioxidantes de los alimentos: aplicaciones prácticas. Zaragoza: acribia, 2001. 364p.
- POLACHIRA, K., ANATHASANKARAN, A. & ARUMUGHAN, C. Free radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (sesamum indicum) in DPPH• system. En: J. Agric. Food chem. Vol., 52. (2004); p. 912-915.
- RANCAN, F., ROSAN, S., BOEHM, K., FERN&EZ, E., HIDALGO, M., QUIHOT, W., RUBIO, C., BOEHM, F., PIAZENA, H. & OLTMANNS, U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. En: J. Photochem. Photobiol. B: Biology. Vol.; 68. (2002); p. 133–139.
- RANKOVIČ, B., RANKOVIC, D. & MARICA, D. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Some Lichen Species. En: Microbiology. Vol., 79 (2010); p.809–815.
- REDDYA, L., ODHAVA, B., & BHOOLA, K. Natural products for cancer prevention: a global perspective. En: Pharmacology & Therapeutics. Vol.; 99. (2003); p. 1-13.
- REYES, Marcos. Tesis Doctoral. Zaragoza, 2008, Melatonina y metabolitos derivados del triptófano como protectores de la fluidez de membranas plasmáticas de hepatocitos frente al estrés oxidativo. Universidad de Zaragoza, Facultad de Medicina.
- RIVERO, A. y BETANCORT, J. "Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas". {En línea}. {Noviembre de 2007} Disponible en: (www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/).
- ROBAYO GAMA, Paola. Estudio de la actividad antioxidante del extracto metanólico y fracciones primarias de líquenes colombianos del género *Stereocaulon*. Bogotá, 2008. Trabajo de grado (Químico Farmacéutico). Universidad Nacional De Colombia. Facultad de Ciencias.
- RODRÍGUEZ, J., MENÉNDEZ, J. y TRUJILLO, Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. En: Rev Cub Med Mil. Vol.; 30. (2001); p. 15-20.
- ROJAS-TOME, Irma Susana. Doctor en Ciencias Químicas. Ciudad de México. 2002. Metabolitos fitotóxicos de *Parmotrema tinctorum* Nyl. (Hale) y *Lecophyllum ambiguum* Humb. & Bonpl., como una fuente potencial de compuestos herbicidas con un efecto sobre la fotosintesis y la proteína calmodulina. Universidad Nacional Autónoma de México.

- RUSSO, A., CARDILE, V., LOMBARDO, L., VANELLA, L. & ACQUAVIVA, R. Genistin inhibits UV light-induced plasmid DNA damage and cell growth in human melanoma cells. En: Journal of Nutritional Biochemistry Vol., 17 (2006); p.103–108
- RUSSO, A., PIOVANO, M., LOMBARDO, L., GARBARINO, J., & CARDILE, V. Lichen metabolites prevent UV light & nitric oxide-mediated plasmid DNA damage & induce apoptosis in human melanoma cells. En: Life Sciences. Vol.; 83. (2008); p. 468.
- RUSSO, A., PIOVANO, M., LOMBARDO, L., VANELLA, L., CARDILE, V., & GARBARINO, J. Pannarin inhibits cell growth & induces cell death in human. En: Anti-Cancer Drugs. Vol.; 17. No 10 (2006); p. 1163.
- S&OVAL, M., CHARBONNET, R., OKUHAMA, N., ROBERTS, J., KRENOVA, Z., TRENTACOSTI, A. & MILLAR, M. Cat's claw inhibits TNF production & scavenges free radicals: role in cytoprotection. En: Free Radical Biol. Med. Vol.; 29. (2000); p. 71-77.
- SANCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J., & SAURA-CALIXTO, F. Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. En: J. Sci. Food Agric. Vol., 76, (1998); p. 270-276.
- SANDER, CS., CHANG, H., HAMM, F., ELSNER, P. & THIELE, JJ. Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. En: Int J Dermatol Vol., 43 (2004); p.326–335.
- SANTOS, E., & VILLANUEVA, J. Biología molecular del cáncer: del laboratorio a la clínica. Salamanca. Real Academia de Medicina de Salamanca. (2003).
- SCHMIDT, M., SCHMITZ, H.-J., BAUMGART, A., GUÉDON, D., NETSCH, M.I., KREUTER, M.-H., SCHMIDLIN, C.B., SCHRENK. D. Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. En: Food and Chemical Toxicology. Vol., 43 (2005); p.307–314.
- SEO, C., SOHN, J., PARK, S., YIM, J., LEE, H. & OH, H. Usimines A-C, Bioactive Usnic Acid Derivatives from the Antarctic Lichen *Stereocaulon alpinum*. En: J. Nat. Prod., in press. (2008).
- SEO, C., YIM, J., LEE, H., PARK, S., SOHN, J. & OH, H. Stereocalpin A, a bioactive cyclic depsipeptide from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. En: Tetrah. Lett. Vol.; 49. (2008); p. 29–31.
- SHELDRICK, G. SHELX97 program package for crystal structure solution & refinement. Por: University of Gottingen, Germany. (1997).
- SHELDRICK, G. SHELXTL, Version 5.10 Bruker AXS Inc., Por: Madison, Wisconsin, USA. (1998).
- SHI, H. & NIKI, E. Stoichiometric & kinetic studies on Ginkgo biloba extract & related antioxidants. En: Lipids. Vol.; 33. (1998); p. 365-370.
- SHUKLA, V., GEETA PANT, Joshi. & RAWAT, M. S. M. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. En: Phytochem Rev. Vol., 9 (2010); p.303–314.
- SIDDHURAJU, P. & BECKER, K. The antioxidant & free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., seed extracts. En: Food Chem. Vol.; 101. (2007); p. 10–19.
- SINKO P. Martin´s physical pharmacy & pharmaceutical sciences. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Eds, 2006. 205-207p., 420-428p.
- SIPMAN H. "Key to the *Stereocaulon* species in the Neotropics. Lichen determination keys. Botanic Garden & Botanical Museum Berlin-Dahlem". {En línea}. {Octubre de 2007} Disponible en: (http://www.bgbm.org/Sipman/keys/Neostereo.htm).
- SIPMAN, H. BGBM Neotropical *Stereocaulon* key. {En línea}. {3 Noviembre de 2010} Disponible en: (http://www.bgbm.org/sipman/keys/Neostereo.htm).
- SKIBOLA, C.F., & SMITH, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. En: Free Radical Biology & Medicine. Vol., 29 (3/4, 2000); p. 375–383.
- SROKA, Z. & CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. En: Food and Chemical Toxicology. Vol., 41(2003); p.753–758.
- SUJA, K., JAYALEKSHMY, A., and ARUMUGHAN, C. Free Radical scavenging behavior of antioxidant compounds of sesame (Sesamum indicum L.) in DPPH• system. En: J. Agric. Food Chem. Vol., 52 (2004); p.912–915.
- SÜLEYMAN, H., ODABASOGLU, F., ASLAN, A., CAKIR, A., KARAGOZ, Y., GOCER, F., HALICI, M. & BAYIR, Y. Anti-inflammatory & antiulcerogenic effects of the aqueous extract of Lobaria pulmonaria (L.) Hoffm. En: Phytom. Vol.; 10. (2003); p. 552–557.

- TAKAHASHI, K., TAKEDA, T., SHIBATA, S., INOMATA, M., & FUKUOKA, F. Polysaccharides of lichens & fungy VI. En: Chemical & Pharmaceutical Bulletin. Vol.; 22. No 2 (1974); p. 404.
- TOKIWANO, T., SATOH, H., OBARA, T., HIROTA, H., YOSHIZAWA, Y., & YAMAMOTO, Y. A lichen substance as an antiproliferative compound against HL-60 human leukemia cells: 16-O-acetyl-leucotylic acid isolated from *Myelochroa aurulenta*. En: Bioscience Biotechnology & Biochemistry. Vol.; 73. No 11(2009); p. 2525.
- TOLEDO, F., GARCÍA, A., ESTÉVEZ, F., QUINTANA, J. & BERMEJO, J. Identification & quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity & Antioxidative activity. En: J. Chem. Ecol. Vol.; 29. (2003); p. 2049-2071.
- UGARTONDO, V., MITJANS, M., LOZANO, C., TORRES, J. L. & VINARDELL, M. P. Comparative Study of the Cytotoxicity Induced by Antioxidant Epicatechin Conjugates Obtained from Grape. En: Journal of agricultural and food chemistry. Vol., 54 (18, 2006); p.6945-6950.
- VALENCIA-ISLAS N., ROJAS-ARAQUE J., AGUIRRE J., RAMOS M., SANCHEZ N., PABON J., & SILVA M. Determinación del potencial antioxidante y citotóxico de *Rimelia cetrata* colectada en la sabana de Bogotá, Colombia. En: Congreso GLAL-8 (Grupo Latinoamericano de Liquenólogos). Perú. 2007.
- VALENCIA-ISLAS, N., ZAMBRANO, A. & ROJAS, J. Ozone reactivity & free radical scavenging behavior of phenolic secondary metabolites in Lichens exposed to chronic oxidant air pollution from Mexico city. En: J. Chem. Ecol. Vol.; 33. (2007); p. 1619–1634.
- VEGA, N. Caracterización bioquímica, funcional y biológica de la lectina de Salvia bogotensis y evaluación de su aplicación para la detección del antígeno Tn. Bogota. Tesis Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.
- WONG, P. & KITTS, D. Analytical, Nutritional & Clinical Method Section an iron binding assay to measure activity of known food sequestering agents: studies with buttermilk solids. En: Food Chem. Vol.; 72. (2001); p. 245-254.
- YANISHLIEVA, N. & GORDON, M. Eds. Antioxidantes de los alimentos, aplicaciones prácticas. Zaragoza, editorial Acribia, S.A., 2001. 69-81p.
- YILDIRIM, A., MAVI, A. & KARA, A. Determination of antioxidant & antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. En: J. Agric. Food Chem. Vol.; 49. (2001); p. 4083-4089.
- YOSHIMURA, I. & ARVIDSSON, L. Taxonomy & chemistry of the Lobaria crenulata group in Ecuador. En: Acta Bot. Fennica. Vol.; 150. (1994); p. 223-233.
- YOSHIMURA, I. *Lobaria* in Latin America: taxonomic, geographic & evolutionary aspects. In Marcelli, M. P. & Seaward, M. R. D. (eds.). Lichenology in Latin America: History, Current Knowledge & Applications: CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). São Paulo, Brazil. (1998); p. 129-134.
- YOSHIMURA, I. Taxonomic studies on *Lobaria crenulata* & its allies. En: Journ. Hattori bot. Lab. Vol.; 57. (1984); p. 97-126.
- YOSHIMURA, I. The genus *Lobaria* of eastern Asia. En: Journ. Hattori bot. Lab. Vol.; 34. (1971); p. 231-364.
- ZAINOL, M., ABD-HAMID, A., YUSOF, S. & MUSE, R. Antioxidative activity & total phenolic compounds of leaf, root & petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. En: Food Chem. Vol.; 81. (2003); p. 575–581.
- ZAMBRANO, A., NASH, T. & HERRERA-CAMPOS, M. Urban air pollution & forest resources at risk in the Mexico City Basin. Ecological studies 156. Springer, NY. (2002); p. 283-296.
- ZEYTINOGLU, H., INCESU, Z., AYAZ TUYLU, B., TURK, A., & BARUTCA, B. Determination of Genotoxic, Antigenotoxic & Cytotoxic Potential of the Extract from Lichen *Cetraria aculeata* (Schreb.) Fr. *in vitro*. En: Phytother. Res. Vol., 22 (2008); p. 118–123.
- ZHAO, C., GAO, Z., & QUA, X. Nrf2–ARE signaling pathway & natural products for cancer chemoprevention. En: Cancer Epidemiology. Vol.; 34 (2010); p. 523-533.
- ZHENBAOA, J., FEIA, T., LINGB, G., GUANJUNA, T. & XIAOLINA, D. Antioxidant properties of extracts from juemingzi (*Cassia tora* L.) evaluated in vitro. En: LWT. Vol.; 40. (2007); p. 1072-1077.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

- PERICO-FRANCO L. S., VALENCIA-ISLAS N. A., ROJAS J. L., CERBÓN M. A., GONZÁLEZ I. Efecto protector celular y del ADN frente a daño oxidativo y citotoxicidad de extractos y metabolitos secundarios de *Stereocaulon strictum* y *Lobariella pallida*. En: Decimo Encuentro del Grupo de Liquenologos Latinoamericanos GLAL X. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá, Colombia. 2011. Ponencia Oral.

- PERICO-FRANCO L., VALENCIA ISLAS N., & ROJAS-ARAQUE J. Metabolitos secundarios de los líquenes *Stereocaulon strictum* (stereocaulaceae) y *Lobariella pallida* (lobariaceae) colectados en el páramo de Sumpaz, Colombia y estudio de su actividad antioxidante. En: IX Encuentro del Grupo Latinoamericano de Liquenólogos. Argentina. 2009. Ponencia oral.

- PERICO-FRANCO L., & VALENCIA-ISLAS N. Determinación del potencial antioxidante de los extractos metanólicos de los líquenes *Lobariella pallida* y *Everniastrum sorocheilum.* En: X Congreso Colombiano de Fitoquímica. Colombia. 2009. Ponencia en Poster.