

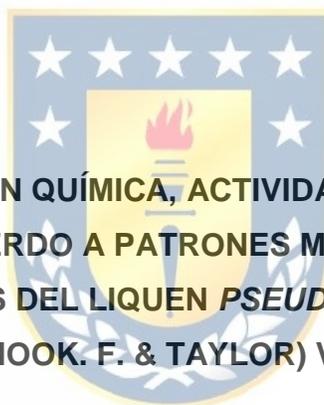


**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**

**CAMPUS LOS ÁNGELES**

**Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal**

**Ingeniería en Biotecnología Vegetal**



**ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y  
SUS VARIACIONES DE ACUERDO A PATRONES MORFOLÓGICOS EN  
DISTINTAS POBLACIONES DEL LIQUEN *PSEUDOCYPHELLARIA  
FLAVICANS* (HOOK. F. & TAYLOR) VAIN**

Tesis presentada al Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal de la  
Universidad de Concepción para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología  
Vegetal

POR: GABRIEL ALEJANDRO BRAVO JORQUERA

PROFESOR GUÍA: DR. CARLOS ALBERTO SCHNEIDER BARRERA

Enero, 2022

Los Ángeles - Chile

**ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y  
SUS VARIACIONES DE ACUERDO A PATRONES MORFOLÓGICOS EN  
DISTINTAS POBLACIONES DEL LIQUEN *PSEUDOCYPHELLARIA  
FLAVICANS* (HOOK. F. & TAYLOR) VAIN**

Alumno

Gabriel Alejandro Bravo Jorquera  
Ingeniero en Biotecnología Vegetal

Profesor guía



Dr. Carlos Schneider Barrera  
Profesor Asociado  
Químico Farmacéutico

Jefe de carrera

Ing. Pedro Lindor Quiroz Hernández  
Instructor  
Ingeniero en Ejecución Forestal

Director departamento

M. Sc. Pablo Novoa Barra  
Profesor Asistente  
Ingeniero en Ejecución Forestal

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo es el resultado del esfuerzo propio y del apoyo de personas que de una u otra manera han hecho posible su culminación: en especial quisiera agradecer a mis padres, a mi polola Vania y a la familia Morales Ruiz, que han sido un apoyo permanente, en el transcurso de este trabajo.

Al Dr. Carlos Schneider Barrera, de la Universidad de Concepción, por su apoyo constante, consejos y entusiasmo en esta investigación.

Al Dr. Cristian Átala Bianchi, de la Universidad Católica de Valparaíso, por su colaboración y apoyo permanente en el transcurso de la investigación.

Al Dr en Botánica Reinaldo Vargas Castillo de la Universidad Metropolitana de Santiago, Chile, por la identificación del líquen y por la colaboración en los análisis morfológicos.

A la laboratorista Claudia Flores de la Universidad de Concepción, por su aporte siempre constructivo y ayuda en cada uno de los análisis realizados en el laboratorio de química de alimentos.

A la laboratorista Fabiola Salcedo del Centro de Desarrollo Tecnológico Agroindustrial, por su colaboración en los cromatogramas de CLAR-UV.

A Manuel Quilodrán, por los apoyos en los análisis fisiológicos y discusiones sobre el mundo de los líquenes.

A los integrantes de los laboratorios de anatomía y ecología funcional de plantas, de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles, por sus aportes y gratos momentos.

A los integrantes del laboratorio de química de alimentos, de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles, por sus charlas y apoyo en cada uno de los ensayos.



Dedicado a  
Mis padres y Pelusa.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	2
1. MARCO TEÓRICO.....	4
1.1 Asociación simbiótica de los líquenes .....	4
1.2 Morfología de los líquenes .....	5
1.3 Distribución de los líquenes .....	6
1.4 Compuestos liquénicos y biosíntesis.....	6
1.5 Usos y aplicaciones de los líquenes.....	8
1.6 Actividad antibacteriana.....	8
1.7 Actividad antioxidante .....	10
1.8. <i>Pseudocyphellaria flavicans</i> (Hook. f. & Taylor) Vain .....	12
1.8.1 Estructuras morfológicas y sus funciones .....	12
1.8.2 Taxonomía.....	13
1.8.4 Química del género <i>pseudocyphellaria</i> .....	14
1.9 Relación entre el ambiente con características químicas y morfológicas en los líquenes .....	15
1.9.1 Características del Parque Nacional Nahuelbuta.....	16
1.9.2 Características del Monumento Natural Contulmo .....	16
1.9.3 Características de la Reserva Nacional Ralco .....	16
2. HIPÓTESIS .....	19
3. OBJETIVOS .....	20
3.1 Objetivo general.....	20
3.2 Objetivos específicos .....	20
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
4.1 Muestras de estudio .....	21
4.2 Apertura de dosel y Fv/Fm <i>in situ</i> .....	21
4.3. Marcha fitoquímica .....	22
4.4 Detección de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina (CCF) ....	23
4.5 Extracción acetónica y metanólica.....	23

4.6	Determinación del contenido total de fenoles .....	24
4.7	Análisis morfo-anatómicos .....	25
4.8.	Determinación de polifenoles mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) .....	25
4.8.1.	Preparación de la muestra.....	25
4.8.2.	Sistema de CLAR y condiciones de la cromatografía .....	26
4.9.	Análisis antimicrobiano .....	27
4.9.1.	Material vegetal, microorganismos y antibióticos.....	27
4.9.2	Medios de cultivo .....	27
4.9.3	Preparación de placas y pre-cultivos de microorganismos .....	28
4.9.4	Determinación de la actividad antibacterial.....	28
4.9.5	Curva de antibióticos estándares, control positivo.....	29
4.10	Actividad antioxidante .....	29
4.10.1	Determinación de secuestro del radical libre DPPH.....	29
4.10.2	Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS.....	30
4.10.3.	Cálculos de secuestro de radical libre DPPH y ABTS. ....	31
4.10.4	ensayo de cinética del extracto metanólico en DPPH y ABTS.....	31
4.11.	Análisis estadísticos.....	32
5.	RESULTADOS .....	32
5.1	Marcha fitoquímica .....	32
5.2	Fenoles totales.....	33
5.3	Detección de metabolitos en cromatografía en capa fina .....	33
5.4	Análisis morfo-anatómicos .....	34
5.5.	Apertura de dosel y resolución fotosintética cuántica máxima del fotosistema ii <i>in situ</i> .....	36
5.6.	Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) .....	38
5.7.	Actividad antioxidante .....	39
5.7.1	Cinéticas del porcentaje de inhibición de los radicales libres ABTS Y DPPH.....	41
5.8.	Actividad antimicrobiana.....	43
6.	DISCUSIÓN .....	44

7. CONCLUSIONES.....	50
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
9. ANEXO .....	60
9.1 Fotografías microscópicas de talos de <i>P. flavicans</i> .....	60
9.2 Fotografías apertura de dosel.....	61
9.3 Diferencias en el grosor de las capas, en distintas condiciones luminicas.....	62
9.4 Diseño experimental para el ensayo antimicrobiano.....	63
9.5 Comparación de los halos de inhibición de cada población.....	64
9.6 Fotografías de halos de inhibición de los extractos líquenicos .....	65
9.7 Peaks y tiempo de retención de compuestos metabólicos detectados por CLAR	66
9.8. Morfología de bacterias gram positivo y gram negativa.....	67

#### INDICE DE TABLAS, FIGURAS, FOTOGRAFÍAS, Y CROMATOGRAMAS.

Tabla 1. Clasificación taxonómica del líquen <i>Pseudocyphellaria flavicans</i> .....	13
Tabla 2. Metabolitos secundarios identificados en individuos de <i>P. flavicans</i> .....	32
Tabla 3. Concentración de fenoles totales, en extractos líquenicos metanólico y acetónico.....	33
Tabla 4. Grosor promedio de las distintas capas que forman la estructura líquénica de cada población.....	35
Tabla 5. Nº de estructuras reproductivas de cada sitio .....	35
Tabla 6. IC50 de cada población en DPPH.....	40
Tabla 7. IC50 de cada población en ABTS .....	41
Tabla 8. Halos de inhibición al utilizar concentraciones bajas de cada extracto.....	64

Figura 1. Morfología de líquenes foliosos.....	17
Figura 2. Vías de biosíntesis de metabolitos secundarios en líquenes (modificado de Elix y Stocker- Wörgötter (2008).....	17
Figura 3. Curva de calibración de ácido gálico.....	24
Figura 4. Curvas de calibración e inhibición de ácido gálico y ascórbico.....	30
Figura 5. Gráfico de los isidios por población. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey $p < 0,05$ ).....	36
Figura 6. Gráfico de la apertura de dosel de cada sitio. Letras iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas, (Tukey $p < 0.05$ ).....	37

Figura 7. Gráfico del Fv/Fm de cada sitio. Letras iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas, (Tukey p <0.05).....	37
Figura 8. Curvas del porcentaje de inhibición en ABTS de cada población.....	39
Figura 9. Curvas del porcentaje de inhibición en DPPH de cada población. ....	40
Figura 10. Curvas promedios de cinética del % de inhibición de ABTS .....	42
Figura 11. Curvas promedios de cinética del % de inhibición de DPPH.....	42
Figura 12. Gráfico de dispersión del halo de inhibición de <i>E. coli</i> en diferentes concentraciones (Tukey p<0.05).....	43
Figura 13. Gráfico de dispersión del halo de inhibición de <i>S. aureus</i> en diferentes concentraciones (Tukey p<0.05).....	44
Figura 14. Esquema del grosor aproximado de las capas, en diferentes condiciones lumínicas. ....	62
Figura 15. Esquema del diseño experimental para el ensayo microbiano .....	63
Figura 16. Diagrama de la morfología de la pared celular de bacterias Gram positiva (Gm+) y Gram negativas (Gm-), obtenida de Microbiología Zinsser, 17 Edición .....	67
Fotografía 1. Imagen microscopia de <i>Pseudocyphellaria flavicans</i> . Objetivo 10x. Autor: Bravo G (2013). ....	18
Fotografía 2. Imágenes tomadas bajo lupa de estructuras reproductivas y de pseudocyphellas. Características de la especie <i>Pseudocyphellaria flavicans</i> , A. Apotecios, en forma de ascas. B. Isidios, de 1 a 2 mm de altura. C. Pseudocyphellas, pequeños orificios. ....	18
Fotografía 3. Placas cromatográficas TLC. A. Luz visible y B. Bajo luz Ultravioleta. N: Nahuelbuta, C: Contulmo y R: Ralco. Utilizando distintos solventes de arrastre. Solvente 1 (Tolueno, etil acetato, ácido fórmico); Solvente 2 (Ciclo hexano, etil acetato); Solvente 3 (Tolueno y Ácido acético).....	34
Fotografía 4. Talos de A. Nahuelbuta, B. Contulmo y C. Ralco .....	60
Fotografía 5. Imágenes hemisféricas de cada población. A: Nahuelbuta, B: Contulmo, C:Ralco.....	61
Fotografía 6. Halos de inhibición producidos por el extracto liquénico, y halo de inhibición del antibiótico sintético ampicilina en un medio con <i>S. aureus</i> . ....	65
Cromatograma 1. Peaks y tiempos de retención de MBO y EH utilizados por Gupta <i>et al</i> , 2007. ....	27
Cromatograma 2. Los diferentes picos y tiempo de retención obtenidos en un extracto metanólico de individuos de <i>P. flavicans</i> de Nahuelbuta (en duplicado).....	38

## ABREVIACIONES

ABTS: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazonila- 6-sulfónico).

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazil.

CCF: Cromatografía en capa fina.

CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución.

CLAR- UV: Cromatografía líquida de alta resolución acoplado con sensor UV.

Fv/Fm: Eficiencia máxima cuántica del fotosistema II.

MBO; Metil  $\beta$ -orcinolcarboxilato

EH: Etil hematomo.

## PRINCIPALES INSTRUMENTOS UTILIZADOS

Rota vapor, modelo HB10 digital. Marca IKA.

Espectrofotómetro UV-Visible Genesys. 10 uv, Marca THERMO SCIENTIFIC.

Espectrofotómetro Spectronic 20. Marca BAUSH & LAMB.

Extractor Soxhlet 3049/8. Marca GLASSCO.

Cromatografo liquido de alta resolución Agilent Technologies 1200 series, acoplada con el detector UV G 1316<sup>a</sup>.

Fluorimetro Pocket PEA, Hansatech Ltd, King's Lynn, UK.

Lámpara UV fluorescente modelo NCT-18M.

Estufa marca MEMMERT modelo UFB 500.

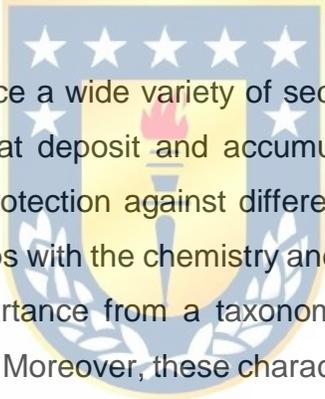
Microscopio Carl Zeiss Primo Star, con un objetivo de 10X, equipado con cámara óptica CANON EOS REBEL XS.

## RESUMEN

Los líquenes producen una amplia gama de metabolitos secundarios, sintetizados principalmente por el hongo, que se depositan y acumulan extracelularmente. Estos compuestos participan en la protección frente a diferentes estreses ambientales. Las relaciones del ambiente con la química y morfología de los líquenes, se consideran de gran importancia, desde el punto de vista taxonómico, con la formación de nuevos quimiotipos. Además, estas características son claves para colonizar territorios inhóspitos. En esta investigación se estudió y comparó la composición química entre distintas poblaciones del líquen folioso *Pseudocyphellaria flavicans* nativo del centro sur de Chile. Los ensayos químicos fueron una marcha fitoquímica, cuantificación de fenoles, utilizando la técnica de Folin-Ciocalteu con acetona y metanol como solvente, cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución y ensayos biológicos, tales como ensayo antioxidante (secuestro de radicales libres DPPH y ABTS) y antimicrobiano (ensayo de difusión por disco, en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*). Además, se determinó el grosor de las capas de los talos, y la cantidad de estructuras reproductivas. Los resultados obtenidos, indicaron que *P. flavicans* presenta en su composición química antraquinonas, cumarinas, flavonoides, alcaloides. No se determinaron diferencias significativas en el contenido de fenoles (82,10 µg de ácido gálico /mg de extracto). La marcha fitoquímica indicó que existen diferencias en algunos compuestos tanto en su índice de referencia, como en el color, principalmente entre la población de Ralco versus las poblaciones de Nahuelbuta y Contulmo. En cuanto a las comparaciones morfológicas, se determinó variaciones entre las poblaciones, como en el grosor de las capas y cuantitativamente en el número de isidios, los talos de Ralco no presentaron apotecios en ninguno de los individuos estudiados. Las mencionadas diferencias no se reflejan en las características antioxidantes y antimicrobianas. *P. flavicans* posee una alta capacidad de

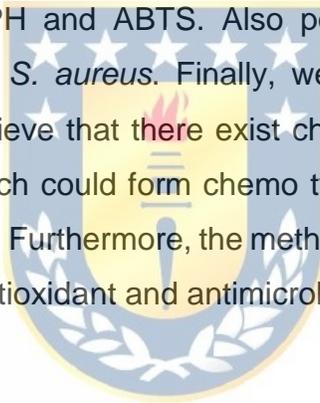
secuestrar radicales libres tanto en DPPH como en ABTS. Además, posee actividad inhibitoria de crecimiento en la bacteria Gram- positiva *S. aureus*. Además según el ensayo en CLAR, se presume la presencia del compuesto MBO. Concluimos que existen diferencias químicas y morfológicas, las cuales podrían formar quimiotipos entre las poblaciones de la cordillera de Costa y cordillera de Andes. El extracto metanólico de *P. flavicans* posee compuestos liquénicos con características antioxidantes y antimicrobianas.

#### ABSTRACT



The lichens are able to produce a wide variety of secondary metabolites mainly synthesized by the fungus that deposit and accumulate extracellularly. These compounds are involved in protection against different environmental stresses. The environmental relationships with the chemistry and morphology of the lichens are considered of great importance from a taxonomic point of view, with the formation of new chemo types. Moreover, these characteristics are key to colonize inhospitable territories. In this investigation, the chemistry composition between different populations of foliose Lichen *Pseudocyphellaria flavicans* native from centre-south of Chile. The chemical tests were a phytochemical march, quantification of phenols using the solvents acetone and methanol through the technique of Folin-Ciocalteau, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography and biological assays such as: antioxidant assay (sequestering free radical DPPH and ABTS) and antimicrobial assay (disk diffusion assay on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*). In addition, it was determined the thickness of each of the layers of the structure of the thalli, to quantify the reproductive structures. The results gathered indicate that *P. flavicans* presents in their chemical composition anthraquinones, coumarins, flavonoids, alkaloids. Significant differences in the content of phenols by using different solvents were

not determined (82.10 µg of acid galico /mg de extract). The phytochemical march indicates that there are differences in some compounds in both its benchmark (ir), as in color, mainly between Ralco population versus the population of Nahuelbuta and Contulmo. Regarding morphological comparisons, variations between populations, as in the thickness of layers and quantitatively isidia number, no significant difference in the number of determined apothecia was found. However, Ralco thalli showed no apothecia in any of the subjects studied. Also, they showed differences in canopy opening each site, and the Fv / Fm in situ. The mentioned differences in chemical composition and morphology are not evidenced in terms of antioxidant and antimicrobial properties. *P. flavicans* has a high capacity for radical scavenging both DPPH and ABTS. Also possesses growth inhibitory activity on the Gram-positive *S. aureus*. Finally, we assume the presence of MBO. As a conclusion, we believe that there exist chemical changes and in the morphological differences which could form chemo types among populations of the coast and Andes Mountain. Furthermore, the methanolic extract of *P. flavicans* has lichen compounds with antioxidant and antimicrobial properties.



## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Asociación simbiótica de los líquenes

En líquenes las asociaciones entre sus *biontes* hongo – alga, hongo-cianobacterias pueden ser del tipo antagonista, comensalistas o mutualistas. Estas son discutidas convenientemente con respecto al número de *biontes* comprometidos en la asociación (Hawksworth, 1989). Los hongos carecen de clorofila y para resolver sus carencias alimenticias deben utilizar diversas estrategias. Una de ellas consiste en conformar una asociación estable con algas o cianobacterias, de esta manera ambos organismos se benefician mediante una asociación simbiótica generalmente mutualista. Se conocen más de 15.000 especies de hongos capaces de desarrollar simbiosis, a diferencia de los organismos clorófitos (eucariotas, algas verdes) o cianobacterias (procariotas), entre los cuales, solo pequeños grupos taxonómicos participan en la asociación, los *fotobiontes* más comunes son del género *Nostoc*, *Scytonema*, *Trebouxia* y *Trentepohlia* (Cubas *et al*, 2010). Los líquenes son organismos enigmáticos y complejos cuyos cuerpos vegetativos (talos), involucran al menos un hongo heterótrofo (*micobionte*) y uno o varios organismos fotosintéticos (*fotobionte*) el/los cual(es) puede ser unicelular(es) o cenobial(es). En dicha asociación el hongo desarrolla un hábito macroscópico, generando un microambiente entre las hifas del hongo, lugar favorable para el desarrollo del alga o cianobacterias. Además, genera barreras físicas y químicas mediante la acumulación de metabolitos extracelulares, por ejemplo compuestos fotoprotectores, antioxidantes, antibacteriales, etc., permitiendo que el *fotobionte* cumpla su ciclo de vida y genere los azúcares necesarios para el metabolismo de la asociación, liberando oxígeno en el proceso (Barreno y Pérez-Ortega, 2003; Guzmán, 1994).

## 1.2 Morfología de los líquenes

El *micobionte* es generalmente determinante en la morfología de los líquenes y éstos son nombrados taxonómicamente de acuerdo a la especie de hongo. La morfología es extremadamente diversa; se pueden encontrar organismos de una gran gama de colores y puede ser de variados tamaños desde micro líquenes a largas estructuras, que están subdivididas en tres principales categorías; crustosos, foliosos y fruticulosos (Dayan y Romagni, 2011). El talo está formado por un córtex superior y uno inferior, una capa medular (*micobionte*), una capa algal (zona gonidial) en la que las células del fotobionte quedan englobadas por las hifas fúngicas y en algunos casos una capa rizoidal, que es la encargada de mantener una unión con el sustrato. Los talos crustosos carecen de córtex inferior y se encuentran íntimamente unidos al sustrato a través de sus hifas. Los fruticulosos suelen tener sólo un punto de conexión con el sustrato, del cual se ramifican de forma ascendente o pendular. Los talos foliosos, presentan córtex superior, bajo este se posiciona la zona gonidial, luego se desarrolla la medula organizada por un conglomerado de hifas unidas, finalmente un córtex inferior que se extienden por todo el sustrato, unidos de forma más laxa que los crustosos (Figura 1) (Hale, 1983). Al igual que los hongos, la mayoría de los líquenes muestran procesos de reproducción sexual y asexual. En la simbiosis líquénica el *micobionte* es el único que presenta una reproducción sexual (peritecios, apotecios, mazedios y lirelas), mientras que el fotobionte queda restringido a la reproducción asexual (soredios, isidios, esquizidios, filidios o lobulillos y blastidios). Los apotecios son ascas abiertas, tienen forma acopada o de disco. Se distinguen principalmente en 2 tipos: los lecanorinos, presentan un reborde originado por el talo del córtex superior y la zona del fotobionte y los biatorinos, con un reborde originado por las hifas del ascoma (fotografía 1). Mientras que las estructuras vegetativas; isidios, pueden ser laminares, marginales y planos (fotografía 2) (Barreno y Ortega, 2003).

### 1.3 Distribución de los líquenes

Se han determinado alrededor de 25.000 especies de líquenes con una amplia distribución, aunque tan sólo constituyen la vegetación dominante del 8% de la superficie terrestre (Barreno y Pérez-Ortega, 2003; Chapman, 2009). Son los primeros colonizadores de hábitat terrestres, con una distribución cosmopolita, desde la región Ártica hasta Antártica; desde el nivel del mar hasta las altas montañas; de los desiertos a regiones polares (Cubas *et al*, 2010; Taylor *et al*, 1995). Los líquenes han sido postulados como posibles y únicas formas vivientes con la capacidad de soportar las condiciones del planeta Marte (Guzmán, 1994). Son de crecimiento lento y logran vivir varios miles de años, según estudios realizados con C<sup>14</sup> (Denton y Karlén, 1973).

### 1.4 Compuestos liquénicos y biosíntesis

Los líquenes, al igual que las plantas superiores, producen metabolitos que se enfocan en el metabolismo primario (proteínas, lípidos, carbohidratos, y otros compuestos orgánicos). Además, producen una gran variedad de metabolitos secundarios (liquénicos) muchos de estos exclusivos de la asociación simbiótica, acumulados extracelularmente sobre las hifas y en la superficie del liquen (Mitrović *et al*, 2011), otorgando características únicas como distintivos colores, aromas y sabor. Estas moléculas, predominantemente pequeñas y estructuralmente complejas, comprenden sobre el 20% del peso seco del liquen (Muggia *et al*, 2009).

Se han identificado aproximadamente 1.050 compuestos liquénicos (Elix y Stocker -Wörgötter, 2008), principalmente comprendidos por depsidos, depsidonas, quinonas terpenicas, derivados del ácido pulvínico y triterpenoides (Galloway *et al*, 2001). Muchos de estos compuestos se identifican preliminarmente mediante análisis de comportamiento en cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (Huneck y

Yoshimura, 1996), mediante la extracción de solventes tales como benceno, éter etílico, cloroformo, acetona y metanol. Siendo el uso de solvente un factor importante para determinar una correcta elucidación de los compuestos fenólicos (Honda, 1997). Varios compuestos fenólicos han sido extensamente estudiados, debido a sus bioactividades, los cuales se utilizan en varios sistemas tradicionales de salud en el mundo, para curar eficazmente dispepsia, bronquitis, sarna, trastornos estomacales, espermatorrea, muchos trastornos de la sangre y corazón (Gupta *et al*, 2007). Se conocen muchas sustancias liquénicas derivadas de compuestos fenólicos (orcinol y  $\beta$ -orcinol, metil  $\beta$ -orcinolcarboxilato (MBO), etil hematomato (EH), antraquinonas (parietina), dibenzofuranos (ácido úsnico), depsides (ácido barbatico), depsidones (ácido picroliquenico)  $\gamma$ -lactonas (ácido protoliqueterinico, ácido neprosterinico), y derivados de ácido pulvínico (Gupta *et al*, 2007; Muggia *et al*, 2009). Los compuestos liquénicos poseen distintas funciones biológicas, tales como antioxidantes, antibióticos, herbicidas, aleloquímicos, protección frente a luz UV-B, tolerancia a la contaminación, actividad analgésica, antipirética, alérgenos, citotóxico, antitumoral y actividad antiviral, entre otras (Molnár & Farkas, 2010). Los compuestos anteriormente mencionados implica diversas vías de síntesis, las tres principales rutas son; acetato-polymalonato, ácido shikímico y ácido mevalónico (Figura 2, Elix & Stocker- Wörgötter, 2008) (Boustie & Grube, 2005;) La primera es la responsable de producir los compuestos típicos de líquenes depsides y depsidones, tales como dibenzofuranos, xantones, ácido úsnico, entre otros (Huneck, 1999), la ruta del ácido shiquímico, es la encargada de sintetizar metabolitos de la clase de las terfenilquinonas como el ácido polipórico y derivados del ácido pulvínico. La ruta del ácido mevalónico produce terpenoides y ésteres similares a los producidos por las plantas superiores (Pereira *et al*, 1999).

### 1.5 Usos y aplicaciones de los líquenes

Los líquenes han sido utilizados desde la antigüedad como medicamentos, fuente de alimento en tiempo de escases y como tinturas. Por ejemplo, en Europa se utilizaban los pigmentos de los líquenes para teñir prendas de vestir, pero perdieron interés cuando aparecieron los compuestos sintéticos, en la medicina oriental se utilizaban líquenes ricos en ácido úsnico como remedios para enfrentar la tuberculosis y para calmar síntomas como la fiebre (Okuyama *et al*, 1995) además se consumen en China como infusión. También, algunos pueblos originarios los usaron como tintes y para hacer artesanías (Vartia *et al*, 1973). Actualmente, el uso más importante es como indicadores de contaminación de un ecosistema. Sin embargo, los desafíos de hoy en la industria farmacéutica radican en descubrir y desarrollar nuevos fármacos, a partir de líquenes, como compuestos quelantes, pigmentos, antioxidantes, antibacterianos, etc. (Malhotra *et al*, 2009).



### 1.6 Actividad antibacteriana

Los microorganismos patógenos en humanos, animales y plantas, han logrado desarrollar resistencia a muchos antibióticos, como es el caso de la micobacteria que causa la tuberculosis (Boustie & Grube, 2005). Estos han llevado, a complicaciones clínicas severas, algunas producen micoroxinas y deterioran los alimentos (Rankovič *et al*, 2007a). Por esta razón, es necesario encontrar nuevos agentes antimicrobianos (Boustie & Grube, 2005), siendo claramente los líquenes una fuente interesante de estos compuestos. Actualmente, se han reportado investigaciones que sugieren que los compuestos liquénicos como dépsidos y depsidonas, podrían ser efectivos en el tratamiento de varias enfermedades causadas por microorganismos (Vinitha *et al*, 2012). Las propiedades antibacteriales de extractos liquénicos han sido conocidas desde hace varias décadas, es así como Burkholder *et al* (1944) realizaron un ensayo con varias

especies de líquenes, determinando que muchas de estas eran capaces de inhibir el crecimiento de bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*. Mientras Rankovič *et al* (2007a y 2007b), realizaron un ensayo de la actividad antimicrobiana donde la mayor actividad inhibitoria se observó utilizando como solvente metanol. Sin embargo, los estudios de actividad antimicrobiana de líquenes son escasos y dispersos.

La actividad antimicrobiana está correlacionada con los componentes fenólicos (Rankovič *et al*, 2010), atranorina, ácido lecanorico, erythrina, ácido meta depside sekikaico, el depsidone ácido lobarico, metil orsellinato y metil- $\beta$ -orcinolcarboxilato (MBO) (Vinita *et al*, 2012). La relevante actividad antimicrobial de algunos líquenes como *Umbilicaria cylindrica* probablemente depende de la presencia de dos depsidones, MBO y EH (Manojlovic *et al*, 2012).

Usualmente para determinar y comparar la actividad antimicrobiana de un compuesto o extracto, se utilizan métodos que se clasifican en cuantitativos y cualitativos. Los cuantitativos son aquellos que utilizan un dato estándar denominado mínima concentración de inhibición (CMI), el cual se considera el “gold standard”, es usado en diagnósticos de laboratorios para confirmar resistencias (Ramirez & Castaño, 2009). Se define como la mínima concentración de antimicrobiano ( $\mu\text{g/ml}$ ) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo, después de 24 horas de incubación a 37°C (Quintana *et al*, 2005). Mientras que los métodos cualitativos como discos de difusión son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente (Taroco *et al*, 2008). Este método se utiliza de manera frecuente en bacterias de rápido crecimiento (*Staphylococcus spp*, *Escherichia coli*, *Enterococcus spp*, *Enterobactriaceas*, *Pseudomonas spp* y otros bacilos no fermentadores) y algunas microorganismos fastidiosos (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus spp*, *Haemophilus spp*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Vibrio cholerae*, entre otros) (González, 2002). Es un método estandarizado por

el Laboratorio Internacional de Referencia: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (Prat, 2012). Esta técnica consiste en la distribución homogénea del antibiótico sobre los medios de cultivo sólido, posteriormente el antibiótico difunde por el agar creando un gradiente de concentración decreciente según se aleja del disco. La bacteria resulta susceptible cuando no crece en las inmediaciones del disco y se forma un halo de inhibición.

### **1.7 Actividad antioxidante**

Las especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS por reactive oxygen species) es un término colectivo que no incluye solamente a los radicales de oxígeno (superóxido e hidroxilo), también incluye a derivados no radicales desde el oxígeno molecular ( $O_2$ ) tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Un término similar, se les otorga a las especies reactivas de nitrógeno, que están siendo ampliamente utilizado, para determinar estrés oxidativos (Halliwell & Gutteridge, 1999; Huda-Faujan *et al*, 2009).

La producción de radicales a base de oxígeno es la pesadilla de todas las especies aerobias, estas moléculas tienen el potencial de causar una serie de eventos nocivos. Se generan principalmente en la cadena de transporte de electrones de la membrana interna de la mitocondria, por enzimas oxidoreductasa y por oxidación catalizada por metales (Le Bras *et al*, 2005). De esta manera, los radicales libres contribuyen a más de cientos de desórdenes en humanos, incluyendo a la aterosclerosis, la artritis, la isquemia, lesión del sistema nervioso central, gastritis, cáncer, entre otras. En los últimos años, se ha puesto mucha atención a compuestos antioxidantes naturales, los cuales tienen distintos mecanismos de acción, tales como unión de catalizadores de iones de metales de transición, descomposición de peróxidos, prevención de la continuación de

abstracción de hidrógeno, capacidad reductora y secuestradores de radicales libres (Kekuda *et al*, 2011).

Los antioxidantes, tanto sintéticos como naturales, poseen la capacidad de proteger el cuerpo de daños causados por los radicales libres inducidos por el estrés oxidativo (Souri *et al*, 2008). Sin embargo, la síntesis de antioxidantes tales como butilhidroxianisol (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), ácido thiobarbiturico (TBA), ácido gálico etc., han manifestado un efecto negativo a la salud, incluso algunos se les considera cancerígenos, logrando fuertes restricciones para sus aplicaciones (Barlow, 1990). En los últimos años, los esfuerzos radican en estudiar compuestos antioxidantes de origen natural y sus beneficios para la salud, tanto en sentido nutricional como terapéutico (Ali *et al*, 2008).

Varios métodos son utilizados para medir la actividad antioxidante de un material biológico, uno de los más comunes es el secuestro de radicales de oxígeno. Este método es muy popular debido a su facilidad, velocidad y sensibilidad para determinar la actividad antioxidante. La presencia de antioxidantes permite que desaparezca los radicales libres. Los métodos más utilizados con este principio es el ABTS y DPPH (Ali *et al*, 2008). Con la finalidad de comparar los resultados, es necesario realizar una curva de calibración con un antioxidante sintético, para estos análisis se utiliza ácido gálico y ácido ascórbico, respectivamente, entre otros.

Las propiedades antioxidantes de los líquenes, están en directa relación al contenido de fenoles (Mitrović *et al*, 2011), Nedeljko y sus colaboradores determinaron una fuerte actividad antioxidante del líquen *Umbilicaria cylindrica*, los cuales podrían atribuirse a su alto contenido de fenoles, de la misma manera Rankovič *et al* (2007), concluyeron que el líquen *Hypogymnia physodes* presentaba un alto contenido fenólico relacionado directamente con su actividad

antioxidante. Por lo tanto, los líquenes serían una fuente interesante de material biológicamente activo, para la utilización en farmacología (Toledo *et al*, 2004).

## **1.8. *Pseudocyphellaria flavicans* (Hook. f. & Taylor) Vain**

### **1.8.1 Estructuras morfológicas y sus funciones**

Posee morfología foliosa relativamente grande 2,5 a 20 cm de diámetro, presentan forma de rosetas orbiculares, irregularmente laciniados, monofoliosos, adheridos fuertemente al sustrato, margen entero, lobulado, presenta unas estructuras en las hifas denominadas pseudocifelas, los cuales son cavidades de 10 – 20  $\mu\text{m}$  de diámetro de color amarillo o blanco, que en algunas ocasiones se transforman en sorelios, estos permiten la entrada de  $\text{CO}_2$  hacia la zona gonidial, en ocasiones son del mismo color que la medula y producen reactivos como ácido lecanórico, (Hale, 1983). El córtex superior paraplectenquimático, de 20 a 40  $\mu\text{m}$  de ancho, cumple la función de proteger a las células algales de una rápida deshidratación y de los efectos negativos de la densidad de flujo de fotones fotosintéticos (PPFD) de alta intensidad, también se ha determinado que genera una resistencia a la difusión del  $\text{CO}_2$  (Valladares *et al*, 1995). El mencionado córtex está formado por una densa disposición de células del micobionte, a menudo fusionadas con sustancias gelatinosas de origen polisacárido (Jahns, 1984), estas sustancias de origen polisacárido entregan una protección adicional en respuesta a la desecación (Hale, 1976) La zona fotobiótica o gonidial ubicada entre el córtex superior y la medula, es de 20 a 50  $\mu\text{m}$  de ancho, en donde se posicionan los fotobiontes agrupados o en solitario. La medula de 65 a 360  $\mu\text{m}$  de ancho, de color amarillo, compuestas por hifas arregladas horizontalmente, es hidrófoba, facilita la movilidad del agua hacia la capa gonidial, es también la encargada de almacenar el anhídrido de carbono. El córtex inferior, de 10 a 45  $\mu\text{m}$ , es la capa más delgada del talo, desde el cual se forman los tomentos o rizoides que no siempre se distinguen, además es el encargado de transportar el

agua evaporada, hacia la medula, luego a la zona algal, y retiene la salida de agua en periodos de sequía. (Mondaca & Forero, 2006) (Fotografía 1. Imagen microscópica de *P. flavicans*).

### 1.8.2 Taxonomía

De acuerdo ficha de antecedentes de especie descrita por el ministerio de medio ambiente de Chile en el 2018, su distribución en Chile continental va desde la latitud 37°50'S, hacia el sur hasta Tierra del Fuego, además de Juan Fernández. También ha sido descrito para la Isla Mocha. Su clasificación taxonómica se presenta en la Tabla 1 (Muñoz & Casanova-Katny).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del líquen *Pseudocyphellaria flavicans*

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Ascomycetes
Orden	Peltigerales
Familia	Lobariaceae
Género	<i>Pseudocyphellaria</i>
Especie	<i>P. flavicans</i>

### 1.8.3 Distribución y hábitat

El género tiene distribución cosmopolita, constituida por 114 especies, estos crecen en ramas, cortezas, suelo o roca, este género es especialmente diverso en el hemisferio sur particularmente en mediana humedad y hábitat con bajas

temperaturas. Su mayor distribución se presenta en Sudamérica, con 54 especies, Nueva Zelanda 50 especies, región paleotropical 29 especies y Australia 39 especies. En Chile se han registrado una alta diversidad de especies, alrededor de 50, tales como; *Pseudocyphellaria aurata*, *P. bartlettii*, *P. berteroana*, *P. dissimilis*, *P. dubia*, *P. guzmanii*, *P. imbricatula*, *P. imshaugii*, *P. mooreana*, *P. neglecta*, *P. richardii*, *P. skottsbergii*, *P. flavicans*. Las mencionadas especies presentan distintos grados de conservación desde especie “rara” hasta “fuera de peligro”. (SINAB, 2010). *Pseudocyphellaria flavicans* (Hook. f. & Taylor) Vain. Es un líquen nativo de Chile que también se ha reportado en nueva Zelanda, Australia y Tasmania, siendo Chile el país que posee mayor distribución, desde tierra del fuego hasta la región del Bío- Bío. A pesar de su amplia distribución en Chile, no se encontraron trabajos sobre morfología, fisiología y química de este líquen.



#### **1.8.4 Química del género *pseudocyphellaria***

Presenta una gran variedad de compuestos tales como paradépsidos de la serie orcinol, depsidonas y triterpenoides, derivados del ácido pulvínico y de la ruta shikímico (Moncada y Forero, 2006). En Chile, los estudios de química de líquenes son muy escasos, aunque Bjerke y Elvebakk *et al* (2004), realizaron una comparación química y morfológica de los líquenes *Pseudocyphellaria endochrysa* y *Pseudocyphellaria vaccina*, indicando la existencia de diferencias en algunos compuestos químicos como pseudocyphellarina B. Además, según los autores mencionados anteriormente, el género *Pseudochoyphellaria* podría presentar una gran cantidad de compuestos bioactivos únicos.

## 1.9 Relación entre el ambiente con características químicas y morfológicas en los líquenes

La asociación simbiótica generada en los líquenes han permitido que se expandan y desenvuelvan en condiciones ambientales bastantes adversas, lugares donde los simbioses aislados no podrían sobrevivir (Pereira *et al*, 1999a). Por lo general, la gran mayoría de las especies liquénicas reconocidas morfológicamente poseen una composición química constante, sin embargo dentro de algunas especies se pueden diferenciar dos o más quimiotipos, que a su vez pueden ser ecológica o geográficamente distintos (Manrique, 1989). Jungbluth *et al* (2011) determinaron 4 quimiotipos dentro de la especie *Pyxine pungens*, que morfológicamente no presentaban diferencias a simple vista.

Distintos ambientes incrementan el estrés físico y biológico. Por ejemplo, los líquenes expuestos a factores estresantes tales como: alta radiación, sequías, presencia de patógenos, etc. Aumentarían la síntesis de compuestos fenólicos y con ello presentan una mayor bioactividad antioxidante y antimicrobiana (Molnár & Farkas, 2010; Manojlovic *et al*, 2012). Bhattarai *et al* (2008), concluyeron que los líquenes de la Antártica poseen mayor producción de fenoles totales, en comparación con líquenes nativos de regiones templadas y tropicales. Además, muchas características anatómicas y ecofisiológicas dependen de las condiciones ambientales (Gauslaa *et al*, 2006). Por ejemplo, el crecimiento de los talos dependen tanto de características físicas como el sustrato (rugosidad, porosidad, dureza), y condiciones ambientales tales como alta exposición a la luz, pH, presencia de partículas nocivas en el aire, alta y baja humedad (Pereira *et al*, 1999a). En el caso del grosor de los talos, el córtex superior, capa algal y la medula, incrementan en condiciones de alta luminosidad (Green y Lange, 1991. Anexo 9.3). Debido a los escasos estudios en la química y morfología de líquenes, es de alta importancia realizar estudios comparativos entre poblaciones

de líquenes distribuidas en ambientes variables, como es el caso del líquen *P. flavicans*, distribuido principalmente en la cordillera de la Costa (Parque Nacional Nahuelbuta y Monumento Natural Contulmo) y Precordillera de los Andes (Comuna de Ralco).

### **1.9.1 Características del Parque Nacional Nahuelbuta**

Se ubica en la cordillera de la costa, latitud 37° 49'15'' sur, longitud de 73° 02'03'' Oeste. Con una altitud entre los 900 a 1560 msnm. Su clima es templado-cálido, con 6 meses lluviosos y precipitaciones anuales que varían entre los 1000 y 1500 mm. El verano es seco y caluroso. La temperatura media es de 13 °C. Además entre los meses de junio y septiembre se presentan nevazones, con una humedad superior a un 80%.



### **1.9.2 Características del Monumento Natural Contulmo**

Se ubica en la comuna de Purén, provincia de Malleco, latitud 38° 01 Sur, longitud 73° 10'' Oeste. Con una altitud desde 175 hasta 500 msnm. Su clima es templado de verano seco con una corta estación de sequía. Permite la influencia marítima, aumentando la humedad en el sitio y de los vientos húmedos provenientes del Oeste, por esta razón presenta la más alta pluviosidad en comparación a otros sectores de la cordillera de Nahuelbuta. Las precipitaciones varían entre los 1.900 hasta más de 3000 mm anuales. La temperatura media anual es de 12,6° C y la humedad relativa media anual es de un 83 % (CONAF, 2012).

### **1.9.3 Características de la Reserva Nacional Ralco**

Se ubica en la provincia de Bío-Bío, latitud 37°51' Sur, longitud 71° 19' Oeste, con una altitud media de 1200 msnm. Presenta un clima templado húmedo, las

precipitaciones pueden sobrepasar los 2.000 mm, la precipitación invernal cae en forma de nieve. El verano es seco, cálido y de gran estabilidad atmosférica.

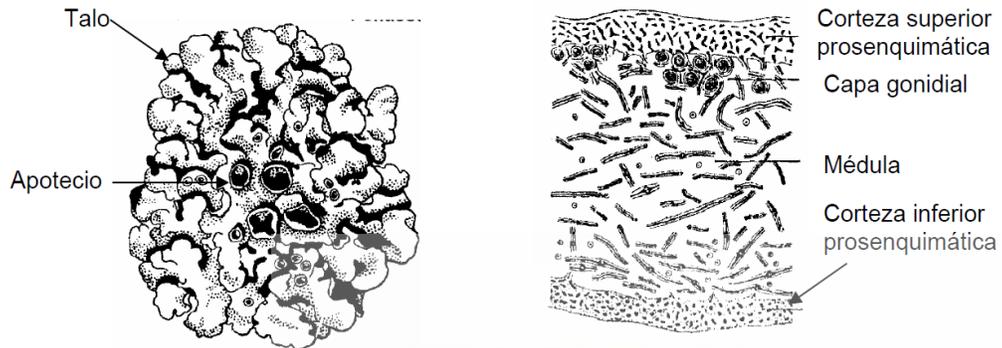


Figura 1. Morfología de líquenes foliosos

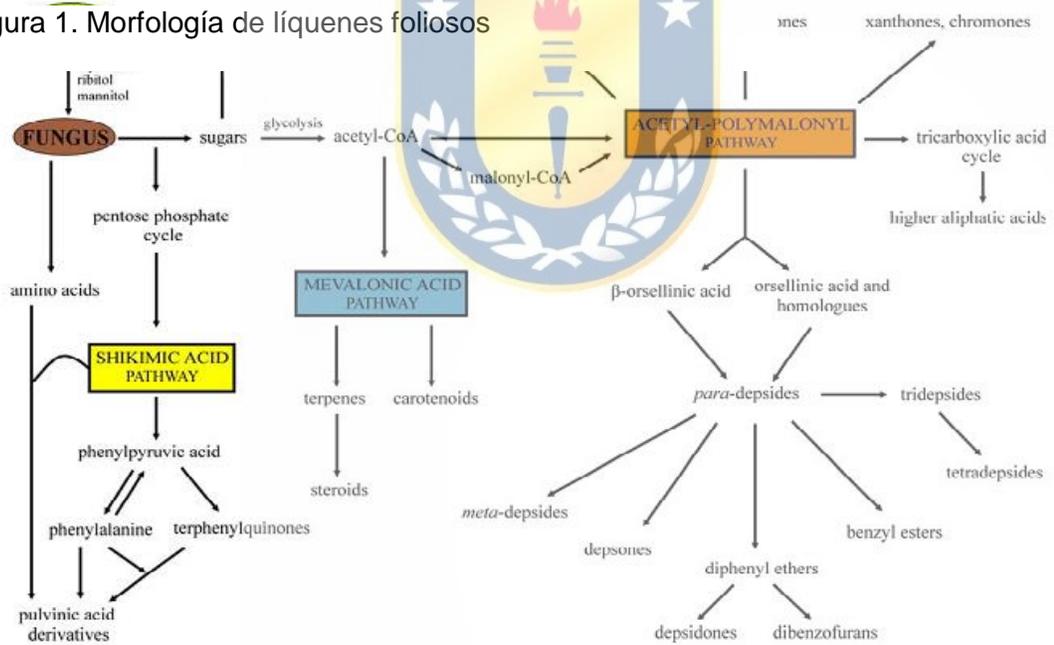
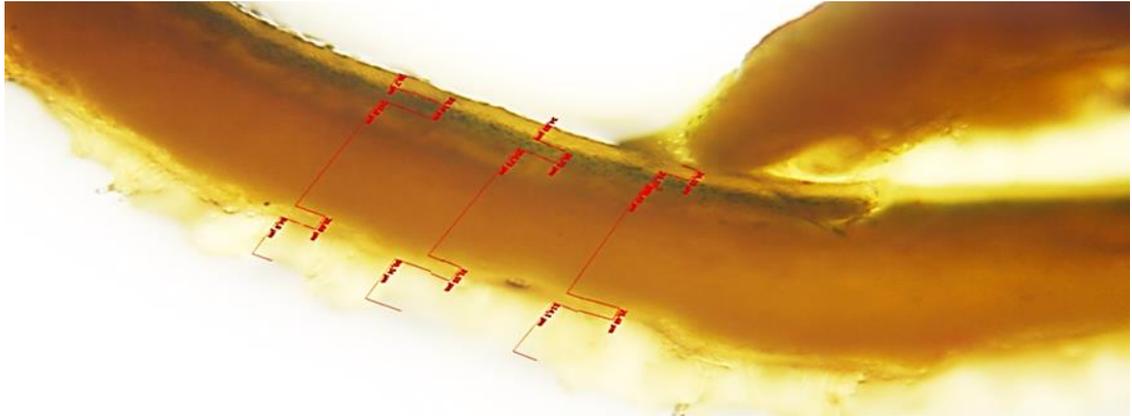
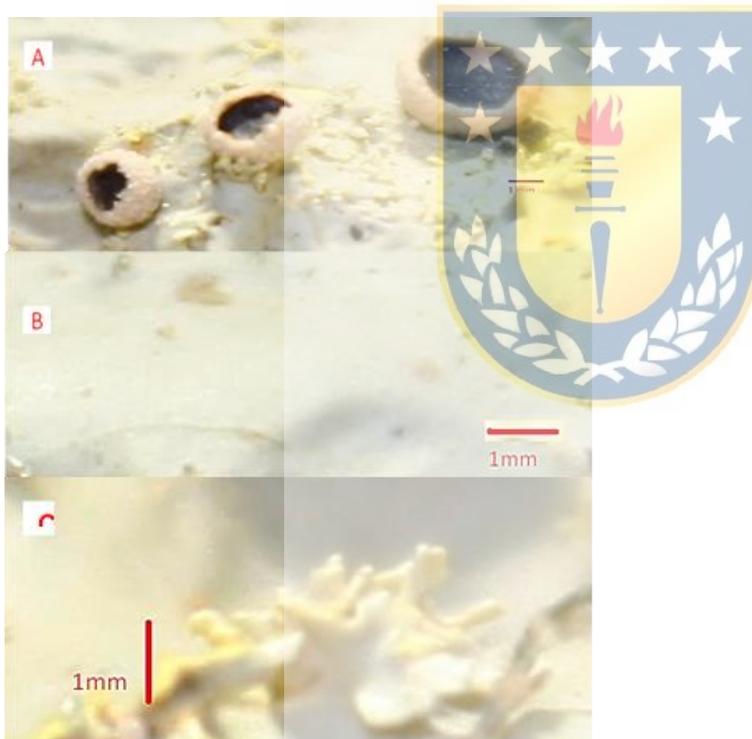


Figura 2. Vías de biosíntesis de metabolitos secundarios en líquenes (modificado de Elix y Stocker-Wörgötter (2008).



Fotografía 1. Imagen microscopia de *Pseudocyphellaria flavicans*. Objetivo 10x. Autor: Bravo G (2013).



Fotografía 2. Imágenes tomadas bajo lupa de estructuras reproductivas y de pseudocyphellas. Características de la especie *Pseudocyphellaria flavicans*, A. Apotecios, en forma de ascas. B. Isidios, de 1 a 2 mm de altura. C. Pseudocyphellas, pequeños orificios.

## 2. HIPÓTESIS

De acuerdo a la literatura revisada, los líquenes presentan en su composición química bio-compuestos únicos con potencial uso en alimentación y farmacología. Aunque los líquenes pueden variar notoriamente al encontrarse en sitios diferentes, generando muchas veces quimiotipos, que además son reflejadas en diferencias morfológicas. En virtud a lo mencionado, presentamos las siguientes hipótesis:

### **Hipótesis 1.**

El líquen *Pseudocyphellaria flavicans*, presenta compuestos bioactivos con características antioxidante y anti-bacteriana.

### **Hipótesis 2.**

Los individuos de *Pseudocyphellaria flavicans* de las poblaciones de Contulmo, Nahuelbuta (cordillera de la costa) y Ralco (pre-cordillera de los Andes), presentan diferencias en la composición química y en sus actividades biológicas (actividad antioxidante y antimicrobiana), relacionadas con diferencias morfológicas.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Detectar compuestos fenólicos relacionados con actividades biológicas, tales como; antioxidantes y antimicrobianas y sus variaciones cuando presentan diferencias en la composición química y en características macro-micromorfológicas en distintas poblaciones de *Pseudocyphellaria flavicans*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinación de grupos de compuestos mediante una marcha fitoquímica y cromatografía en capa fina (CCF),
- ❖ Comparación de estructuras reproductivas y grosor de las capas de los talos de cada población.
- ❖ Realizar ensayos de Fv/Fm *in situ* y comparar la apertura del dosel de cada sitio.
- ❖ Cuantificar Fenoles Totales, mediante la técnica de Folin-Ciocalteau (FC).
- ❖ Determinar actividad antioxidante mediante las técnicas del radical libre DPPH y ABTS, a partir de un extracto metanólico.
- ❖ Establecer ensayos antimicrobianos, mediante el método de difusión en disco.
- ❖ Identificar compuestos liquénicos mediante CLAR-UV.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Muestras de estudio

Las muestras fueron recolectadas por el tesista, en conjunto con investigadores del laboratorio de Anatomía y Ecología Funcional de Plantas de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles, lugar donde fueron almacenados en oscuridad y secos. Las recolecciones se realizaron en el Parque Nacional Nahuelbuta, el Monumento Nacional Contulmo, ambas de la región de la Araucanía, (pertenecientes a la cordillera de la costa) y en los alrededores de la comuna de Ralco, Región del Bío – Bío, ubicada en la cordillera de los Andes. La primera recolección fue de talos semi completos, durante el año 2012 (identificación, estudios preliminares químicos, análisis morfológicos), La segunda recolección fue de segmentos de talos, durante la primera semana de enero del 2013 (propiedades antioxidantes, antimicrobianas e identificación por CLAR-UV). Estos fueron identificados por el Doctor en botánica Reinaldo Vargas Castillo.



### 4.2 Apertura de dosel y Fv/Fm *in situ*

Se tomaron fotografías hemisféricas (Anexo 9.2). una fotografía por talo recolectado en cada sitio de extracción, estas fueron analizadas con el software Gap Light Analyzer (GLA), para calcular la apertura de dosel, y con ello conocer la luz incidente en los líquenes. Para determinar el Fv/Fm *in situ*, se utilizó un fluorímetro. Se midieron 10 talos escogidos al azar por sitio, el Fv/Fm *in situ* se calculó mediante el uso de un pulso de luz saturante ( $3500 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) por 1 s. Antes de cada medición de Fv/Fm, los talos fueron aclimatados a oscuridad por 30 min, mediante el uso de pinzas incluidas en el equipo, las mediciones se hicieron en triplicado por cada talo de *P. flavicans*.

### 4.3. Marcha fitoquímica

Se realizaron test de reconocimiento de metabolitos secundarios tales como; flavonoides, taninos, cumarinas, antraquinonas, saponinas y alcaloides. Donde se estableció, la presencia o ausencia de los metabolitos secundarios, según los métodos de Martínez y Cuellar (2002).

Para el reconocimiento de flavonoides, se realizó una extracción metanólica del material vegetal, luego esta se filtra en algodón, y se sometió a HCl/Mg y a HCl/Zn. A partir, del color de la reacción se determinó la presencia de flavonas (anaranjada), o flavonoles (cereza).

Para la determinación de taninos, se realizó una extracción acuosa, más 3 gotas de reactivo de FeCl<sub>3</sub> al 5 %. A partir, del color o precipitado en la solución resultante, se determinó la presencia de taninos pirocatéquicos no hidrolizables (verde) o taninos pirogálicos hidrolizables (azul a negro).

Las cumarinas fueron analizadas mediante la agitación de 1 g de muestra seca con ácido sulfúrico (10%), luego se filtra por algodón, se extrae el filtrado con éter etílico y se decanta la fase orgánica en un tubo de ensayo para evaporar a sequedad. Posteriormente, se disuelve en agua caliente y se le agregan gotas de amoníaco. Finalmente se observa el tubo de ensayo mediante una lámpara UV fluorescente a 366 nm, la fluorescencia celeste indica la presencia de cumarinas.

El análisis de saponinas, se realizó mediante agitación de muestra vegetal con agua, la reacción es positiva, si se observa espuma persistente.

Las antraquinonas se analizaron mediante la reacción de Borntraeger, la muestra seca se disolvió en un solvente orgánico no polar como el éter o cloroformo, se trató agitando con una solución alcalina (hidróxido de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio). Se espera una coloración rojo rosado a cereza.

La determinación de alcaloides, se realizó mediante el tratamiento de la muestra seca pulverizada con un solvente orgánico poco polar (éter, cloroformo) en medio alcalino (NH<sub>3</sub>) se filtró, y luego se decantó la fase orgánica en vidrio reloj. Después de evaporar, al residuo se le agregaron gotas de ácido clorhídrico al 1%. Se verifica la presencia de alcaloides con la formación de precipitado con el reactivo de Lugol.

#### **4.4 Detección de metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina (CCF)**

Se utilizaron líquenes de las 3 poblaciones, los cuales se secaron en oscuridad, a temperatura ambiente, luego se realizó la extracción en tubos eppendorf donde se tomaron 5 mg de *P. flavicans* de cada población en 1 ml de metanol, posteriormente fueron almacenados a 4°C. El ensayo fue realizado según la metodología estándar de CCF, para metabolitos de líquenes formados por el hongo, descrito por CF Culberson y Kristinsson (1970), con pequeñas modificaciones. Se utilizaron placas cromatográficas unidimensionales CCF sílice de gel 60 F254 marca Merck de 16 x 7 cm, Sistema de solventes B (hexano/éter dietílico/ácido fórmico 130/80/20 v/v), E (ciclo hexano/acetato de etilo 75/25 v/v), G (tolueno/acetato de etilo/ácido fórmico 139/83/8 v/v).

#### **4.5 Extracción acetónica y metanólica**

Se realizaron las extracciones a partir de la relación de 0,01 g de muestra vegetal en 3 ml de solvente (acetona o metanol), se dejó macerando 1 hora. Luego se concentró mediante rota vapor, a 35° C en caso de la acetona y 50°C para metanol. Posteriormente, se evaporaron los restos de solventes en una estufa a 40 ° C. Finalmente se tomó 0,05 g de extracto seco y se le adicionó 50 ml de

solvente en un matraz aforado de 50 ml, para obtener una solución stock de 1 g/L, tanto para el extracto acetónico y metanólico.

#### 4.6 Determinación del contenido total de fenoles

La concentración total de compuestos fenólicos, fue determinada espectrofotométricamente de acuerdo al método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC). A partir de los extractos anteriormente preparados, se tomaron alícuotas para obtener distintas concentraciones (12,5; 25; 50; 80 µg/ml), luego se adicionó 1,25 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu marca MERCK, fue mezclado en un matraz aforado de 25 ml durante 1 min, posteriormente se agregó 5 ml de carbonato de sodio (20% v/v), previamente preparado, se aforó con agua destilada, para finalmente medir la longitud de onda en el espectrofotómetro Spectronic 20 a una longitud de onda de 765nm.

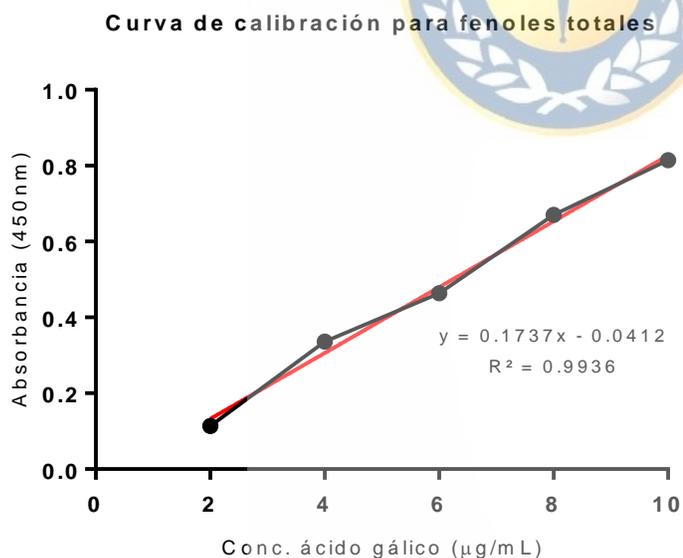


Figura 3. Curva de calibración de ácido gálico

Se realizó la curva estándar del ácido gálico (gráfico 1), para esto se pesaron 0,025 g de ácido gálico marca MERCK, se lleva a un matraz aforado y se afora en metanol, obteniendo una concentración de 1 g/L, Posteriormente se toman alícuotas de 50, 100, 150, 200, 250  $\mu$ L, llevándolas a un matraz aforado de 25 ml (obteniendo las siguientes concentraciones 2, 4, 6, 8,10  $\mu$ g/ml), luego se le agregó a cada matraz 1,25 ml del reactivo de Folin-Ciocalteau, fue mezclado en un matraz aforado de 25 ml durante 1 min, posteriormente se agregó 5 ml de carbonato de sodio (20% v/v), luego se aforó con agua destilada y se midió a 517nm. La curva fue realizada en duplicado.

#### **4.7 Análisis morfo-anatómicos**

Se comparó el número de isidios y apotecios de 5 talos seleccionados al azar por cada población. Las estructuras reproductivas fueron contadas bajo lupa, dentro de 1 cm<sup>2</sup>, a 3 cm desde el margen derecho e izquierdo y 1 cm desde el la parte más angosta del talo. Se realizaron cortes transversales en cada uno de los líquenes utilizando bisturí, desde el lado más largo de los talos, cada 3 cm desde la derecha e izquierda. Se tomaron fotografías de los cortes, utilizando el microscopio Carl Zeiss Primo Star, con un objetivo de 10X, equipado con cámara óptica CANON EOS REBEL XS. Luego, mediante el programa EOS utility se midió el diámetro de las capas del liquen; Córtex superior, capa algal, medula, córtex Inferior y rizoides.

#### **4.8. Determinación de polifenoles mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)**

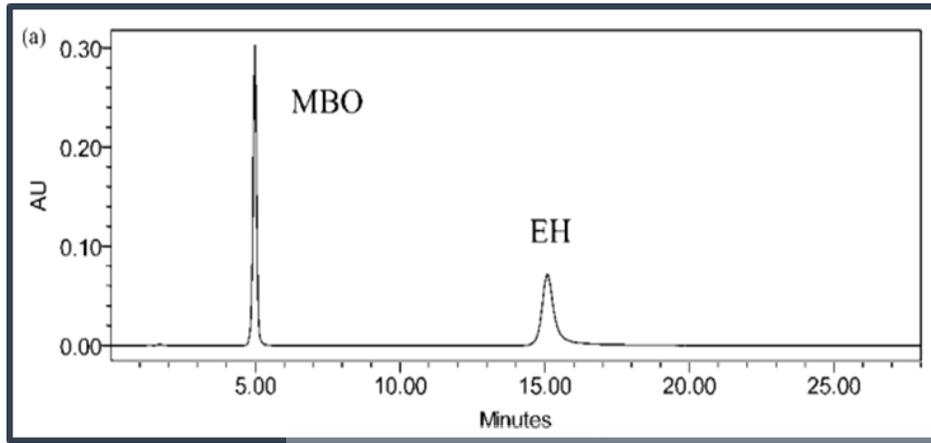
##### **4.8.1. Preparación de la muestra**

Se realizó un ensayo preliminar de un extracto de *P. flavicans* de Nahuelbuta, utilizando como solvente metanol grado técnico, con el fin, de verificar la

existencia de los polifenoles en estudio. Posteriormente se realizó un ensayo con 1.0 g de *P. flavicans* de Nahuelbuta en 50 ml de etanol grado farmacéutico, se dejó macerando en frío durante una noche, en una pieza oscura. El extracto fue filtrado en papel filtro whatman N°1 y se concentró a 40°C en rotavapor, modelo HB10 digital. Luego el extracto es disuelto en 1 ml de metanol grado CLAR.

#### **4.8.2. Sistema de CLAR y condiciones de la cromatografía**

Se utilizó el equipo de CLAR Agilent Technologies 1200 series del Centro de Desarrollo Tecnológico Agroindustrial (CDTA), de la Universidad de Concepción, Los Ángeles. Consiste de un sistema con unos 1515 suministros de solventes. Con una Columna Symmetry C<sub>18</sub> G1315D (150 x 4.6 mm, 5 µm), acoplada con el detector UV G 1316A. Los datos obtenidos fueron procesados usando el software "Waters EmpowerPro chromatographic". La fase móvil consistió en una mezcla de (A) Acetonitrilo – (B) H<sub>2</sub>O (0,1% AcOH) (50:50 v/v), la cual fue filtrada, desgasificada por sonicación. Para la columna, la temperatura fue de 28° C y un flujo de 1.0 ml/min. Los componentes se midieron a 265 nm, en este ensayo se realizó una medición cualitativa de los componentes de MBO y EH, mediante comparación de sus peak y tiempos de retención (Cromatograma 1). La metodología utilizada fue de acuerdo al trabajo realizado por Gupta *et al* (2007), con sutiles modificaciones.



Cromatograma 1. Peaks y tiempos de retención de MBO y EH utilizados por Gupta *et al*, 2007.

## 4.9. Análisis antimicrobiano

### 4.9.1. Material vegetal, microorganismos y antibióticos

Se utilizaron talos de líquenes de las 3 poblaciones, Contulmo, Nahuelbuta y Ralco. La extracción se realizó utilizando metanol, de igual manera a como se desarrolló en el punto 4.5. Se efectuó un ensayo preliminar con el extracto de Contulmo, utilizando concentraciones de 400 µg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml y 90 mg/ml. Posteriormente se utilizaron concentraciones de 0,8 mg/ml, 1 mg/ml y 2 mg/ml en todas las poblaciones. Para comparar la concentración crítica, que es necesaria para inhibir el crecimiento de la bacteria. Los microorganismos utilizados fueron la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* y la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*. Este material biológico fue proporcionado por el Hospital “Víctor Ríos Ruiz” de la ciudad de Los Ángeles.

### 4.9.2 Medios de cultivo

Para cultivar en el medio sólido *S. aureus*, se utilizó el medio cerebro corazón en agar, el cual se preparó de la siguiente manera: 37 gramos del medio cerebro

corazón más 15 gramos de agar en 1000 ml de agua destilada. Mientras que para *E. coli*, se utilizó el medio EMB (con agar incluido), donde se pesó 37 gramos en 1000 ml de agua destilada. A su vez, se prepararon medios líquidos de crecimiento para las bacterias que constaba del medio cerebro corazón sin agar y el medio EMB (sin agar). Todos los medios fueron autoclavados durante 30 min aprox, a 1atm de presión a 121° C, y posteriormente almacenados a 4°C.

#### **4.9.3 Preparación de placas y pre-cultivos de microorganismos**

El ensayo antibacterial se llevó a cabo usando el método de difusión en agar sólido (Khan *et al*, 2007), Se agregaron 20 ml aproximadamente en las placas petri y se almacenaron a 4°C. Mientras que las bacterias fueron pre-inoculadas en un cultivo líquido para su crecimiento (medio cerebro corazón y EMB), durante 48 horas a 37°C.

#### **4.9.4 Determinación de la actividad antibacterial**

Se tomaron bacterias del medio de cultivo líquido y se llevaron a placas petri con medios sólidos preparados anteriormente, 0.1 ml del cultivo líquido se esparció con un asa de Drigalsky de vidrio, bajo cámara de flujo horizontal. Posteriormente se introduce un disco de papel filtro Whatman (6 mm de diámetro), impregnado con 10 µL de las distintas concentraciones de extractos y con 10 µL de metanol como control negativo. Luego las bacterias se dejan cultivar durante 48 horas a 37° C, midiendo el halo de inhibición (diámetro en milímetros) cada de 24 y 48 horas. El diseño experimental correspondió a 3 réplicas (placas petri) por cada concentración y 3 subreplicas (discos) por cada placa petri. Cada placa contiene un control negativo que corresponde a 1 disco impregnado con metanol (Anexo 9.4, Figura 6).

#### **4.9.5 Curva de antibióticos estándares, control positivo**

Los antibióticos estándares utilizados fueron Ampicilina para *S. aureus* y Estreptomina para *E. coli*, los cuales fueron facilitados por el laboratorio de Bioquímica de la Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. Las curvas se realizaron en triplicado con las siguientes concentraciones de antibiótico: 0,2; 0,5; 2,5; 5; 10; 15; 50 mg /ml.

#### **4.10 Actividad antioxidante**

##### **4.10.1 Determinación de secuestro del radical libre DPPH**

El método utilizado fue de acuerdo a Takao *et al* (1994), con sutiles modificaciones. Se disolvieron 8 mg de DPPH marca Merck en 100 ml de metanol, para obtener una concentración de 80 µg/ml, luego se ajustó la longitud de onda de la absorbancia (0,70 a 0,90). Simultáneamente se realizó una dilución stock de 2 mg/ml del extracto liquénico de cada población. A partir de la solución stock se realizaron diluciones para obtener las siguientes concentraciones; 5, 40, 200, 400, 500, 1000 y 2000 µg/ml, de cada solución se tomaron alícuotas de 2 ml y se mezclaron con 2 ml de DPPH (80 µg/ml), se dejó incubando por 30 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 517 nm en el espectrofotómetro UV-Visible Genesys. Como blanco se utilizó metanol al 95%, control negativo se utilizó la solución de 2 ml de metanol con 2 ml de DPPH, mientras que control positivo ácido gálico (estándar), se realizó con la finalidad de comparar y expresar la capacidad antioxidante del extracto liquénico en metanol grado técnico, para ello se realizaron 2 curvas de calibración utilizando diferentes concentraciones del estándar ácido gálico (0,3 µg/ml, 0,6 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml y 3 µg/ml), evaluando la absorbancia y el porcentaje de inhibición de DPPH. Las curvas de

calibración se realizaron en duplicado (Figura 4).

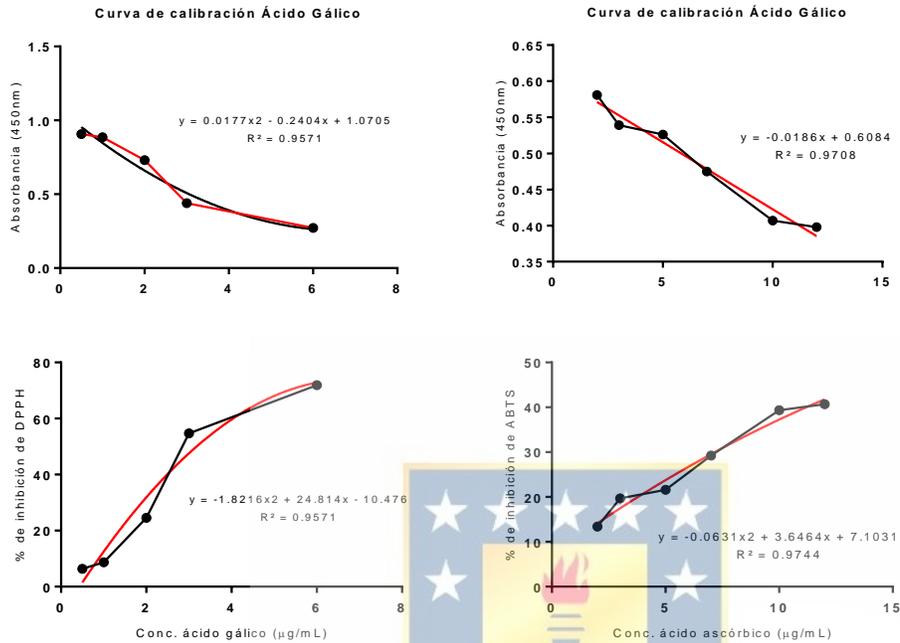


Figura 4. Curvas de calibración e inhibición de ácido gálico y ascórbico.

#### 4.10.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS

La medición de la capacidad antioxidante se realizó de acuerdo al método de Miller *et al*, 1995. Fue utilizado el radical libre ABTS•+, y el radical se obtuvo mediante la reacción de ABTS (7 mM) con per sulfato potásico (2,45 mM, concentración final) dejando incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16h. Este reactivo se mantuvo activo por 3 días. Se diluye con etanol y se ajustó la absorbancia comprendida entre 0,70 (±0,02) a 734 nm, en Espectrofotómetro Spectronic 20. La absorbancia se midió a 60 s después de la adición de 2,0ml de la solución ABTS•+ a 175µL de distintas concentraciones del extracto liquénico. La disminución de la coloración se expresó en porcentaje de inhibición de ABTS, la cual es comparada con una curva estándar del antioxidante sintético de referencia ácido ascórbico (gráfico 2), la cual se realizó en duplicado. Los resultados se expresan como µg de ácido ascórbico soluble en metanol

equivalente por gramo de muestra fresca. Como blanco se utilizó metanol, control negativo ABTS sin los 100 µL de ácido ascórbico.

#### 4.10.3. Cálculos de secuestro de radical libre DPPH y ABTS.

Las curvas de ABTS se ajustaron a regresión lineal, mientras que las curvas de DPPH se ajustaron a regresión polinomial. La actividad de secuestro del extracto fue calculado usando la Fórmula 1. Donde  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia del control negativo,  $A_{\text{muestra}}$  absorbancia de la mezcla de DPPH y extracto/estándar (ácido gálico). Se calcula el valor IC50, mediante el software Excel 2010, donde el IC50 equivale a la concentración de extracto requerida para secuestrar el 50% del radical libre DPPH o ABTS. Los ensayos se realizaron en triplicado.


$$\% \text{ de inhibición} = \left( \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \right) * 100$$

**Fórmula 1.** Para calcular, el porcentaje de inhibición del extracto en el radical libre DPPH y ABTS.

#### 4.10.4 ensayo de cinética del extracto metanólico en DPPH y ABTS.

Para determinar el comportamiento del extracto liquénico metanólico en el tiempo, se mezclaron 2 ml utilizando IC50 de cada población obtenido en el ensayo de secuestro del radical libre DPPH, anteriormente realizado con 2 ml de DPPH en metanol 0,09 mM. Se midió su absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro en intervalos de 5 minutos durante 150 minutos. Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la fórmula 1. Donde el control negativo fue DPPH más metanol y como blanco el solvente metanol.

En el caso de ABTS, se mezclaron 2 ml de metanol, más 175 µL del IC50 de cada una de las poblaciones, se midió la absorbancia a 734 nm en espectrofotómetro Spectronic 20, en intervalos de 5 minutos durante 150 minutos.

Para calcular el porcentaje de inhibición se utilizó la fórmula 1. Donde el control negativo fue 2 ml de ABTS más 175 µL de metanol y como blanco el solvente metanol. Los ensayos de cinética se realizaron en triplicado, obteniendo una curva promedio de cada población usando el radical libre DPPH y ABTS.

#### 4.11. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se realizaron con comparaciones múltiples, en ANOVA con test de Tukey. Para los datos no paramétricos se utilizaron dunnett´s y kriskal-wallis. Mediante el software STATISTICA 10.



#### 5.1 Marcha fitoquímica

Los resultados de los ensayos de reacciones de coloración, sobre los talos liquénicos de *P. flavicans* de Nahuelbuta. Indican la presencia de compuestos taninos, fenoles, flavonoides, antraquinonas y alcaloides (Tabla 2).

Tabla 2. Metabolitos secundarios identificados en individuos de *P. flavicans*.

Metabolito Secundario	Resultado de la reacción
Taninos y fenoles	+
Cumarina	+
Saponinas	-
Flavonoides	+
Antraquinonas	+
Alcaloides	+

+:Reacción positiva, -:Reacción negativa.

## 5.2 Fenoles totales

Mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu, los resultados de la Tabla 3 indican que no existen diferencias significativas en la extracción de fenoles, utilizando como solvente metanol o acetona.

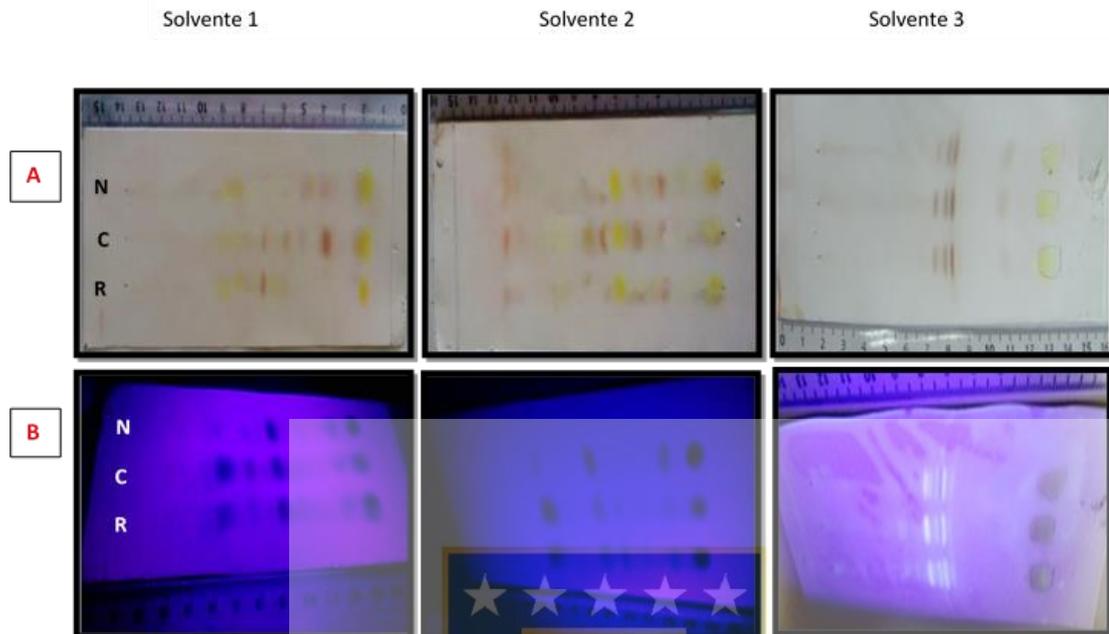
Tabla 3. Concentración de fenoles totales, en extractos liquénicos metanólico y acetónico.

Extracto	Fenoles totales ( $\mu\text{g}$ de ácido gálico /mg de extracto)
Metanólico	$82.10 \pm 12.83^a$
Acetónico	$62.22 \div 9.52^a$

Letras iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas (Tukey  $p < 0.05$ ).

## 5.3 Detección de metabolitos en cromatografía en capa fina

A partir, del índice de referencia (ir), la presencia del color y fluorescencia bajo luz UV, es evidencia de la presencia de fenoles, taninos, carotenoides, entre otros. Además se determinaron algunas diferencias en la presencia e intensidad de manchas entre las poblaciones en estudio (Fotografía 3).



Fotografía 3. Placas cromatográficas TLC. A. Luz visible y B. Bajo luz Ultravioleta. N: Nahuelbuta, C: Contulmo y R: Ralco. Utilizando distintos solventes de arrastre. Solvente 1 (Tolueno, etil acetato, ácido fórmico); Solvente 2 (Ciclo hexano, etil acetato); Solvente 3 (Tolueno y Ácido acético).

#### 5.4 Análisis morfo-anatómicos

Los resultados de la Tabla 4 indican que existen diferencias significativas en las características morfológicas y en la anatomía de los talos en las poblaciones de *P. flavicans*. El grosor total del talo, la médula y de los rizoides fue significativamente mayor en los individuos que se encuentran en la cordillera de la Costa. Sin embargo los talos de Contulmo mostraron una mayor semejanza a los de talos de Ralco en algunas capas (Anexo 9.1) (Tukey  $p < 0.05$ ).

Tabla 4. Grosor promedio de las distintas capas que forman la estructura líquénica de cada población.

CAPAS	NAHUEL BUTA	CONTULMO	RALCO
<b>Cortex Superior</b>	56,03 ± 14,51 <sup>a</sup>	34,24 ± 7,59 <sup>b</sup>	29,97 ± 6,83 <sup>b</sup>
<b>Zona Algal</b>	60,63 ± 25,53 <sup>a</sup>	39,18 ± 15,34 <sup>b</sup>	38,66 ± 13,06 <sup>b</sup>
<b>Medula</b>	309,6 ± 136,18 <sup>a</sup>	257,18 ± 65,21 <sup>a</sup>	149,95 ± 69,35 <sup>b</sup>
<b>Córtex Inferior</b>	48,05 ± 20,74 <sup>a</sup>	33,88 ± 14,39 <sup>b</sup>	31,49 ± 16,83 <sup>b</sup>
<b>Rizoides</b>	70,55 ± 49,65 <sup>a</sup>	103,00 ± 55,00 <sup>a</sup>	35,13 ± 24,54 <sup>b</sup>
<b>Grosor Total</b>	544,85 ± 182,03 <sup>a</sup>	467,50 ± 105,32 <sup>a</sup>	285,19 ± 171,09 <sup>b</sup>

Los valores están indicados en  $\mu\text{m}$ . Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey  $p < 0.05$ ).

Se determinó mayor número de isidios en las poblaciones de Nahuelbuta y Ralco (Figura 5), y no se determinó diferencias estadísticamente significativas en el número de apotecios, sin embargo, Ralco no presentó apotecios en ninguno de los talos analizados (Tabla 5).

Tabla 5. N° de estructuras reproductivas de cada sitio

Estructura reproductiva	Nahuelbuta	Contulmo	Ralco
<b>Isidios</b>	53 ± 23.71 <sup>ab</sup>	40 ± 19.15 <sup>b</sup>	65.67 ± 30.23 <sup>a</sup>
<b>Apotecio</b>	0.48 ± 1.19 <sup>a</sup>	0,76 ± 2.09 <sup>a</sup>	0 ± 0 <sup>a</sup>

Valor medio del número de órganos reproductivos junto a la desviación estándar. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey  $p < 0.05$ ).

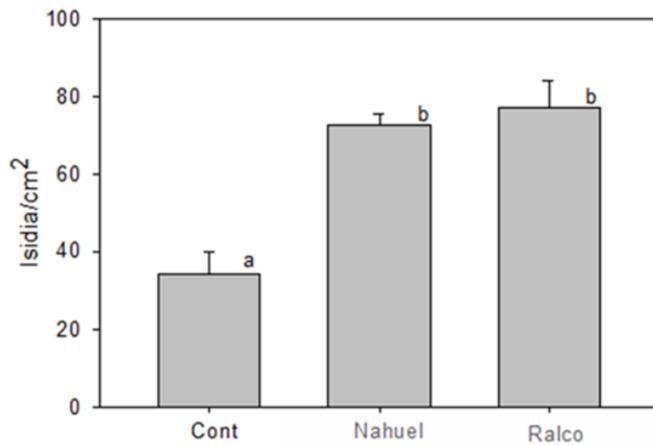


Figura 5. Gráfico de los isidios por población. Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey  $p < 0,05$ ).

### 5.5. Apertura de dosel y resolución fotosintética cuántica máxima del fotosistema ii *in situ*

Se determinó que existe un mayor  $F_v/F_m$  *in situ*, en los talos de Ralco, en comparación con las poblaciones de la cordillera de la costa (Figura 7). Además, Ralco presentó una menor apertura de dosel (Figura 6). Ver Anexo 9.2

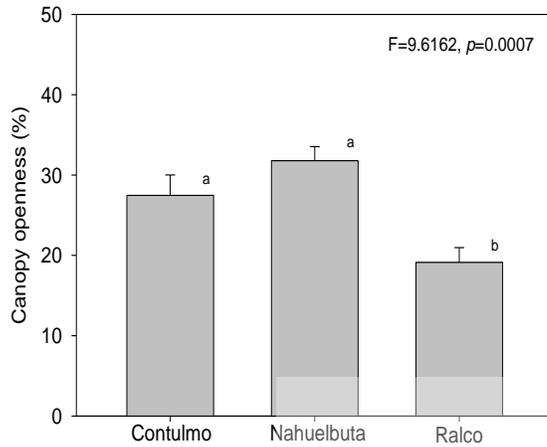


Figura 6. Gráfico de la apertura de dosel de cada sitio. Letras iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas, (Tukey  $p < 0.05$ ).

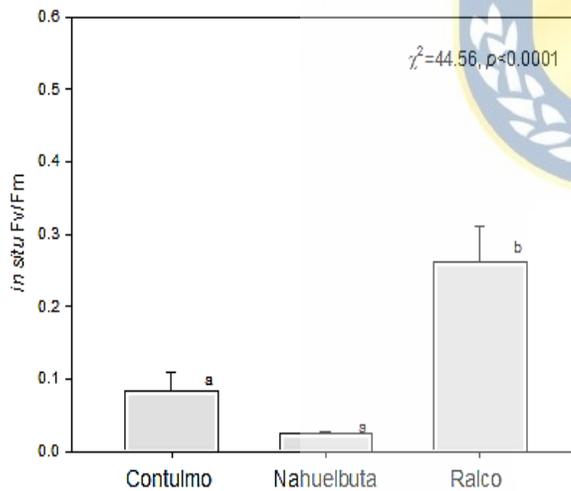
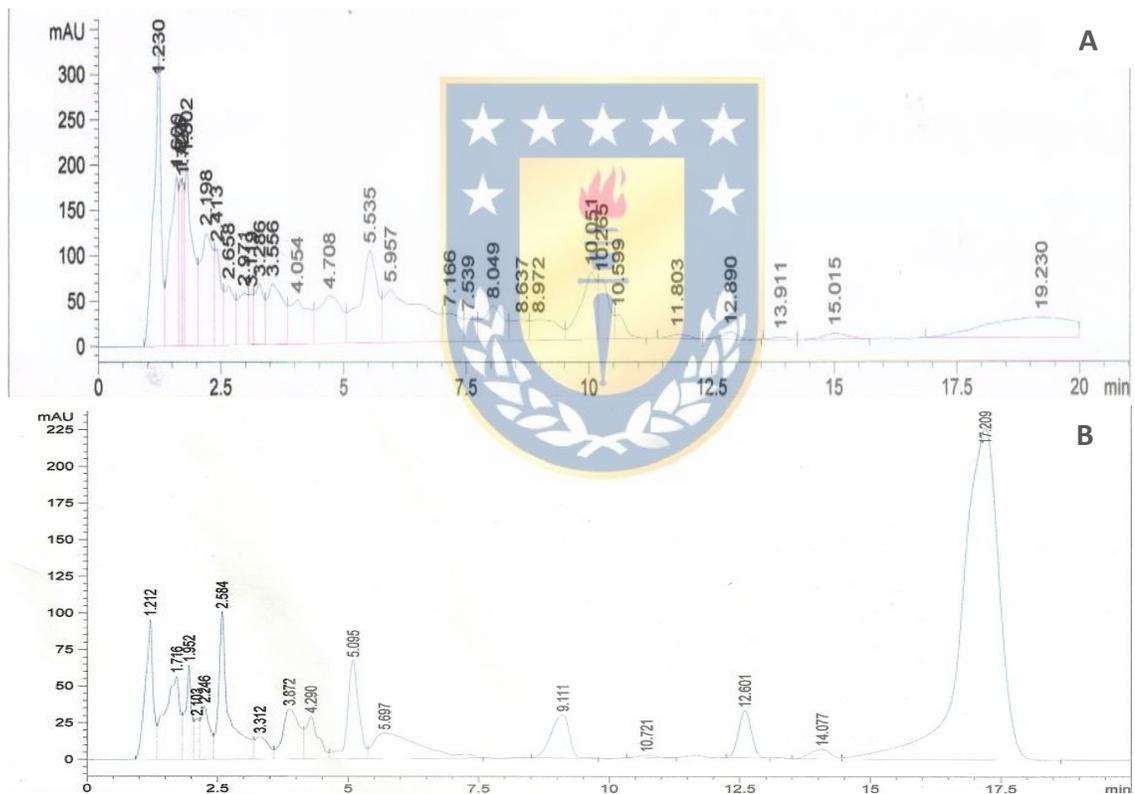


Figura 7. Gráfico del Fv/Fm de cada sitio. Letras iguales indican que no existe diferencias estadísticamente significativas, (Tukey  $p < 0.05$ ).

## 5.6. Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

De acuerdo a los datos arrojados por el ensayo en cromatografía líquida de alta resolución, y al compararlo con los resultados obtenidos por Gupta *et al* (2007) (Cromatograma 1), se presume la presencia del compuesto MBO en el extracto metanólico en los talos de *P. flavicans* de la población de Nahuelbuta (Cromatograma 2), Debido a que presenta un peak similar en el min 5.535 y el duplicado en 5,095 (para más detalle ver Anexo 9.7).



Cromatograma 2. Los diferentes picos y tiempo de retención obtenidos en un extracto metanólico de individuos de *P. flavicans* de Nahuelbuta (en duplicado).

### 5.7. Actividad antioxidante

Mediante los métodos de secuestro de radicales libres (DPPH y ABTS), se determinó que no existen diferencias significativas en el porcentaje de inhibición de los radicales libres de DPPH. Mientras, el secuestro de radicales libres de ABTS, indicó diferencias entre Contulmo con las otras poblaciones (Figuras 8 y 9, Tukey  $p < 0.05$ ). Además, los IC50 de las poblaciones no presentaron diferencias significativas en DPPH, solo en el caso de ABTS, entre la población de Contulmo que presentó un IC50 menor que en población de Ralco y cerca de la mitad del IC50 del extracto liquénico obtenido de las muestras de Nahuelbuta (Tablas 6 y 7, Tukey  $p < 0.05$ ). Los resultados se expresan como equivalente de  $\mu\text{g}$  de ácido gálico /mg de extracto.

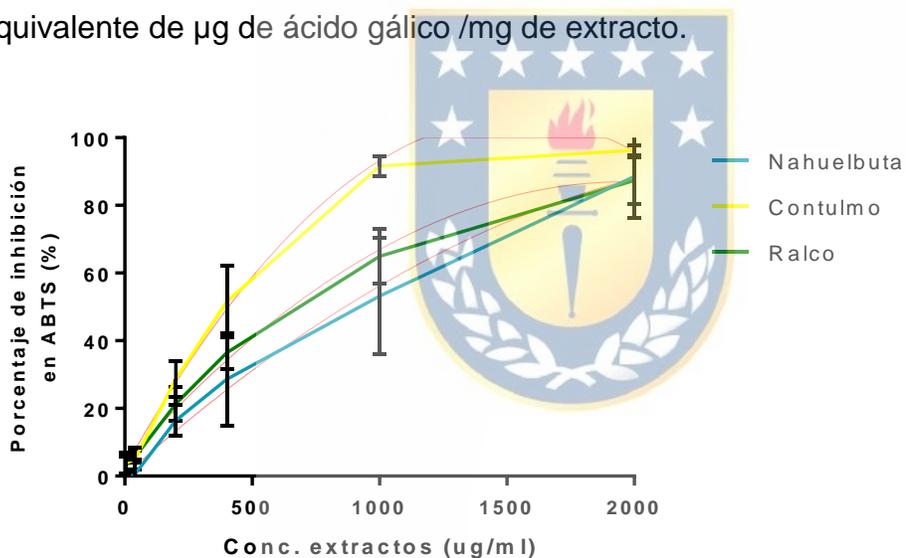


Figura 8. Curvas del porcentaje de inhibición en ABTS de cada población.

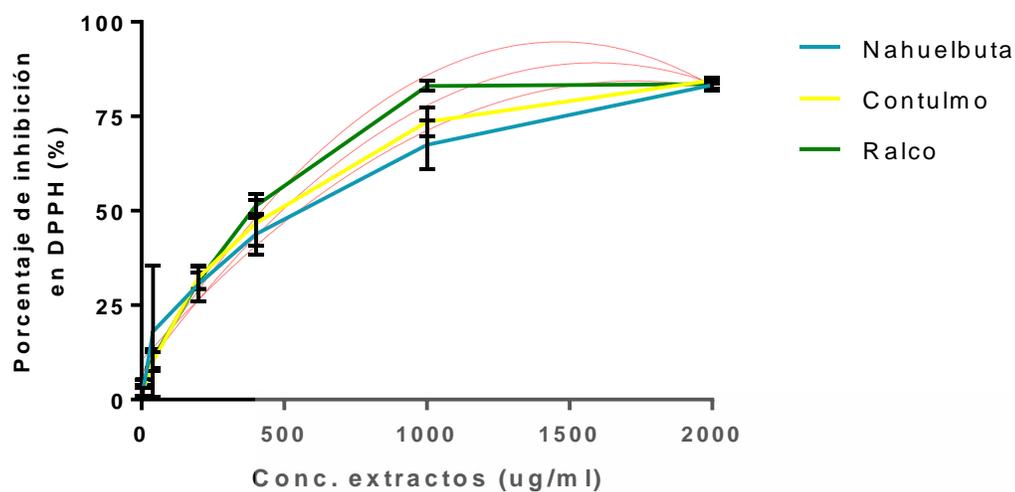


Figura 9. Curvas del porcentaje de inhibición en DPPH de cada población.

Tabla 6. IC50 de cada población en DPPH.

	IC50 DPPH (µg/ml).	Curva:	Ecuación de curva	R <sup>2</sup>
<b>Nahuelbuta</b>	575.78 <sup>a</sup>	Polinómica	$y = -3E-05x^2 + 0.0884x + 9.0465$	0.9765
<b>Contulmo</b>	483.82 <sup>a</sup>	Polinómica	$y = -3E-05x^2 + 0.1033x + 7.0441$	0.9829
<b>Ralco</b>	419.20 <sup>a</sup>	Polinómica	$y = -4E-05x^2 + 0.1202x + 6.6417$	0.9946
<b>Ácido gálico</b>	3,82 <sup>b</sup>	Lineal	$y = 12.685x + 1.5374$	0.9108

Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. (Tukey  $p < 0.05$ ).

Tabla 7. IC50 de cada población en ABTS

	IC50 ABTS (µg/ml)	Curva:	Ecuación de la curva	R <sup>2</sup>
<b>Nahuelbuta</b>	832.35 <sup>a</sup>	Polinómica	$y = -1E-05x^2 + 0.0678x + 0.4945$	0.9939
<b>Contulmo</b>	400.52 <sup>b</sup>	Polinómica	$y = -4E-05x^2 + 0.1348x + 2.427$	0.9981
<b>Ralco</b>	644.20 <sup>a</sup>	Polinómica	$y = -2E-05x^2 + 0.0847x + 3.736$	0.9974
<b>Ácido ascórbico</b>	14,72 <sup>c</sup>	Lineal	$y = 2.7672x + 9.3358$	0.9708

Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticamente significativas. Test de Tukey  $p < 0.05$ .



### 5.7.1 Cinéticas del porcentaje de inhibición de los radicales libres ABTS Y DPPH

Se observó una mayor actividad antioxidante en base al porcentaje de disminución del ABTS durante los primeros 40 minutos, alcanzando el 50% pasando los 50 minutos y tiende a mantenerse estable a lo largo del tiempo, se determinó diferencias significativas en las cinéticas de las poblaciones de Contulmo y Nahuelbuta (Figura 10, Tukey  $p < 0.05$ ). Mientras, que el ensayo realizado con el radical libre DPPH, el porcentaje de inhibición aumento durante los primeros 100 minutos y luego se comportó relativamente constante. Además, se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los individuos de Ralco y Contulmo (Figura 11, Tukey  $p < 0.05$ ).

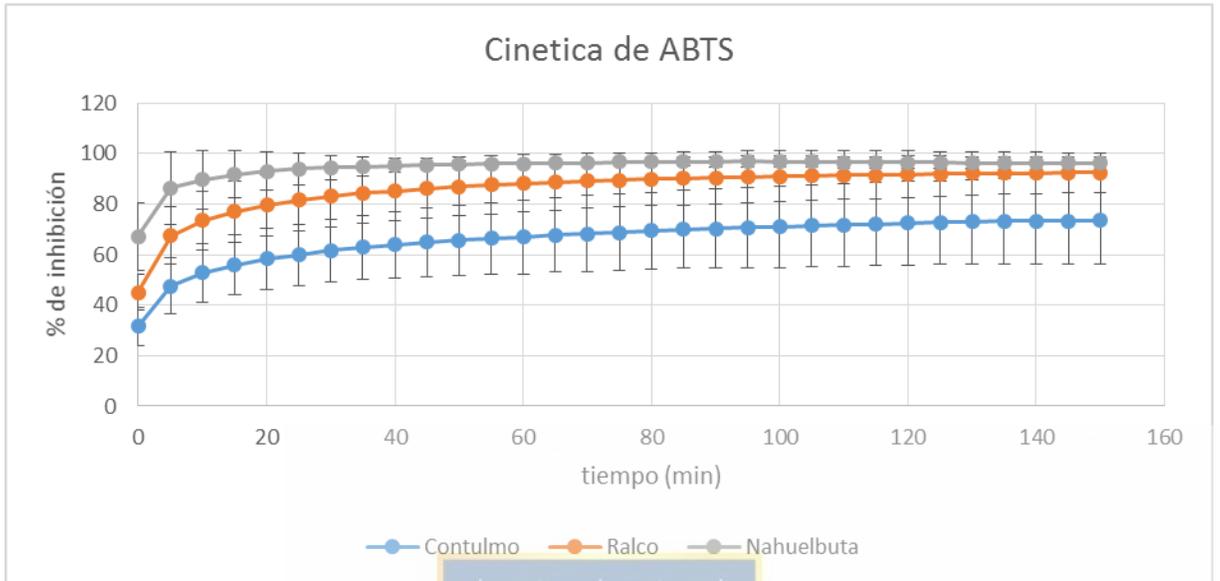


Figura 10. Curvas promedios de cinética del % de inhibición de ABTS .

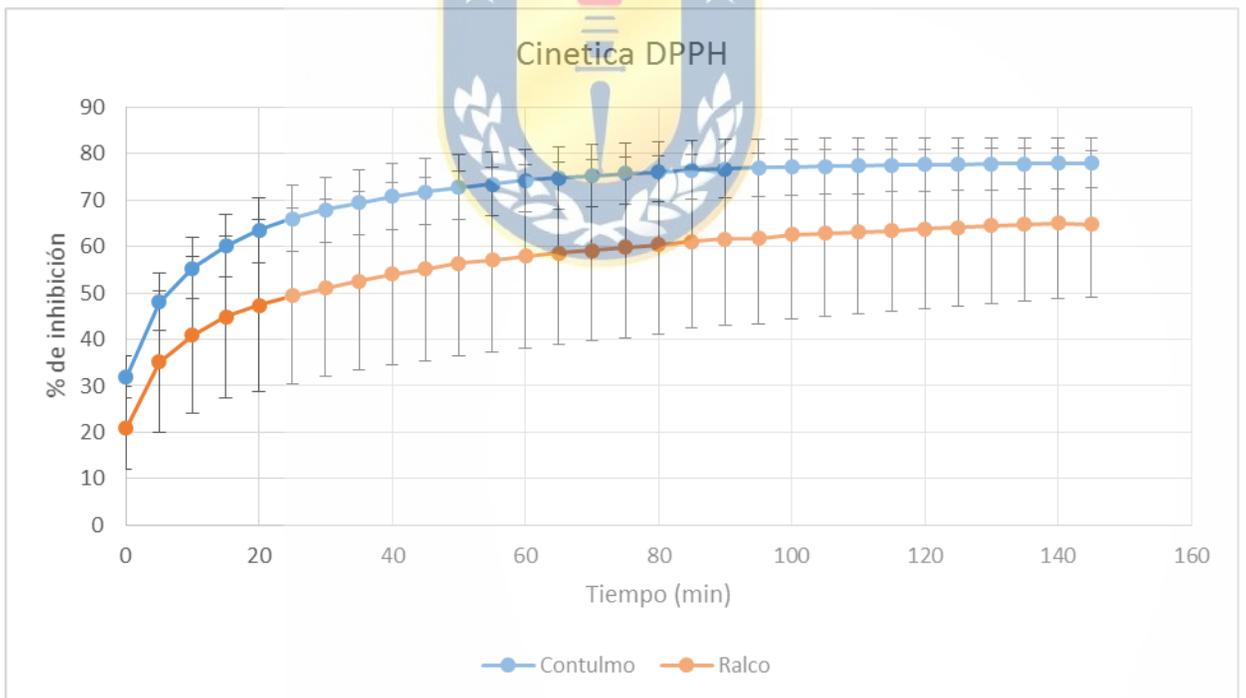


Figura 11. Curvas promedios de cinética del % de inhibición de DPPH.

### 5.8. Actividad antimicrobiana

Los resultados del ensayo de difusión en disco, indicó que las concentraciones iguales o mayores a 10 mg/ml del extracto metanólico de *P. flavicans* de Contulmo, presenta actividad inhibitoria de crecimiento en *S. aureus* (Figura 13, test de Tukey  $p < 0.05$ ). Obteniendo una mejor inhibición el antibiótico comercial. Mientras que en la Figura 12 se indica que en *E. coli* el halo de inhibición fue notoriamente menores a los halos de inhibición del antibiótico sintético estreptomycin. Se determinó que no existen diferencias significativas entre las poblaciones al momento de evaluar la capacidad antimicrobiana utilizando concentraciones menores a 1 mg/ml (Anexo 9.5, Tabla 9). Por lo tanto, los extractos líquénicos presentan una actividad inhibitoria en la bacteria *S. aureus* y *E. coli*, pero por debajo de la actividad de los inhibidores sintéticos probados en esta tesis.

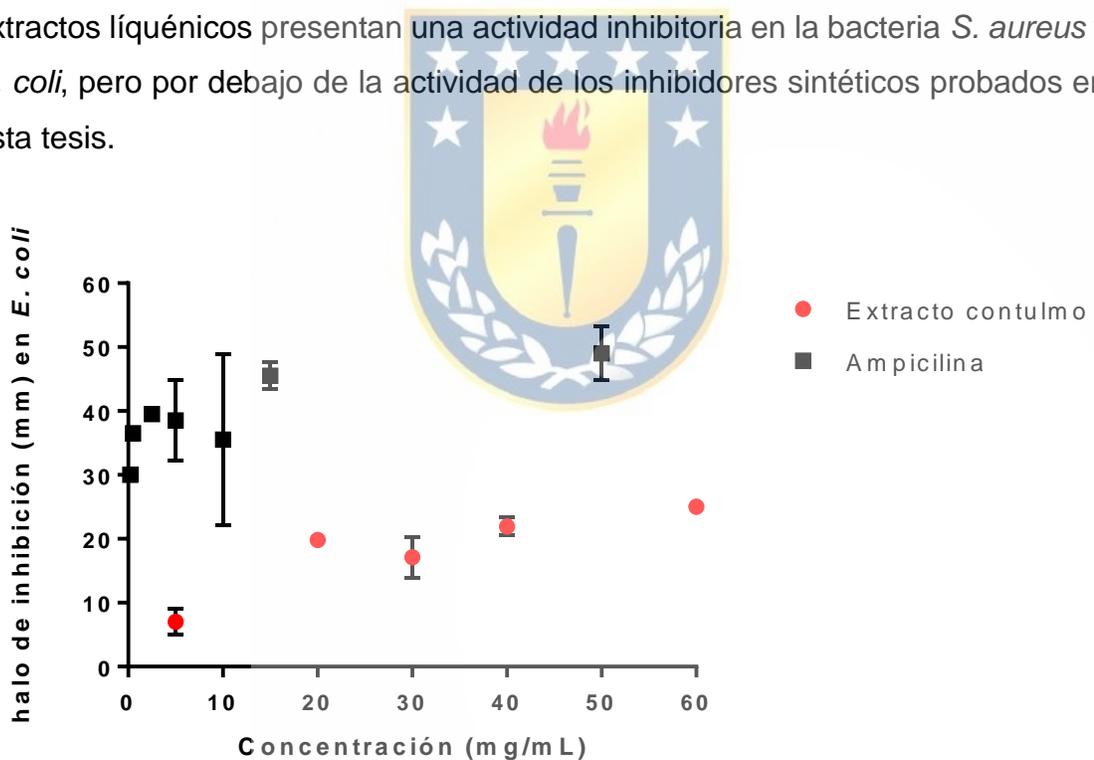


Figura 12. Gráfico de dispersión del halo de inhibición de *E. coli* en diferentes concentraciones (Tukey  $p < 0.05$ )

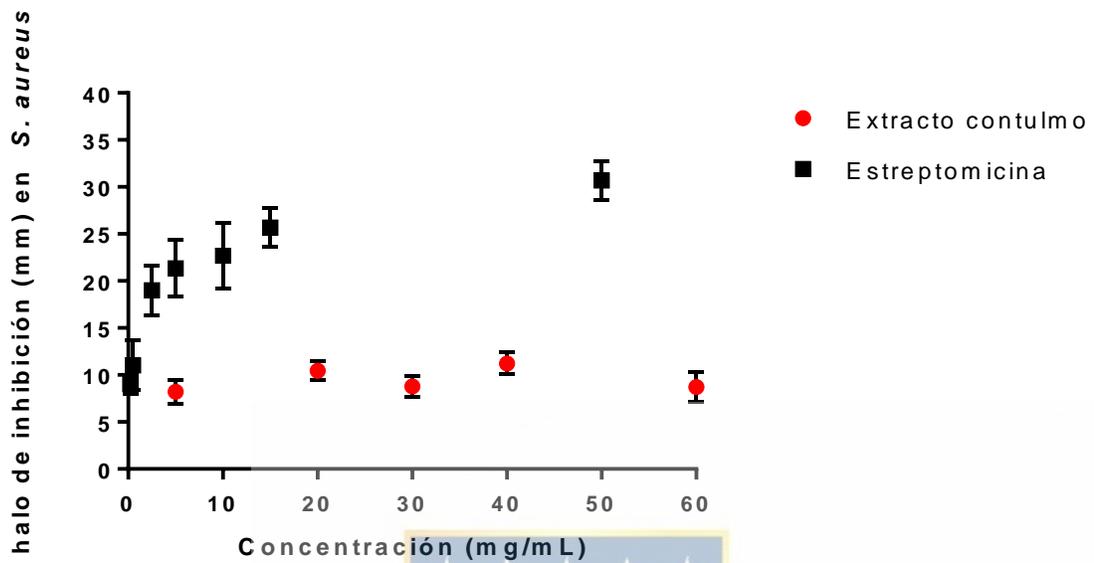


Figura 13. Gráfico de dispersión del halo de inhibición de *S. aureus* en diferentes concentraciones (Tukey  $p < 0.05$ ).

## 6. DISCUSIÓN

Los resultados de la marcha fitoquímica en los individuos de *P. flavicans*, reveló la presencia de taninos, flavonoides y de otros compuestos fenólicos, tales como cumarinas, antraquinonas y alcaloides presentando uno o más anillos aromáticos y grupos hidroxilos (Xiao *et al*, 2000). La presencia de pigmentos flavonoides, quienes entregan un color característico al líquen, se ha documentado que poseen características antimicrobianas (Lock, 1994). Las cumarinas poseen un amplio rango de actividades biológicas; antibacteriana, antibiótica, anticoagulante, entre otras. El uso de tintes de *P. flavicans* se puede explicar a la presencia de antraquinonas, debido a que se ha reportado sus propiedades tintóreas. Los alcaloides son ampliamente conocidos por sus múltiples actividades biológicas (Lock, 1994). Es bien conocido que los compuestos fenólicos poseen altos niveles antioxidantes, debido a su alta

capacidad de secuestrar radicales libres tóxicos y especies reactivas de oxígeno (Bhattarai *et al*, 2008). Además Rankovič *et al* (2010), determinaron que existe una correlación lineal entre el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante.

De acuerdo a nuestros resultados obtenidos el contenido total de fenoles es similar en algunas plantas superiores, en el trabajo de Eldeen *et al* (2011), se analizaron 7 especies del genero *Phyllanthus*, en los cuales el extracto metanólico y acetónico de *P. flavicans* fue mayor en 3 de las 7 especies de *Phyllanthus*. El contenido de fenoles totales en líquenes determinados por Mitrović *et al* (2011) y Rankovič *et al* (2010), utilizando metanol como solvente de extracción, son similares a los resultados obtenidos en este estudio.

Los fenoles totales determinados por la técnica FC sufren de varios efectos que interfieren en las sustancias presentes, ya que no solamente oxida a los compuestos fenólicos, sino que también otras sustancias. A pesar de lo anterior, el método aún es recomendado para medir el contenido total de fenoles. Además, los fenoles durante el proceso de extracción pueden producir modificaciones, o alteraciones cuantitativas dadas principalmente por el solvente empleado (Pereira *et al* 1999b). Dias y Urban (2009), demostraron que una extracción de dilactona y ácido pulvínico de *Candelaria concolor*, utilizando metanol, resultó en una mezcla de ácido vulpínico y calicina. Por lo tanto, el uso de solvente puede sobreestimar o reducir las reales características biológicas de un extracto. En este trabajo se realizó el cálculo de fenoles totales con distintos solventes para determinar que solvente utilizar para los ensayos biológicos (antioxidantes y antimicrobianos), bajo esa consideración la comparación realizada entre acetona y metanol no arrojó diferencias significativas en el contenido total de fenoles, por lo tanto, se seleccionó metanol. Además, de acuerdo al trabajo realizado por Behera *et al* (2005), en el cual se compara el uso de solventes, indicaron que el

uso de metanol como solvente presenta mejor arrastre y mayor extracción de fenoles que el uso de acetona.

Por otro lado, el efecto de la temperatura, provoca modificaciones en las estructuras de las sustancias liquénicas. Algunos compuestos son muy sensibles en el proceso de extracción, el uso de altas temperaturas al momento de extraer los compuestos, pueden provocar hidrólisis y descarboxilación de depsidos. En algunos casos se producen metilaciones, provocando una disminución en su actividad biológica (Culberson *et al* 1977).

En tanto, el análisis en cromatografía en capa fina, indico diferencias en las tres poblaciones, tanto en presencia de compuestos como en sus índices de referencia, nuestras observaciones se basan principalmente en que existan diferencias de compuestos liquénicos entre poblaciones y no en la identificación de cada uno de los compuestos revelados, esto dado a que no se contó con la información necesaria para este análisis.

De acuerdo a lo anterior, se determinó que existen diferencias en la química de cada población, además, se encontraron diferencias morfológicas entre las poblaciones, tanto en el grosor de las capas de la estructura del liquen, como en las estructuras reproductivas presentes.

Se ha documentado que el grosor de los talos liquénicos varía de acuerdo a condiciones en el ambiente, como la cantidad de luz incidente, la disponibilidad de agua y CO<sub>2</sub> de acuerdo a lo realizado por Green y Lange, 1991. Estas diferencias se correlacionan con los resultados obtenidos en esta investigación, donde los individuos de Ralco presentan un menor grosor de la capa gonidial y medular, provocando una menor capacidad de retener agua y almacenar CO<sub>2</sub> (Colesie *et al*, 2012). Además, de una baja apertura de dosel, por lo tanto, los talos de Ralco requieren de una mayor eficiencia fotosintética cuántica máxima del fotosistema II, para su desarrollo. Concordando con los resultados de Fv/Fm

*in situ*, que muestran que los talos de Ralco, presentan un Fv/Fm *in situ* muy superior a los determinados en Contulmo y Nahuelbuta. Este resultado concuerda con el obtenido por Green y Lange (1991), el cual indica que entre más luz solar incide al talo, mayor grosor presenta la capa gonidial (Anexo 9.3). Al respecto Solhaug *et al*, 2003; Toledo *et al*, 2004; Hidalgo *et al*, 2005, indican que entre mayor es la intensidad lumínica que soporta el talo, mayor será su síntesis de compuestos aromáticos que actúan como fotoprotectores. Por consiguiente, un mayor grosor de la zona gonidial (poblaciones de la costa), presentarían una mayor producción de compuestos fotoprotectores. Todos estos factores posibilitan que los talos produzcan ciertos metabolitos secundarios y en distintas cantidades (Silva *et al*, 2010)



Otro punto importante, es la presencia de apotecios en los talos de Contulmo y Nahuelbuta, lo cual presumiblemente produzca compuestos liquénicos ya que se ha reportado que la mayor concentración de metabolitos secundarios se encuentran principalmente en las estructuras reproductivas en comparación con las partes vegetativas de los talos (Molnár & Farkas, 2010). Culberson *et al* (1977), observaron que la química de los líquenes que presentan reproducción asexual (isidios), es más estable y no varía cuantitativamente. Además Manrique (1989), indica que algunas especies del género *Parmelia* que presentaban mayoritariamente apotecios cambian las concentraciones relativas de ácido divaricático y estenospórico. Por lo tanto, la reproducción sexual implicaría variaciones cuantitativas en compuestos liquénicos (Manrique, 1989). Lo anterior, respalda nuestros resultados, que muestran variaciones en la química de los talos, que contienen principalmente reproducción sexual (Contulmo y Nahuelbuta) versus reproducción asexual (Ralco).

A pesar de demostrar que existen diferencias en la química y en la morfología de cada población, la actividad antioxidante y antimicrobiana, no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones, esto se debe a

que los compuestos que generan estas características son compuestos principales de *P. flavicans*, y por lo tanto, se encuentran presentes en cantidades similares en las tres poblaciones. Las diferencias radicarían en la producción de sustancias fotoprotectores, debido a las variaciones que presentan en las condiciones lumínicas de cada sitio, además en factores como la humedad, y la altitud. Sin embargo, Bidussi *et al* (2013), indicaron que las diferencias altitudinales en los líquenes *Lobaria pulmonaria* y *Hypogymnia occidentalis*, no produciría variaciones en la composición química entre los individuos.

Los resultados de la actividad antioxidante, fueron bastante satisfactorios, presentando una mejor secuestramiento de radicales libres que algunas especies de líquenes analizadas por Mitrović *et al* (2011) y Stojanović *et al* (2010), siendo solamente menor en comparación con el líquen folioso *Hypogymnia physodes*, que además, presenta un mayor contenido de fenoles totales.

Los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de los individuos de Contulmo, mostraron una alta inhibición en la bacteria *S. aureus*. Muchos otros autores han obtenido resultados similares en otras especies de líquenes utilizando metanol como solvente, sin embargo, la actividad depende de factores tales como el solvente utilizado y las concentraciones del extracto líquénico (Rankovič *et al*, 2010). Al respecto, Rankovič *et al* (2007) demostró que los extractos metanólicos de líquenes, tienden a tener una mayor actividad antimicrobiana en bacterias Gram-positiva (*S. aureus*) que las Gram-negativa (*E. coli*), concordando con nuestros resultados. La razón de esto se debe a la sensibilidad de las bacterias, dada por sus características morfológicas, entre ellas la pared celular (Anexo 9.8). Mientras que Çobanoğlu *et al* (2010), indican que el uso de diferentes solventes permitirían arrastrar compuestos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram-negativas como *E. coli*.

De acuerdo a la identificación de compuestos líquénicos han tenido un alto auge, para una futura síntesis a nivel industrial. Falcao *et al* (2002), mediante el uso de

un conjunto de cromatografías, determinaron la presencia de atranorina y zeorina en un extracto orgánico de *Heterodermia leucomela*, indicando que la actividad antimicrobiana, se produce por una asociación sinérgica entre los metabolitos. En este estudio, la presencia de MBO en el extracto líquenico sería uno de los compuestos que generan un alto nivel de inhibición de crecimiento en *S. aureus*. El compuesto MBO, es reconocido por tener una alta capacidad inhibitoria de bacterias principalmente Gram positivas (Gupta *et al*, 2007). En este trabajo se presume la existencia de estos compuestos, debido a que no contamos con el estándar y se debió trabajar en las condiciones similares a las realizadas por Gupta *et al* (2007). Sin embargo, los cromatogramas mostraron una gran variedad de compuestos, los cuales podrían ser aislados, identificados, para posteriormente analizar y determinar si presentan características biológicas, tales como; antioxidante, antimicrobianas, aleloquímicas, citotóxicas, anticonceptivas, etc.

Se recomienda, un estudio de ecología funcional en cada población, para determinar cuáles son los factores que inciden en las diferencias morfológicas y fisiológicas, que permiten que existan diferencias químicas entre los individuos que podrían formar quimiotipos.

Además, recomendamos un estudio de uso de distintos solventes de extracción para poder eliminar el factor del solvente en cada ensayo.

Utilizar estándares de compuestos líquenicos, para determinar si realmente están presentes en el líquen. Así poder identificarlos, aislarlos y determinar la actividad biológica del compuesto puro.

## 7. CONCLUSIONES.

*P. flavicans* posee compuestos metabólicos, con variadas funciones biológicas, tales como alcaloides, taninos, flavonoides. Además de presentar un alto contenido fenólico.

Los talos de las poblaciones de Ralco, Contulmo y Nahuelbuta presentan diferencias en la composición química y esta se relaciona con variaciones morfológicas, tales como, el grosor de las capas y estructuras reproductivas, además, presentan diferencias en la eficiencia cuántica máxima del fotosistema II. Sin embargo, estas variaciones no se evidencian en diferencias en la actividad antioxidante y antimicrobiana.

El extracto metanólico de los individuos estudiados de *Pseudocyphellaria flavicans* presenta una alta actividad antioxidante (secuestro de radicales libres) y antimicrobiana (inhibición de crecimiento en la bacteria Gram-positiva *S. aureus*).

Se presume la presencia del compuesto Metil- $\beta$ -orcinolcarboxilato, el cual le otorgaría la actividad antimicrobiana del extracto líquenico, de acuerdo a la literatura revisada anteriormente.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali S, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A, Bora U (2008) *Food Res Int.* 41(1): 1-15.
- Barlow S M (1990) Toxicological Aspects of Antioxidants Used as Food Additives. In *Food Antioxidants, Hudson B J F (Ed,) Elsevier: London: 253-307.*
- Barreno E, Pérez-Ortega S (2003) *Biología de los Líquenes.* Consejería del medio ambiente, ordenación del territorio e infraestructura del principado de Asturias y KRK ediciones.
- Behera B.C, Verma N, Sonone A, Makhija U (2005) Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* in vitro, *Biotechnol. Lett.*, 27, 991-995.
- Bjerke, J. W., & Elvebakk, A. (2004, January). Comparison of morphological, anatomical and chemical characters in *Pseudocyphellaria endochrysa* and *P. vaccina* (Lobariaceae, lichenised Ascomycota). In *Annales Botanici Fennici* (pp. 27-35). Finnish Zoological and Botanical Publishing Board.
- Bidussi M, Goward T, Gauslaa Y (2013) Growth and secondary compound investments in the epiphytic lichens *Lobaria pulmonaria* and *Hypogymnia occidentalis* transplanted along an altitudinal gradient in British Columbia. *Botany*, 91: 621-630
- Bhattarai H, Paudel B, Hong S, Lee H, Yim J (2008) Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents of lichens from Antarctica. *J Nat Med.* 6: 481–484.
- Boustie J, Grube M (2005) Lichens - a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genet Resour* 3: 273-287.

Burkholder P, Evans A, McVeigh I, Thornton H. (1944) Antibiotic activity of lichens. *Proc Nat Acad Sci USA*. 30: 250-255.

Chapman A (2009) Numbers of living species in Australia and the world. *Australian Biological Resources Study (ABRS) Canberra*. 80.

Çobanoğlu G, Sesal C, Gökmen B, Çakar S, (2010) Evaluation of the antimicrobial properties of some lichens. *South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment*.1: 153-158.

Colesie C, Scheu S, Green T G, Weber B, Wirth R, Büdel B, (2012) The advantage of growing on moss: facilitative effects on photosynthetic performance and growth in the cyanobacterial lichen *Peltigera rufescens*. *Oecologia*.169: 599–60.

Cubas P, Núñez J, Crespo A, Divakar P, (2010) Líquenes: que son y su uso como bioindicadores. Documento GEMM / Proyecto de Innovación 123 - UCM.

Culberson C.F, Culberson WL, Johnson A, (1977) Thermally induced chemical artifacts in lichens. *Phytochemistry*. 16: 127-130.

Culberson C.F, Kristinsson (1970) A standardized method for the identification of products. *J. Chromatogr*. 46: 85-93.

Dall'Acqua S, Minesso P, Shresta B, Comai S, Jha P, Gewali M, Greco E, Cervellati R, Innocenti G (2012) Phytochemical and Antioxidant-Related Investigations on Bark of *Abies spectabilis* (D. Don) Spach. *From Nepal. Molecules*.17:1686-1697.

Dayan F, Romagni J (2001) Lichens as a potential source of pesticides. *The Royal Society of Chemistry*.12: 229-232.

Denton H, Karlén W (1973) Holocene climatic variations—their pattern and possible cause. *Arctic and Alpine Research*. 3: 155-174.

- Denton H, Karlén W (1973) Lichenometry: its application to holocene moraine studies in southern Alaska and Swedish Lapland. *Arctic and Alpine Research*. 5: 347-372.
- Dias D, Urban S (2009) Chemical constituents of lichen *Candelaria concolor*: a complete NMR and chemical degradative investigation. *Natural Product Research*. 4 (7): 959-964.
- Eldeen I.M.S, Seow E-M, Abdullah R, Sulaiman S.F (2011) In vitro antibacterial, antioxidant, total phenolic contents and anti-HIV-1 reverse transcriptase activities of extracts of seven *Phyllanthussp.* *South African Journal of Botany* 77 75 – 79.
- Elix J, Stocker-Wörgötter E (2008) Biochemistry and secondary metabolites. In: NASH T. H. III (eds.): *Lichen biology*, 2nd Ed. Cambridge University Press. 104–133.
- Falcão, E. P. d. S. (2002). Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do Líquen heterodermia leucomela (L.) Poelt.
- Galloway D, Kantvilas G, Elix J (2001) *Pseudocyphellaria*. *Flora of Australia*. 58 A.
- Gauslaa Y, Lie M, Solhaug K, Ohlson M (2006) Growth and ecophysiological acclimation of the foliose lichen *Lobaria pulmonaria* in forests with contrasting light climates. *Oecologia*.147: 406-416.
- González P (2002) Diffusion susceptibility testing: selection of antimicrobial agents. *Rev. Chil Infect*. 19: 82-84.
- Green T G, Lange L (1991) Ecophysiological adaptations of the lichen genera *Pseudocyphellaria* and *sticta* to south temperate rainforests. *Lichenologist*. 23(3): 267-282.



Guzmán G (1994) Diversidad de especies. Líquenes.

Gupta V K, Darokar M P, Shanker K, Negi A, Srivastava S K, Gupta M, Khanuja S P S (2007) Rapid and sensitive HPLC method for the determination of polyphenols in various lichen species of Himalayan origin. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 30 cap 1.

Halliwell B, J.M.C. Gutteridge J.M.C (1999) Free radicals in biology and medicine. Tercera ed. Clarendon Press. Oxford, England.

Hale M E. Lichen structure viewer with the scanning electro microscope (1976) In: Broen DH, Hawksworth DL, And Bailey RH, eds. Lichenology: Progress and problems. *Londo Academic Press*, 1 -16.

Hale, M.E. Jr. The biology of lichens. *Edward Arnold (Publishers) Ltd.*, 1983.

Hawksworth D L (1989) Interacciones hongo-alga en simbiosis liquénicas y liquenoides. *Anales Jará. Bot. Madrid*. 46 (1): 235-247.

Hidalgo M, Bascuñan L, Quilhot W, Fenández E, Rubio C (2005) Spectroscopic and photochemical properties of the lichen compound lobaric acid. *Photochemistry and photobiology*. 81: 1447-1449.

Honda NK (1997) Liguens de Mato Grosso do Sul –Estudo Químico e Avaliação da Atividade Biológica. Universidade do Estado de São Paulo. 208.

Huda-Faujan N, Noriham A, Norrakiah A S, Babji A S (2009) Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *African Journal of Biotechnology*. 8: 484-489.

Huneck S, Yoshimura I (1996) Identification of lichen substances. *Springer-Verlag, Berlin*. 3: 540-608.

- Huneck S (1999) Significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*. 86: 559 – 570. ENS
- Jayaprakasha G K, Rao L J (2000) Phenolic constituents from the lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activities. *Z. Naturforsch.* 55: 1018-1022.
- Jahns H.M (1984) Morphology, reproduction and water relations - a system of morphogenetic interactions in *Parmelia saxatilis*. *Nova Hedwigia* 79: 715-737.
- Jungbluth P, Marcelli MP (2011) The *Pyxine pungens* complex in São Paulo State, Brazil. *The Bryologist* 144: 166-177.
- Kekuda T, Vinayaka K, Swathi D, Suchitha Y, Venulgopal T, Mallikarjun N (2011) Mineral composition, total phenol, content and antioxidant activity of a macrolichen *Everniastrum cirrhatum* (Fr.) Hale (parmeliaceae). *E-journal of Chemistry*. 8: 1886-1894.
- Khan A, Rahman M, Islam S (2007) Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of tuberous roots of *Amorphophallus campanulatus*. *Turk. J. Biol.* 31: 167-172.
- Le Bras, M., Clement, M. V., Pervaiz, S., & Brenner, C. (2005). Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histology and histopathology*.
- Lock O, (1994) Métodos de estudios de productos naturales. Fondo editorial, PUCP.
- Malhotra S, Subban R, Singh A (2009) Lichens- Role in Traditional Medicine and Drug Discovery. *The Internet Journal of Alternative Medicine*. 5.

- Manrique E (1989) Aplicación de técnicas analíticas e interpretación de las variaciones químicas en líquenes. *Anales Jard. Bot. Madrid.* 46 (1): 49-257.
- Miller N J, Diplock A T, Rice-Evans C A (1995) Evaluation of the total antioxidant as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1794–1801.
- Molnár K, Farkas E (2010) Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung.* 65: 157-173.
- Manojlovic N, Vasiljevic P, Maskovic P, Juskovic M, Dogdanovic-Dusanovic G (2012) Chemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities of Lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 8.
- Martinez M, Cuellar A (2002) Manual de Prácticas de Laboratorio. Universidad de la Habana 44-49.
- Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Nikolić M, Tošić S, Stojičić D (2011) Lichens as source of versatile bioactive compounds. *Biologica Nyssana.* 2 (1): 1-6.
- Mondaca B, Forero E (2006) El género *Pseudocyphellaria* Vain (Lobariaceae-Ascomycetes Liquenizados) en Colombia.
- Muñoz M & Casanova-Katny A (2018) ficha de antecedentes de especie *pseudocyphellaria flavicans*. Ministerio de medio ambiente, Chile.  
[https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2019/10/Pseudocyphellaria flavicans\\_15RCE\\_FINAL.pdf](https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2019/10/Pseudocyphellaria flavicans_15RCE_FINAL.pdf)

Muggia L, Schmitt I, Grube M (2009) Lichens as treasure chests of natural products. *SIM News*. 59: 85-97.

Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y (1995) Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta medica*. 61: 113 – 115.

Pereira EC, Silva EF, Silva MIL, Vital MJS, Silva NH, Vicente C, Andradr LHC (1999a) Produção de metabólitos de *Cladonia corallifera* (Kunze) Nyl. – por imobilização celular. *Revista de Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas* 2/3 25-41.

Pereira EC, Vicente C, Legaz ME, Silva NH, Silva EF, Andrade LHC (1999b) Production of lichen metabolites through cell immobilization by *Cladonia clathrata* Ahti & Xavier- Filho. *Phyton* (Áustria) 39 79 – 89.

Prat S (2012) Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. Instituto de Salud Pública de Chile.

Quintana H, Díaz S, Taboada V, Ortiz T (2005) Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev med herediana*.16.

Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et technica*, 15(42), 263-268.

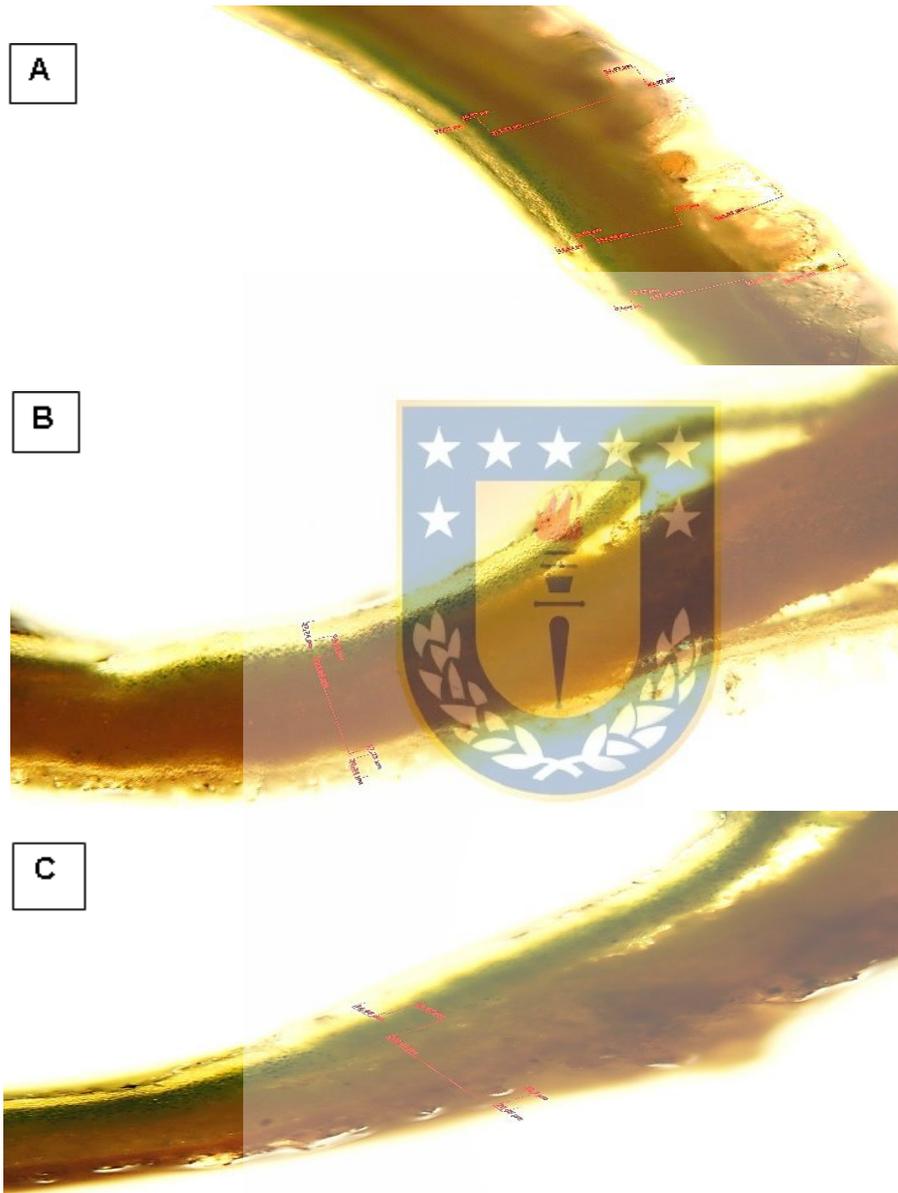
Rankovič B, Mišić M, Sukdolak S, Milosavljević D (2007a) Antimicrobial activity of the lichens *Aspicilia cinerea*, *Collema cristatum*, *Ochrolechia androgyna*, *Physcia aipolia* and *Physcia caesia*. *Italian Journal of Food Sciences*.19:461- 469.

- Rankovič B, Mišić M, Sukdolak S (2007b) Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Lasallia pustulata*, *Parmelia sulcata*, *Umbilicaria crustulosa* and *Umbilicaria cylindrica*. *Microbiology*. 76: 723-727.
- Rankovič B, Ranković D, Maric D (2010) Antioxidant and antimicrobial activity of some lichen species. *Microbiology*. 79: 809–815.
- Silva HPB, Colaco W, Pereira E, Silva N (2010) Sensitivity of *Cladonia substellata* Vainio (lichen) to gamma irradiation and consequent effect on limestone rocks, *Int. J. Low Radiation*, 7: 324-322.
- Souri E, Amin G, Farsam H, Jalalizadeh H, Barezi S (2008) Screening of Thirteen Medicinal Plant Extracts for Antioxidant Activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 7: 149-154.
- Solhaug K, Gauslaa Y, Nybakken L, Bilger W (2003) UV-induction of sun-screening pigments in lichens. *New phytologist*. 158: 91-100.
- Snelgar W P, Green T G A (1981) Growth rates of Stictaceae lichens in New Zealand beech forests. *Bryologist*. 85: 301-306.
- Stocker W, Elix E (2002) Secondary chemistry of cultured mycobionts: formation of a complete chemosyndrome by the lichen fungus of *Lobaria spathulata*. *Lichenologist*. 34: 351-359.
- Stojanović G, Stojanović I, Stankov-jovanović V, Mitić V, Kostić D (2010) Reducing power and radical scavenging activity of four Parmeliaceae species. *Cent. Eur. J. Biol*. 5(6): 808-813.
- Takao T, Watanabe N, Yagi I, Sakata K (1994) A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bosco Biotechnol Biochem*. 58: 1780-1783.

- Taroco R, Seija V, Vignoli R (2008) Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. In: (Org.). *Temas de Bacteriología y Virología Médica. Montevideo, Oficina del Libro FEFMUR. 765-773.*
- Taylor T N, Hass H, Remy W, Kerp H (1995) The oldest fossil lichen. *Nature*, 378: 244-244.
- Toledo F, García A, León F, Bermejo J (2004) Ecología química en hongos y líquenes. *Rec Acad. Colomb. Cienc.* 28 (109): 509-528.
- Vartia K.O, Ahmadjian V. Hale M E (1973) "The Lichens," in *Antibiotics in Lichens, Academic Press, New York, NY, USA. 547 – 561.*
- Valladares, F., Sanchez-Hoyos, A., & Manrique, E. (1995). Diurnal changes in photosynthetic efficiency and carotenoid composition of the lichen *Anaptychia ciliaris*: effects of hydration and light intensity. *Bryologist*, 375-382.
- Vinitha T, Iqbal M, Khan S, Karunaratne V (2012) Antimicrobial and toxicological activities of some depsides and depsidones. *J. Natn.Sci. Foundation Sri Lanka.* 40: 43 – 48.
- Xiao C H, Yang S, Hong X K (2000). *The Chemistry of Traditional Chinese Medicines. Science and Technology Publishing House, Shanghai.*

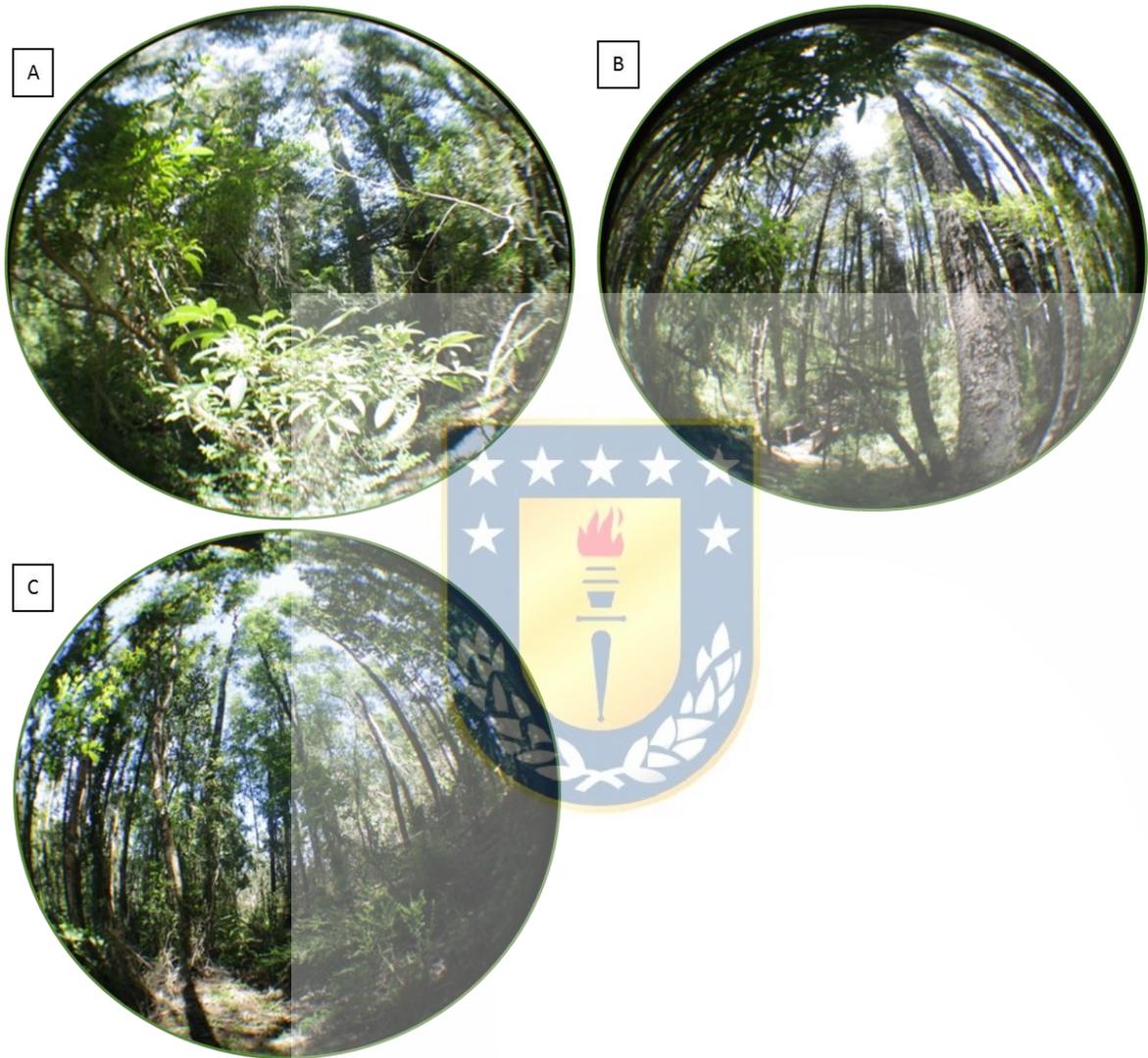
## 9. ANEXO

### 9.1 Fotografías microscópicas de talos de *P. flavicans*.



Fotografía 4. Talos de A. Nahuelbuta, B. Contulmo y C. Ralco

## 9.2 Fotografías apertura de dosel.



Fotografía 5. Imágenes hemisféricas de cada población. A: Nahuelbuta, B: Contulmo, C: Ralco

9.3 Diferencias en el grosor de las capas, en distintas condiciones luminicas.

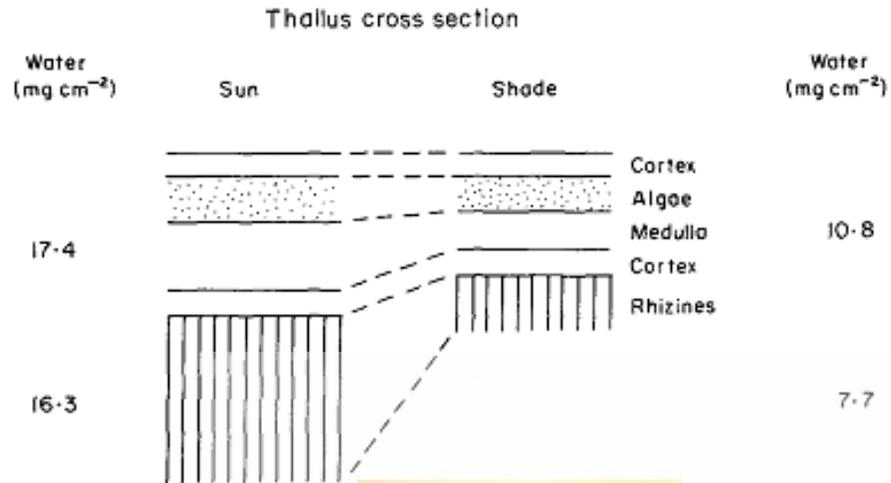


Figura 14. Esquema del grosor aproximado de las capas, en diferentes condiciones lumínicas.



Almacenamiento de agua en cada capa al encontrarse en distintas condiciones lumínicas en *Pseudocypbellaria dissimilis*. Las mediciones en detalle de luz y sombra, fueron obtenidas del trabajo de Snelgar y Green (1981). Figura obtenida del trabajo realizado por Green y Lange (1991).

#### 9.4 Diseño experimental para el ensayo antimicrobiano.

Cada placa, consta de 4 discos de 5 mm de diámetro; 1 disco impregnado con 10  $\mu$ L de metanol (control negativo) y 3 discos con una concentración de extracto (10  $\mu$ L). Se realizaron 3 réplicas y 3 sub réplicas (discos). Además se realizó mediciones de antibióticos sintéticos (control positivo) en triplicado.

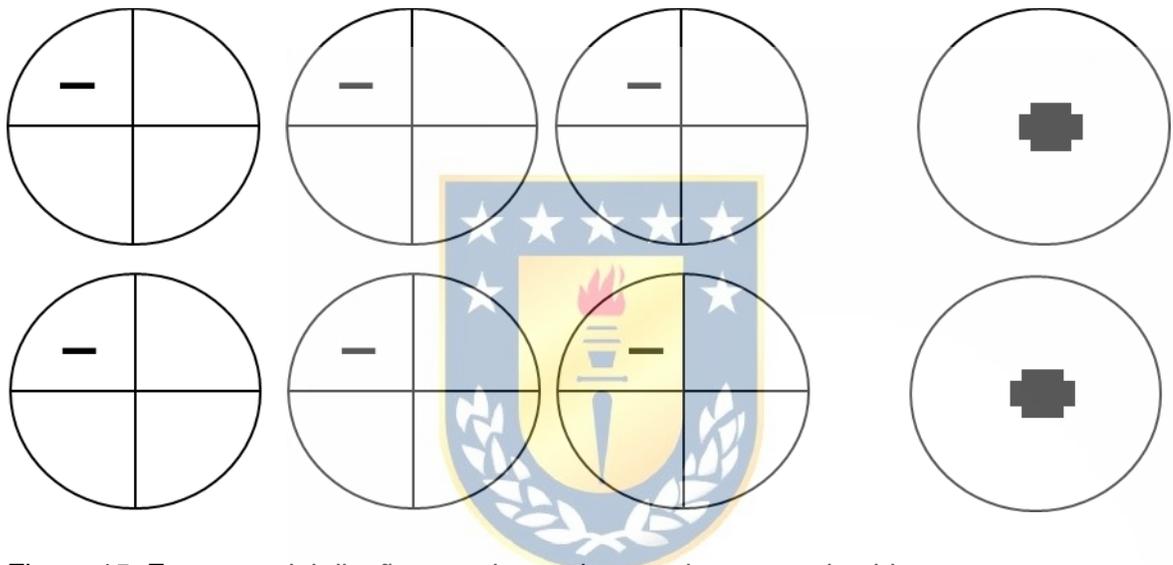


Figura 15. Esquema del diseño experimental para el ensayo microbiano

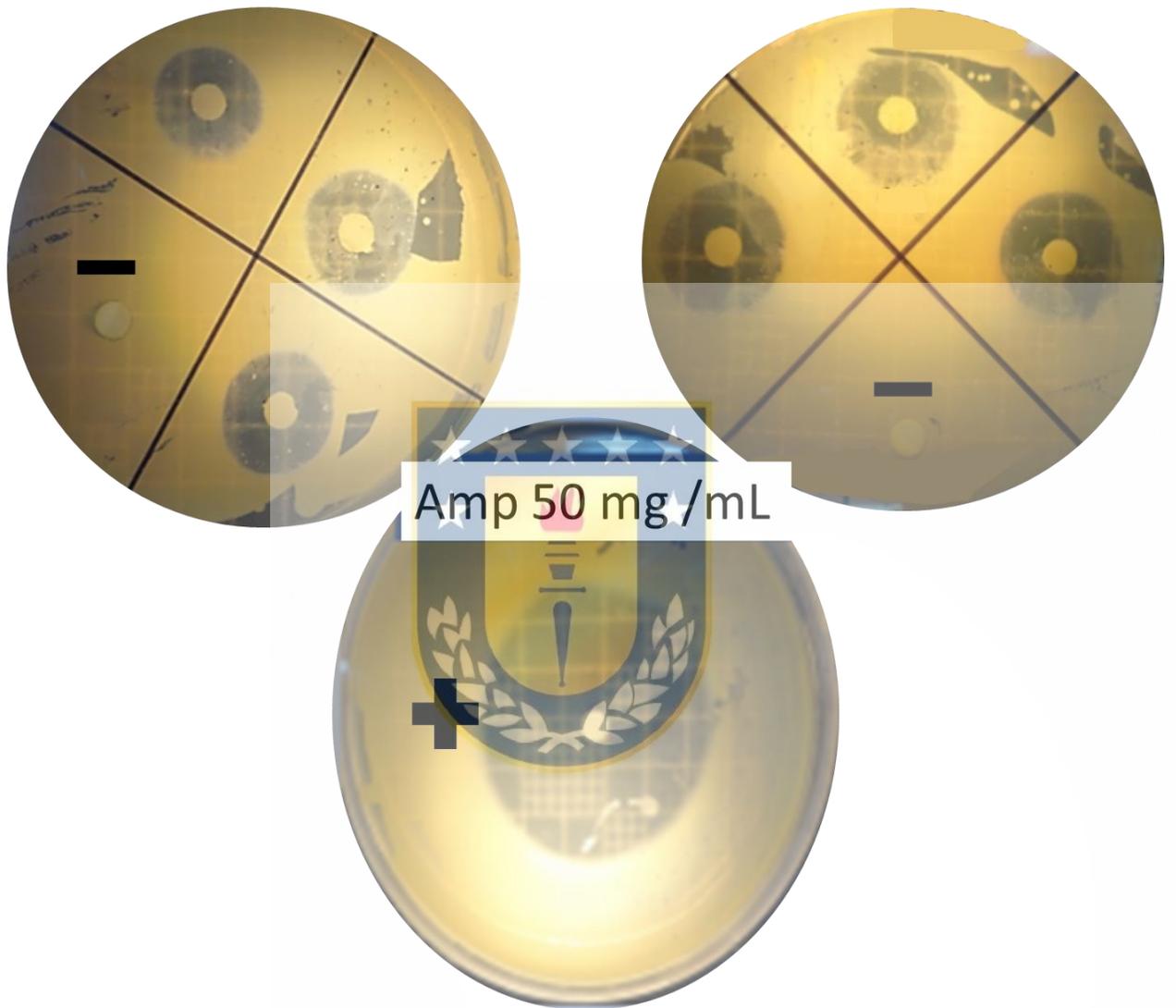
Raya (-) indica ubicación del control negativa y signo más (+), el control positivo.

### 9.5 Comparación de los halos de inhibición de cada población.

Tabla 8. Halos de inhibición al utilizar concentraciones bajas de cada extracto

Concentraciones (mg/ml)	NAHUEL BUTA			Control (-)
0,8	7,5	7	7,7	7,5
0,8	8,5	7	7,5	7
0,8	8	9	9	7,75
1	7,75	7,5	8	6
1	6	6	7,7	6
1	8	8,25	7,5	8,5
Concentraciones (mg/ml)	RALCO			Control (-)
0,8	9	8,25	8,5	8
0,8	8	7	7,5	7,5
0,8	6	6,5	6	8
1	9	8	8,5	8
1	7,5	7,7	8,5	7
1	8	9	8	7,5
Concentración (mg/ml)	CONTULMO			Control (-)
0,8	7,25	8	6	7,25
0,8	6,5	7	8,25	7
0,8	7,5	8	7	7
1	7	6,5	6,5	6,25
1	7,5	8	7	6
1	7,25	7,75	8	6

### 9.6 Fotografías de halos de inhibición de los extractos líquenicos



Fotografía 6. Halos de inhibición producidos por el extracto líquenico, y halo de inhibición del antibiótico sintético ampicilina en un medio con *S. aureus*.

9.7 Peaks y tiempo de retención de compuestos metabólicos detectados por CLAR

Data File C:\CHEM32\1\DATA\PRUEBA LIQUEN GB\SIG10147.D  
 Sample Name: LIQUEN PF

Signal 1: DAD1 A, Sig=265,20 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.212	BV	0.1361	985.14899	95.66599	4.6941
2	1.716	VV	0.2510	1129.97327	56.58864	5.3841
3	1.952	VV	0.1095	525.76343	64.24432	2.5052
4	2.103	VV	0.0891	173.79439	27.73527	0.8281
5	2.246	VV	0.1624	431.72662	36.40378	2.0571
6	2.584	VV	0.1862	1400.91174	100.76118	6.6751
7	3.312	VV	0.2433	279.37323	15.42599	1.3312
8	3.872	VV	0.3287	757.60303	34.17059	3.6099
9	4.290	VV	0.2271	488.65988	29.22759	2.3284
10	5.095	VV	0.2223	1015.40631	67.17836	4.8382
11	5.697	VB	0.8280	1089.03320	17.40435	5.1891
12	9.111	BB	0.3850	721.09094	29.72649	3.4359
13	10.721	BB	0.3284	36.45472	1.72584	0.1737
14	12.601	BB	0.2696	552.43359	32.29164	2.6323
15	14.077	BV	0.4012	183.74408	6.67330	0.8755
16	17.209	VB	0.6789	1.12160e4	226.02879	53.4422

Totals : 2.09871e4 841.25214

\*\*\* End of Report \*\*\*

## 9.8. Morfología de bacterias gram positivo y gram negativa

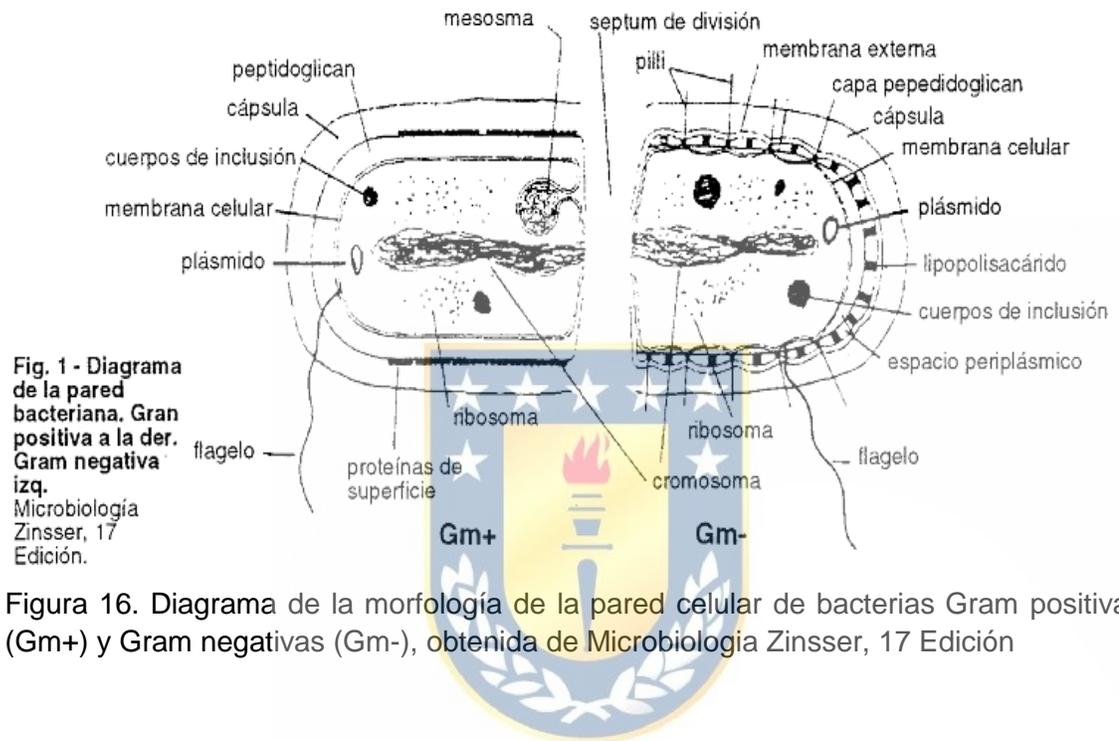


Figura 16. Diagrama de la morfología de la pared celular de bacterias Gram positiva (Gm+) y Gram negativas (Gm-), obtenida de Microbiología Zinsser, 17 Edición