



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA *in vitro* DE
LAS FRACCIONES AISLADAS POR CROMATOGRAFÍA
PREPARATIVA EN CAPA FINA DE (*Parmelina tiliacea*)**

TESIS DE GRADO

**PREVIA LA OBTENCIÓN DE TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACEUTICO**

AUTOR: MARCO VINICIO JANETA SALTOS

TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA T. M.Sc

RIOBAMBA-ECUADOR

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

El tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y CITOTÓXICA *in vitro* DE LAS FRACCIONES AISLADAS POR CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA EN CAPA FINA DE (*Parmelina tiliacea*)” de responsabilidad del Sr. Marco Vinicio Janeta Saltos, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Nancy Veloz
DECANA FACULTAD CIENCIAS

Dra. Ana Albuja
DIRECTORA ESC. BIOQ. Y FARMACIA

B.Q.F. Diego Vinueza M. Sc.
DIRECTOR DE TESIS

B.Q.F. Fausto Contero
COLABORADOR DE TESIS

DRA. Susana Abdo
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Abgda. Bertha Quintanilla
**COORDINADOR
SISBIB ESPOCH**

NOTA DE TESIS ESCRITA

DEDICATORIA

Dedico este proyecto y toda mi carrera universitaria a un ser poderoso, espiritual de quien aún no se su nombre, ni lo conozco su historia, pero es quien ha estado a mi lado dándome las fuerzas necesarias para demostrar mi conocimiento día tras día y seguir adelante con el hambre por más.

Le agradezco a mi mamá Rosa Saltos quien con su enseñanza y su conocimiento ha formado quien soy hoy en día y junto a mi papá Marco Janeta han cuidado y protegido de mí, brindándome mis estudios, mi educación alimentación y demás.

A mi hermana Ely, que ha estado siempre a mi lado brindándome el apoyo incondicional; a mi novia Carito que siempre ha permanecido junto a mí dándome el cariño y amor necesario para poder continuar a lo largo de toda mi investigación.

Esta obra les dedico con todo mi amor.

AGRADECIMIENTO

Deseo mostrar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones sin las cuales, este trabajo no habría visto la luz.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por contribuir en mi formación profesional.

Al laboratorio de productos naturales de la Facultad de Ciencias por el apoyo brindado en la realización del trabajo investigado.

Al BQF. Diego Vinueza Msc. Director de esta tesis, para mí es un honor haber realizado este trabajo bajo su dirección y tutela, le estaré siempre muy agradecido porque ha dedicado su valioso tiempo a ello, y mencionar que además de un profesor he encontrado un gran amigo y un gran ejemplo a seguir como un profesional que me ha demostrado que el alma de científico corre por nuestras venas

Al BQF Fausto Contero colaborador de mi Tesis, por haberme brindado todo el apoyo durante mi trabajo final de titulación y haber propuesto el conocimiento durante mi carrera.

A la Msc Karen Acosta, por todos sus conocimientos, consejos y opiniones compartidos durante el transcurso de la realización de este trabajo de investigación.

Al laboratorio de Instrumental, laboratorio Análisis Clínicos de la Facultad de Ciencias quienes fueron un gran apoyo para realizar cada uno de los ensayos en mi trabajo final.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera para la culminación de este trabajo de investigación.

Yo, Marco Vinicio Janeta Saltos, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta tesis, y el patrimonio intelectual de la tesis de grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

MARCO VINICIO JANETA SALTOS

TABLA DE CONTENIDOS

	Introducción	1
	Situación problemática	1
	Formulación del problema	1
	Justificación teórica	1
	Justificación práctica	2
	Objetivos	2
	Objetivo general	2
	Objetivos específicos	2
1.	Marco teórico	3
1.1.	Marco Filosófico o epistemológico de la investigación	3
1.1.1.	Líquenes	3
1.1.1.1.	Desarrollo y formación	3
2.1.1.2.	Sustancias liquénicas	4
1.1.1.3.	Sustancias liquénicas en el pasado	5
1.2.	Antecedentes de la Investigación	5
1.2.1.	Estudios de nuevas moléculas con actividad antiinflamatoria	5
1.3.	Bases Teóricas	6
1.3.1.	Estudio de compuestos liquénicos con actividad antiinflamatoria	6
1.3.2.	Estudio de pruebas <i>in vitro</i> por reducción de sal de tetrazolio	7
2.	Metodología	9
2.1.	Unidad de Análisis	9
2.1.1.	Recolección y secado del liquen	10
2.1.2.	Molienda del liquen	10
2.1.3.	Tamizaje fitoquímico	11
2.1.4.	Obtención del extracto etanólico	16
2.1.5.	Cromatografía	16
2.1.5.1.	Cromatografía en fase reversa (RPC)	16
2.1.5.2.	Cromatografía en columna	19
2.1.5.2.1.	Cromatografía en columna de poliamida.....	19
2.1.5.2.2.	Cromatografía en columna de poliamida (2)	20
2.1.5.3.	Cromatografía en columna flash	21
2.1.5.4.	Cromatografía TLC en silica gel 60 F25Z	23
2.1.6.	Separación e identificación de los compuestos por Cromatografía	26
2.1.6.1.	Identificación de los compuestos liquénicos	29
2.1.7.	Espectroscopia UV	36
2.1.8.	Espectroscopia IR	40

2.1.9.	Ensayos <i>in vitro</i>	43
2.1.9.1.	Protocolo para el aislamiento de neutrófilos humanos	43
2.1.9.2.	Protocolo Ensayo de actividad citotóxica de neutrófilos aislados	45
2.1.9.3.	Protocolo del ensayo antiinflamatorio	47
3.	Resultados y discusión de resultados	51
3.1.	Análisis, interpretación y discusión de resultados	51
3.1.1.	Tamizaje fitoquímico	51
3.1.2.	Identificación de compuestos por Cromatografía	51
3.1.3.	Identificación de compuestos por pruebas químicas	54
3.1.4.	Identificación de compuestos por espectroscopia UV	55
3.1.4.1.	Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia UV	55
3.1.4.2.	Identificación de Atranorina por espectroscopia UV	56
3.1.4.3.	Identificación de Ácido cryptostictico por espectroscopia UV	57
3.1.5.	Identificación de compuestos por espectroscopia IR	58
3.1.5.1.	Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia IR	58
3.1.5.2.	Identificación de Atranorina por espectroscopia IR	60
3.1.5.3.	Identificación de Ácido cryptostictico por espectroscopia IR	62
3.2.	Pruebas <i>in vitro</i>	63
3.2.1.	Ensayo Citotóxico	63
3.2.1.1.	Pulvinic dilactone	63
3.2.1.2.	Atranorina	65
3.2.2.	Ensayo antiinflamatorio	67
3.2.2.1.	Pulvinic dilactone	67
3.2.2.2.	Atranorina	69
3.3.	Presentación de resultados	72
3.3.1.	Aislamiento de compuestos	72
3.3.2.	Fórmulas de los compuestos aislados	72
3.3.2.1.	Pulvinic dilactone	72
3.3.2.2.	Atranorina	73
3.3.2.3.	Ácido cryptostictico	73
3.3.3.	Ensayo antiinflamatorio	73
3.3.4.	Ensayo citotóxico	74

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1-1. Clasificación taxonómica de *Parmelina tiliacea*
- Cuadro 1-2. Secuencia lógica de investigación
- Cuadro 2-2. Procedimiento tamizaje fotoquímico
- Cuadro 3-2. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto Etéreo
- Cuadro 4-2. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto Etanólico
- Cuadro 5-2. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto Acuoso
- Cuadro 6-2. Fase estacionaria silica gel, fase móvil Tolueno-Acetato de etilo-Ac fórmico
- Cuadro 7-2. Fase estacionaria silica gel, fase móvil Hexano/Di Etil Éter/Ácido fórmico
- Cuadro 8-2. Fase estacionaria silica gel, fase móvil Tolueno/Ácido acético (170:30)
- Cuadro 9-2. Fase estacionaria silica gel, fase móvil Tolueno/Etil Acetato/Ácido fórmico
- Cuadro 10-2. Rf del compuesto 1 a diferentes fases móviles
- Cuadro 11-2. Rf del compuesto 1 a diferentes fases móviles
- Cuadro 12-2. Rf del compuesto 1 a diferentes fases móviles
- Cuadro 13-2. Preparación de las diluciones de los compuestos para ensayo citotóxico
- Cuadro 14-2. Absorbancias Atranorina en ensayo citotóxico
- Cuadro 15-2. Absorbancias Pulvinic dilactone en ensayo citotóxico
- Cuadro 16-2. Preparación de las diluciones de los compuestos para ensayo antiinflamatorio
- Cuadro 17-2. Absorbancias Pulvinic dilactone y Atranorina ensayo antiinflamatorio
- Cuadro 1-3. Compuesto 1 Rf
- Cuadro 2-3. Compuesto 2 Rf
- Cuadro 3-3. Compuesto 3 Rf
- Cuadro 4-3. Comparaciones de Rf
- Cuadro 5-3. Absorbancias del ensayo citotóxico de Pulvinic dilactone
- Cuadro 6-3. Porcentaje de viabilidad celular
- Cuadro 7-3. CL50 Pulvinic dilactone
- Cuadro 8-3. Absorbancias del ensayo citotóxico de Atranorina
- Cuadro 9-3. Porcentaje de viabilidad celular de Atranorina
- Cuadro 10-3. CL50 Atranorina
- Cuadro 11-3. Absorbancias del ensayo antiinflamatorio de Pulvinic dilactone
- Cuadro 12-3. Porcentaje de inhibición inflamatoria
- Cuadro 13-3. Absorbancias del ensayo antiinflamatorio de Atranorina
- Cuadro 14-3. Determinación de compuestos
- Cuadro 15-3. Porcentaje de inhibición inflamatoria de Antranorina
- Cuadro 16-3. Porcentaje de inhibición inflamatorio de Pulvinic dilactone
- Cuadro 17-3. Porcentaje de viabilidad celular de la Atranorina

Cuadro 18-3. Porcentaje de viabilidad celular de Pulvinic dilactone

Cuadro 19-3. CL 50 de Atranorina

Cuadro 20-3. CL 50 Pulvinic dilactone

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-1. Liquen *Parmelina tiliacea*
- Figura 1-2. Recolección del liquen
- Figura 2-2. Molienda del liquen
- Figura 3-2. Tamizaje fotoquímico
- Figura 4-2. Reflujo
- Figura 5-2. Cromatografía en fase reversa (RPC)
- Figura 6-2. Cromatografía en fase reversa (RPC)
- Figura 7-2. Cromatografía en fase reversa (RPC)
- Figura 8-2. Columna de poliamida
- Figura 9-2. Columna de poliamida
- Figura 10-2. Columna flash
- Figura 11-2. Columna flash
- Figura 12-2. Columna flash
- Figura 13-2. Cromatografía TLC
- Figura 14-2. Cromatografía TLC
- Figura 15-2. Cromatografía TLC
- Figura 16-2. Cromatografía TLC
- Figura 17-2. Cromatografía TLC
- Figura 18-2. Placa preparativa
- Figura 19-2. Compuesto 1
- Figura 20-2. Cromatografía placa preparativa extracto etanólico
- Figura 21-2. Cromatografía placa preparativa extracto etanólico
- Figura 22-2. Cromatografía placa preparativa extracto etanólico
- Figura 23-2. Compuestos separados por placa preparativa en diferentes fases
- Figura 24-2. UV compuesto 1 Analizado de 200-400 nm en UV de barrido
- Figura 25-2. UV compuesto 1 Analizado de 200-400 nm en UV de barrido
- Figura 26-2. UV compuesto 1 Analizado de 200-400 nm en UV de barrido
- Figura 27-2. IR compuesto 1
- Figura 28-2. IR compuesto 2
- Figura 29-2. IR compuesto 3
- Figura 30-2. Sangre + Ficoll
- Figura 31-2. Tubo con plasma –neutrófilos-MHS- eritrocitos
- Figura 32-2. Micro pocillos actividad citotóxica antes de incubación
- Figura 33-2. Micro pocillos actividad citotóxica después de incubación

Figura 34-2. Micro pocillos actividad antiinflamatoria antes de incubación
Figura 35-2. Micro pocillos actividad antiinflamatoria después de incubación
Figura 1-3. (TLC)
Figura 2-3. Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia UV.
Figura 3-3. Identificación de Atranorina por espectroscopia UV.
Figura 4-3. Identificación de Ácido cryptostictico por espectroscopia UV.
Figura 5-3. Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia IR.
Figura 6-3. Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia IR
Figura 7-3. Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia IR
Figura 8-3. Absorbancias del ensayo de viabilidad celular de Atranorina
Figura 9-3. Viabilidad celular de Pulvinic dilactone
Figura 10-3. Absorbancias del ensayo de viabilidad celular de Atranorina
Figura 11-3. Viabilidad celular de Atranorina
Figura 12-3. Absorbancias ensayo antiinflamatorio
Figura 13-3. Porcentaje de inhibición inflamatoria de Pulvinic dilactone
Figura 14-3. Absorbancia de Atranorina en ensayo antiinflamatorio
Figura 15-3. Absorbancia de Atranorina en ensayo antiinflamatorio
Figura 16-3. Fórmula estructural de Pulvinic dilactone
Figura 17-3. Fórmula estructural de Atranorina
Figura 18-3. Fórmula estructural del Ácido cryptostictico

GLOSARIO

- ❖ = Longitud de onda
- ❖ A = Absorbancia
- ❖ Ac = Ácido
- ❖ AINEs = Antiinflamatorios no esteroideos
- ❖ AR = Artritis reumatoide
- ❖ % = Porcentaje
- ❖ °C = Grados Celsius
- ❖ Citotóxico = Tóxico a células
- ❖ cm = Centímetros
- ❖ DMSO = Dimetilsulfóxido
- ❖ g = Gramos
- ❖ IC50 = Concentración inhibitoria media
- ❖ IR = Infrarrojo
- ❖ Fotobionte = cara anterior de estructura liquénica
- ❖ GI = gastrointestinal
- ❖ Kg= Kilogramos
- ❖ L= Litro
- ❖ N^º= Número
- ❖ NAD⁺ = Nicotinamida adenina di nucleótido en su forma oxidada
- ❖ NADH = Nicotinamida adenina di nucleótido en su forma reducida
- ❖ mg = Miligramo
- ❖ mL= Mililitro
- ❖ MSH = Solución balanceada de Hank's
- ❖ MTP = Placa de micropocillos
- ❖ nm = Nanómetros
- ❖ ppm = Parte por millón $\mu\text{g}/\text{ml}$
- ❖ pH = Potencial de hidrógeno
- ❖ R_f = Ratio of Front (posición de un compuesto en la placa de cromatografía en capa fina)
- ❖ ROS = Especie reactiva de oxígeno
- ❖ SM = Solución madre
- ❖ Talo liquénico = unión más simple de un hongo y alga
- ❖ TLC = Thin Layer Chromatography
- ❖ T = Temperatura
- ❖ UV = Ultravioleta
- ❖ WST-1 = Cell Proliferation Reagent

RESUMEN

Se evaluó la actividad antiinflamatoria y citotóxica de los compuestos Atranorina, Pulvinic dilactone, aislados a partir liquen *Parmelina tiliacea*; para estudiar nuevas moléculas las cuales aporten con efectos antiinflamatorios sin presentar efectos secundarios dañinos para el organismo. El liquen *Parmelina tiliacea*, se recolectó en la zona de San Miguel de Bolívar de Ecuador; Coordenadas S 01^a 43.863' W 079^a 0.3069' Altitud: 2728 msnm. Se obtuvo el extracto etanólico por medio de un reflujo, de éste se obtuvo los compuestos ATRANORINA, PULVINIC DILACTONE Y ACIDO CRYPTOSTICTICO por aislamiento en (TLC) usando tolueno-Acetato de etilo-Ac fórmico como fase móvil; la identificación de estos se realizó por medio de pruebas cromatograficas, químicas y por comparación espectroscópica UV e IR.Las pruebas *in vitro* fueron realizadas a partir de los compuestos Atranorina y Pulvinic dilactone en neutrófilos aislados a una concentración de 10⁷ N/mL, por medio de ensayos colorimétricos basados en sales de tetrazolio.Los resultados en el ensayo antiinflamatorio muestran que la Atranorina presenta una inhibición de 8.3% menor con respecto a la Aspirina. Y una diferencia de inhibición de 10,08% menor del Pulvinic dilactone en respecto a la Aspirina.En el ensayo de citotoxicidad celular *in vitro* el CL50 de Pulvinic dilactone fue de 43,92 (µg/mL) Y la CL50 de la Atranorina fue de 44,22 (µg/mL). Sin embargo a 200 ppm la diferencia se muestra 15,04 % (Viabilidad celular) o 84,96 % (citotoxicidad) para la Atranorina y 20,47 % (Viabilidad celular) o 79,53% (citotoxicidad). Con la aplicación de este método se puede resolver la problemática del uso inadecuado de animales de experimentación abriéndonos así las puertas para nuevos estudios *in vitro* sin el uso de los mismos.

Palabras clave:

<EFECTO ANTINFLAMATORIO> <ATRANORINA> <PULVINIC DILACTONE> <ÁCIDO CRYPTOSTICTICO > <PARMELINA TILIACEA> <NEUTRÓFILOS AISLADOS> <WST-1> <FORMAZAN> <LIQUEN> <ESPECTROSCOPIA UV E IR>

SUMMARY

It was tested The anti-inflammatory and cyto-toxic activity of atranorin pulvinic dilactone compounds, isolated from *Parmelina tiliacea* lichen in order to study new molecules able to efflux contribute to anti-inflammatory effects without showing harmful side effects to human body, *Parmelina tiliacea* lichen was collected in San Miguel de Bolivar from Ecuador; at S 01° 43.863' W 079° 03.069' coordinates and an Altitude of 2728 meters above sea level.

The ethanol extract was obtained by means of reflux, from which, ATRANORIN, PULVINIC DILACTONE compounds as well by CRYPTOSTICTIC acid; were obtained by isolation in thin layer Chromatography (TLC) using toluene-ethyl acetate-formic acid as mobile phase, then, the identification of these compounds was carried out by means of Chromatographic and chemical tests; as well as by UV and IR spectroscopic comparison. *In vitro* tests were conducted from atranorin Pulvinic dilactone compounds in neutrophils, isolated at a concentration of 1×10^7 N/mL by means of colorimetric assays based on tetrazolium salts. The outcomes of the test show that anti-inflammatory atranorin shows an inhibition of 8,3% lower; compared to aspirin and a difference of inhibition of 10,08% less than Pulvinic dilactone; regarding to aspirin. In the test of cell cytotoxicity *in vitro*; Pulvinic dilactone CL50 was 43.92 ($\mu\text{g/mL}$) and the CL50 of the Atranorin was 44.22 ($\mu\text{g/mL}$). However, at 200ppm, the difference shows 15.04% (cell viability) or 84.96% (cyto-toxicity) for atranorin and 20.47% (cell viability) or 79.53 % (cyto-toxicity) by applying this method, the problem of inappropriate use of experimental animals; can be solved since it opens doors for new *in vitro* studies without having to use them.

Key words:

< ANTI-INFLAMMATORY EFFECT > <ATRANORIN> <PULVINIC DILACTONE>
<CRYPTOSTICTIC ACID > <PARMELINA TILIACEA> <ISOLATED NEUTRÓPHILS >
<WST-1> <FORMAZAN> <LICHEN> < UV AND IR ESPECTROSCOPY>

INTRODUCCIÓN

Situación problemática

Existe una gran variedad de problemas a nivel gastrointestinal los cuales son causados por el uso de AINEs, algunos casos muy inespecíficos y con diferencias marcadas en cada una de las poblaciones experimentadas, distintos fármacos, diferentes dosis y fases muy variables, el predominio de estos efectos adversos varía de gran manera.

Frecuentemente del 10 al 20 % de los pacientes estudiados como consumidores de AINES presentan alguna modificación funcional vinculada al aparato digestivo, aunque la prevalencia de esta varía entre el 5 y el 50%. (Efectos gastrointestinales graves por antiinflamatorios, 2006)

La relación que existe entre AINEs y daño digestivo se comprueba por la alta prevalencia de entre un (15-20%) que presentan úlcera gástrica o duodenal en usuarios consumidores de AINEs, dentro de los cuales más del 50% se presentan asintomáticos y entre el (1-3%) se complican con hemorragias y perforaciones.

Los antiinflamatorios no esteroideos causan deterioro al tracto abdominal por medio de un sistema tópico dependiente del grado de solubilidad en el ácido gástrico (se puede mencionar como un aumento del estado molecular liposoluble) lo cual ayudaría a la acción de atravesar membranas.

Y también por medio del efecto sistémico, que depende de la acción de inhibición de la ciclooxigenasa-1, la cual es responsable de la formación de las prostaglandinas que actúan de manera citoprotectoras de la mucosa digestiva. (Frisancho, 2006)

Formulación del problema

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), son en esta época los fármacos más recetados mundialmente, utilizados como paliativos de dolor e inflamación asociados a enfermedades muy graves como son la artritis reumatoide (AR) y otros procesos osteomusculares. Pero, este beneficio está reducidamente coligado con efectos adversos, especialmente con el riesgo de un desarrollo de úlcera péptica y casos graves, como hemorragia y daño a la pared interna abdominal. (Epidemiology of nonsteroidal-antiinflammatory drug-associated gastrointestinal injury, 1998)

La solución a esto sería la búsqueda e investigación de nuevas estructuras y compuestos los cuales tengan propiedades antiinflamatorias y no presenten estos efectos secundarios.

Justificación teórica

Los líquenes poseen alrededor de 700 metabolitos secundarios denominados sustancias liquénicas, muchas de estas poseen un interés farmacológico, bromatológico e industrial. En la actualidad los líquenes están siendo un pico muy importante dentro de la búsqueda de nuevas moléculas orgánicas con propiedades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias y anticancerígenas.

Los cuales pueden convertirse en nuevas cabezas de moléculas pudiendo así ayudar a los tratamientos de enfermedades que la cura conlleva un gran efecto secundario como son los AINEs o enfermedades a las cuales aún no podemos llegar a curar como son el cáncer, VIH. (ILLANA-ESTEBAN, 2012)

Justificación practica

El botánico y farmacólogo de la antigua Grecia Pedanio Dioscórides escribe sobre el liquen en su “Tratado de Plantas Medicinales” (LÓPEZ & al., 2006): “Es un musgo adherido a las piedras húmedas. Aplicado como emplasto, restaña la hemorragia, alivia las inflamaciones y cura las excrescencias cutáneas. Es útil también para los que padecen de ictericia y, untada la boca y la lengua con él, mezclado con miel, alivia las fluxiones”. (ILLANA-ESTEBAN, 2012)

Algunos compuestos liquénicos han sido administrados en pruebas *in vivo*, *in vitro* como antiinflamatorios no esteroideos y han de mostrado una gran capacidad de no poseer los efectos adversos de las cortisonas y una mejor aceptación del tejido abdominal con respecto al resto de AINEs. (Amengual, 2010)

Así esta investigación recae en la posibilidad de encontrar nuevas moléculas con carácter antiinflamatorio y a su vez demostrar que las pruebas *in vitro* en neutrófilos aislados reemplazarán en su totalidad a la de punción con carragenina usada durante varios años.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad antiinflamatoria y citotóxica de compuestos aislados del liquen *Parmelina tiliácea*.

Objetivos específicos

- Identificar grupos químicos representativos de los extractos etéreo, metanólico y acuoso de la especie *Parmelina tiliacea*.
- Aislar mediante cromatografía de capa fina al menos un compuesto presente en *Parmelina tiliacea*.
- Identificar mediante espectrofotometría UV e IR el o los metabolitos aislados y comparar mediante métodos de identificación el nombre y la estructura química de cada uno de ellos.
- Realizar el ensayo antiinflamatorio y de citotoxicidad celular *in vitro* a partir de neutrófilos aislados de los compuestos ya obtenidos.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Marco Filosófico o epistemológico de la investigación

1.1.1. Líquenes

Los líquenes son seres vivos complejos los cuales están formados por cuerpos vegetativos denominados "talos", los cuales se han formado a base de simbiosis de al menos un hongo, el más común de éstos son los ascomicetos; y un compañero fotosintético el cual se encarga del metabolismo de los azúcares dando como resultado una liberación de oxígeno durante el proceso este puede ser cianobacterias o a su vez una alga.

De esta estrecha relación se han originado conjuntos denominados talos liquénicos con una estructura tan estable que cuentan con su propia morfología, anatomía, fisiología y genética la cual es específica para estructura de estos. (Umaña, 2002)

1.1.1.1. Desarrollo y formación

Los líquenes forman compañías biológicas que se encuentran en una gran cantidad de espacios geográficos dentro de la tierra, se hallan presentes desde la región Ártica hasta la Antártica, son encontrados en alturas desde el nivel costero hasta las cordilleras más altas. Se presentan en cualquier tipo de temperatura en lugares fríos, calientes, húmedos o secos, así estos se desarrollan y crecen sobre piedras, arboles (pudiendo ser su corteza o sus hojas) o también el suelo.

Se encuentran constituidos por dos partes: El hongo el cual provee la materia prima como anclaje que es el agua , las sales minerales y por otro lado el otro componente; el alga quien otorga los productos de la fotosíntesis como son los glucósidos. (Umaña, 2002)

Parmelina tiliacea

Posee un talo de 5-7 cm, en algunos casos presenta hasta 18 cm o más, sus lóbulos presentan 6-11 mm de ancho, adyacentes y en algunas ocasiones se presentan de tipo solapantes, de aspecto redondeados con orientación hacia el centro.

La cara superior es grisácea, con tonalidades blanquecinas, la cara inferior que se conecta al sustrato es de color negro, se pueden visualizar algunas ricinas que en algunas ocasiones pueden distinguirse de las orillas de los lóbulos.

Los apotecios se registran en medidas hasta de 6 mm, en ocasiones aún más.

Cuadro 1-1. Clasificación Taxonómica de *Parmelina tiliacea*

Dominio	Eukaryota.
Reino	Fungi.
Filum	Ascomycota.
Clase	Lecanoromycetes
Orden	Lecanorales.
Familia	Parmeliaceae.
Género	<i>Parmelina</i> .
Especie	<i>Parmelina tiliacea</i>
Dominio	Eukaryota.

Fuente: (Boluda, 2006)

Fig. 1-1(liquen *Parmelina tiliacea*)



Fuente: (Hoffm, 1999)

1.1.1.2. Sustancias liquénicas

Para poder imaginarnos la magnitud de compuestos que se hallan dentro de los líquenes se pueden mencionar alrededor de 700 metabolitos secundarios denominados compuestos liquénicos, muchos de los cuales tienen un carácter ácido, por lo que también se los denomina ácidos liquénicos, la concentración de compuestos liquénicos varía entre un 0,14 y 11 % en peso seco; estos se hallan en todo el liquen, a excepción del cortex inferior y en la zona denominada capa gonidial (Ibáñez, 2007)

En bibliografía se han detallado más de 700 metabolitos secundarios exclusivos a partir de líquenes, los cuales por su estudio han sido denominados de mejor manera como sustancias liquénicas.

Entre éstos podemos detallar e incluir ácidos grasos alifáticos, ácidos débiles, derivados de compuestos como el orcinol, b-orcinol, ésteres bencílicos, dibenzofuranos, ácidos úsnicos, xantonas, antraquinonas, terpenoides, ácido úsnico, depsonas, entre otros.

Se puede tomar en cuenta que la mayoría de síntesis de estos compuestos está dada por dos principales vías: la del ácido shikímico y la del acetato polimalonato.

Todos estos compuestos están presentes en la taxonomía de los líquenes. La gran mayoría de estos se generan en la parte externa de la cara anterior del haz y faz de la médula en una capa denominada fotobionte.

Entre las sustancias liquénicas más comunes podemos nombrar:

- Atranorina
- Parietina
- Los ácidos úsnico, vulpínico y rizocárpico
- En la médula los ácidos: lecanórico, girofórico, fumarprotocetrárico, protocetrárico, norestíctico, estíctico, psorómico, salazínico, rododcladónico, tamnólico, barbático, escuamático, etc. (EVA Barreno, 2003)

1.1.1.3. Sustancias liquénicas en el pasado

El conocimiento a través del tiempo de estas sustancias fue fundado por Bebert (1832) al aislar el ácido vulpínico, Alms (1831) al separar el ácido picroliquénico y Knopp (1845) el ácido úsnico.

Un aporte muy importante fue de Gmelin quien en el año 1857, reúne por primera ocasión, los compuestos liquénicos conocidos; pero se toma con mayor importancia al botánico Friedlich Wilhelm considerado “el padre de la liquenología” con su obra “*Die Flechtenstoffe in chemischer, botanischer, pharmakologischer und technischer Beziehung*”, en la que se incluyen más de 145 metabolitos liquénicos.

Hesse entre los años de 1862 y 1906 separa exitosamente un gran número de compuestos liquénicos el cual los reúne dentro de un texto denominado “*Flechtenstoffe*” en 1911.

Emil Fischer sintetiza en su laboratorio por primera vez el ácido lecanórico en el año de 1912.

El químico Asahinam determinó alrededor del año 1929 las fórmulas más comunes de los compuestos liquénicos y junto a Shibatta publicaron un libro sobre liquenología en el cual agruparon compuestos clasificándolos según su estructura, su síntesis, y los métodos por los cuales fueron aislados, purificados. (Ibáñez, 2007)

1.2 Antecedentes de la Investigación

1.2.1 Estudios de nuevas moléculas con actividad antiinflamatoria.

“Asif Husaina, Aftab Ahmad diseñaron y sintetizaron agentes farmacéuticos que contienen anillo heterocíclico imidazolidina con la esperanza de desarrollar agentes antiinflamatorios potentes, seguros y activos por vía oral.

Un número de derivados de imidazolidina-sustituido se sintetizaron partiendo de diamina de etileno y aldehídos aromáticos. Los derivados de imidazolidina se investigaron para su actividad antiinflamatoria, analgésica prevista en ratas albinas Winstar y ratones albinos suizos, respectivamente. (Synthesis, molecular properties, toxicity and biological evaluation of some new substituted Imidazolidine derivatives in search of potent Anti-inflammatory agents, 2015)

Los resultados de las pruebas biológicas indicaron que entre los compuestos sintetizados sólo estos derivados de imidazolidina 4- [1,3-Bis (2,6-dicloro-bencil) -2-imidazolidinil] fenil-dietilamina, 4- [1,3- Bis (3-hidroxi-4-metoxibencil) -2-imidazolidinil] fenil-dietilamina y 4- (1,3-Bis (4-metoxibencil) -4-metilimidazolidin-2-il) -N, N-diethylbenzamine poseen acciones antiinflamatorias y analgésicas prometedoras.

Además estos derivados muestran perfil de seguridad GI superior, (bajo índice de gravedad) con respecto al control positivo, indometacina.” (Synthesis, molecular properties, toxicity and biological evaluation of some new substituted Imidazolidine derivatives in search of potent Anti-inflammatory agents, 2015)

“Una serie de derivados de 5- (carbamoilmetoxi) bencilideno-2-oxo / tioxo-4-tiazolidinona (6-9) se sintetizaron como inhibidores de la aldosa reductasa (AR), enzima que desempeña un papel crucial en el desarrollo de complicaciones de la diabetes, así como en los procesos inflamatorios asociados tanto a la diabetes mellitus y otras patologías.

En la actividad inhibidora *in vitro* indicaron que los compuestos 6-9^a-D fueron generalmente buenos inhibidores de la AR. Se muestran derivados de ácido acético 8^a-d y 9^a-d a ser los mejores inhibidores de la enzima entre los compuestos ensayados dotados de niveles de habilidad inhibidores significativos que alcanzan valores de IC₅₀ submicromolares.” (Structure–activity relationships and molecular modelling of new 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives as aldose reductase inhibitors and potential anti-inflammatory agents, 2014)

1.3. Bases Teóricas

1.3.1 Estudio de compuestos liquénicos con actividad antiinflamatoria.

El extracto metanólico del líquen *Peltigera rufescens* de la familia de las (*Peltigeraceae*).

Investigaron el extracto a partir del ensayo de punción con carragenina en ratas, tomando como control indometacina y diclofenaco. Analizaron las fases de inflamación y mostraron que tiene un poder antiinflamatorio en un 63.5 % en comparación con los controles. (Evaluation of anti-inflammatory and antioxidant activities of *Peltigera rufescens* lichen species in acute and chronic inflammation models, 2010)

Los productos naturales, longissiminone A, longissiminone B, y glutinol fueron aislados a partir de *Usnea longissima* y con estos se realizó la actividad antiinflamatoria y citotóxica en un ensayo con neutrófilos aislados.

Los resultados mostraron que longissiminone A tuvo un 72.1 % de inhibición a la inflamación, longissiminone B un 34%, y glutinol un 11.44 % en comparación a los controles que fueron la indometacina con un valor de 58.8% y a la aspirina un 70.45 %. (Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen *Usnea longissima*, 2005)

1.3.2 Estudio de pruebas in vitro a nivel celular por medio de la reducción de sal de tetrazolio.

Los productos naturales, longissiminone A, longissiminone B, y glutinol fueron aislados a partir de *Usnea longissima* y con estos se realizó la actividad antiinflamatoria y citotóxica en un ensayo con neutrófilos aislados; se midió la actividad a partir de la reducción de sal de tetrazolio; se tomó como control los valores de administración a 400 (ppm) de la aspirina e indometacina. (Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen *Usnea longissima*, 2005)

Las sales de tetrazolio han sido unas de las herramientas más abundantemente utilizadas en biología celular para poder medir la actividad celular metabólicamente hablando. Los estudios revelan que el cofactor de nucleótidos piridina reducida, NADH, es responsable de la mayor reducción de las sales de tetrazolio de primera generación (sales de tetrazolio MTT y NBT). Esta reducción está asociada no solo con las mitocondrias, sino también se relaciona con el citoplasma y con cada una de las membranas mitocondriales no incluyendo el endosoma/lisosoma y el compartimiento de la membrana plasmática.

Sin embargo, los colorantes de tetrazolio segunda generación que forman formazanos solubles en agua y requieren un aceptor de electrones para la reducción del intermedio (XTT, WST-1 y en cierta medida, MTS), se caracterizan por una carga negativa neta y por lo tanto en gran medida impermeable celular. Una considerable evidencia indica que la reducción que se produce en la superficie celular, o en el nivel de la membrana plasmática a través de la membrana de transporte de electrones transplasma. Las implicaciones de estos nuevos hallazgos se discuten en términos de la utilización de colorantes de tetrazolio como indicadores del metabolismo celular y sus aplicaciones en la biología celular. (Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, 2005)

El desencadenamiento respiratorio de los neutrófilos se suele medir espectrofotométricamente siguiendo la reducción de ferricitocromo c, e histológicamente mediante el uso de la sal de tetrazolio, nitroazul de tetrazolio, que se reduce intracelularmente a un formazán insoluble. En ambos ensayos, la reducción está mediada por superóxido generado a través de NADPH oxidasa. Debido a que el ferricitocromo c tiene un alto peso molecular y alta absorbancia de fondo a 550 nm, el ensayo carece de sensibilidad y no es ideal para microplacas medición.

Hemos eludido estas limitaciones mediante el uso de la impermeable a las células, sulfonados sal de tetrazolio, WST-1, que exhibe muy baja absorbancia de fondo y se reduce de manera eficiente por superóxido a un formazán soluble en agua estable con alta absortividad molar. Esto ha permitido la adaptación del ensayo WST-1 a microplacas formato al tiempo que conserva la sensibilidad. La reducción de WST-1 activados por los neutrófilos de sangre periférica humana se correlacionaron estrechamente con la reducción de ferricitocromo c a través de una gama de concentraciones de PMA y con el tiempo de la activación por PMA y fMLP. La reducción de WST-1 se inhibió en un 98% por la superóxido dismutasa (20 mg / ml) y un 88% por el inhibidor de NADPH oxidasa, diphenyleneiodinium (10 M), pero era resistente a la catalasa, azida y el inhibidor de NADH oxidasa, resiniferatoxina. WST-1 y la reducción de ferricitocromo c también se compararon mediante la xantina / xantina oxidasa para generar superóxido.

Bajo condiciones de ensayo optimizadas, tanto WST-1 y la reducción de ferricitocromo C fueron directamente proporcional a la xantina añadido. WST-1 generó un aumento aproximadamente 2 veces mayor en la absorbancia de ferricitocromo c en sus respectivas longitudes de onda, y esto se tradujo en un aumento de la sensibilidad del ensayo. La adición del aceptor de electrones intermedio, metosulfato de fenazina 1-metoxi, aumentó el fondo del ensayo de neutrófilos, pero no afectó la magnitud total de la respuesta. Hemos utilizado el ensayo de WST-1 para evaluar la disfunción de neutrófilos humanos y para comparar la actividad anti-inflamatoria. (Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents, 2000)

CAPITULO II

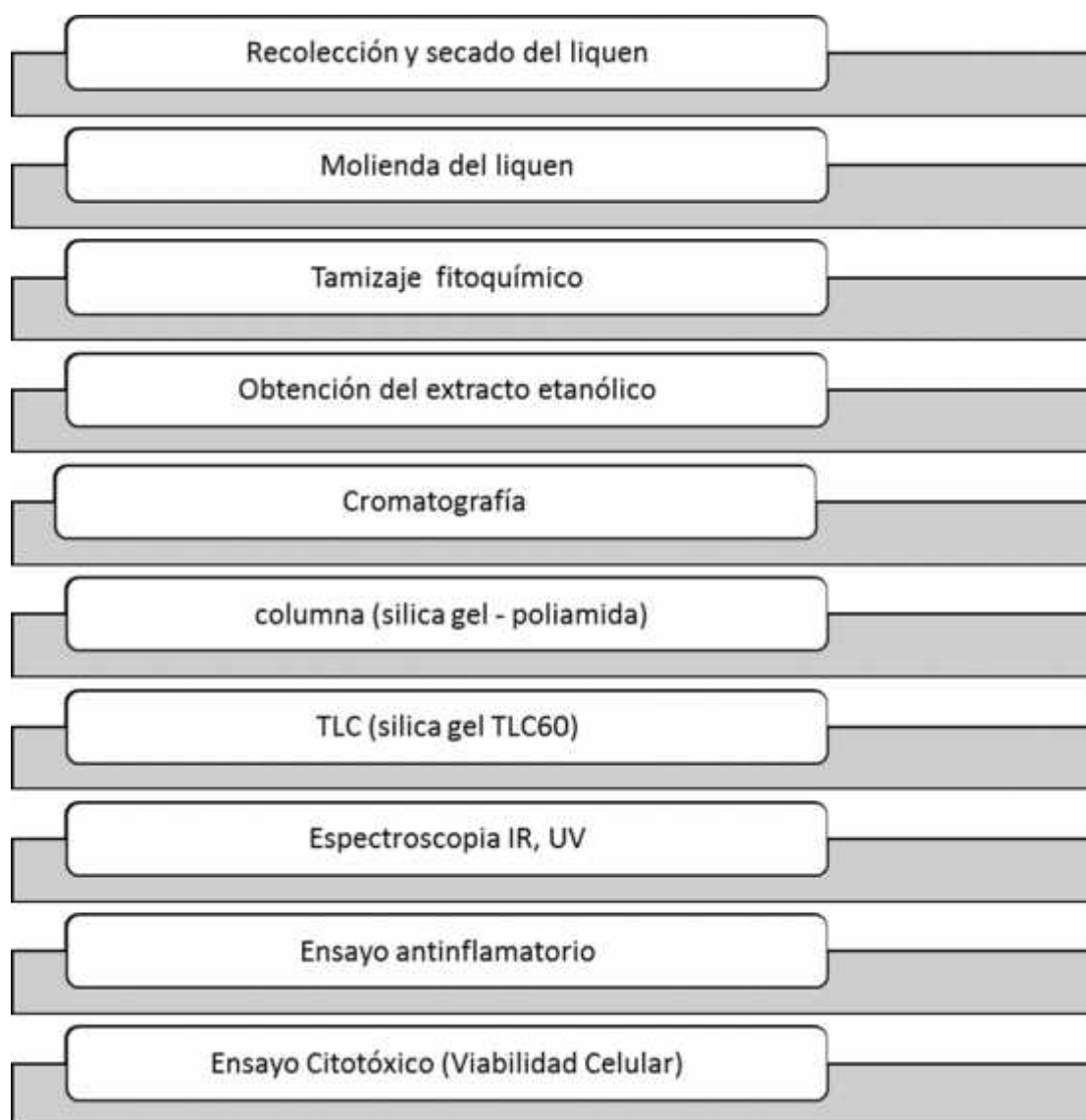
2. METODOLOGÍA

2.1 Unidad de Análisis

Los sujetos u objetos de estudio en esta investigación fueron los compuestos aislados del líquen *Parmelina tiliacea* en los cuales se probaron las actividades antiinflamatoria y citotóxica.

A continuación se explican y desarrollan cada uno de estos procesos por los cuales se extendió mi investigación:

Cuadro 1-2. Secuencia lógica de investigación



2.1.1 Recolección y secado del líquen

Para la presente investigación se realizó el muestreo del líquen *Parmelina tiliácea* en la zona San miguel (Zona Andina) con una ubicación de las siguientes coordenadas geográficas:

S 01° 43.863'

W 079° 03.3069'

Altitud: 2728 m.

Al momento del muestreo, el líquen se recolectó de la manera más cuidadosa sin tomar porciones de corteza ni hojas, ya que si ésta se presentara en el análisis nos daría problemas afines a compuestos que no pertenezcan al líquen sino al árbol del cual fue recogido (*Euphorbia laurifolia*).

Fig. 1-2 Recolección del líquen



Realizado por (Janeta, 2015)

Al final de la toma de muestra se logró recolectar alrededor de 250 g, los cuales fueron sellados en una funda negra sin contacto solar y transportados a la ciudad de Riobamba a una bodega donde fueron secados naturalmente durante tres semanas, Al mantener seco el líquen, se mantienen intactos los compuestos para su posterior análisis.

2.1.2. Molienda del líquen

La molienda del líquen se realizó en un molino de 100W, donde el líquen fue triturado hasta obtener 200 g, ya que al momento de la recolección por más cuidadosa y exhaustiva que fue, entre el líquen también se recogieron hojas y partes del árbol, las cuales fueron separadas al momento de

la molienda; cabe mencionar que si no se daba la posibilidad de separación, se excluía esta porción de líquen.

Figura. 2-2 Molienda del líquen



Realizado por (Janeta, 2015)

2.1.3. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es un conjunto de pruebas usadas como herramienta para determinar la presencia de metabolitos secundarios según las características estructurales y de solubilidad de cada uno de estos compuestos.

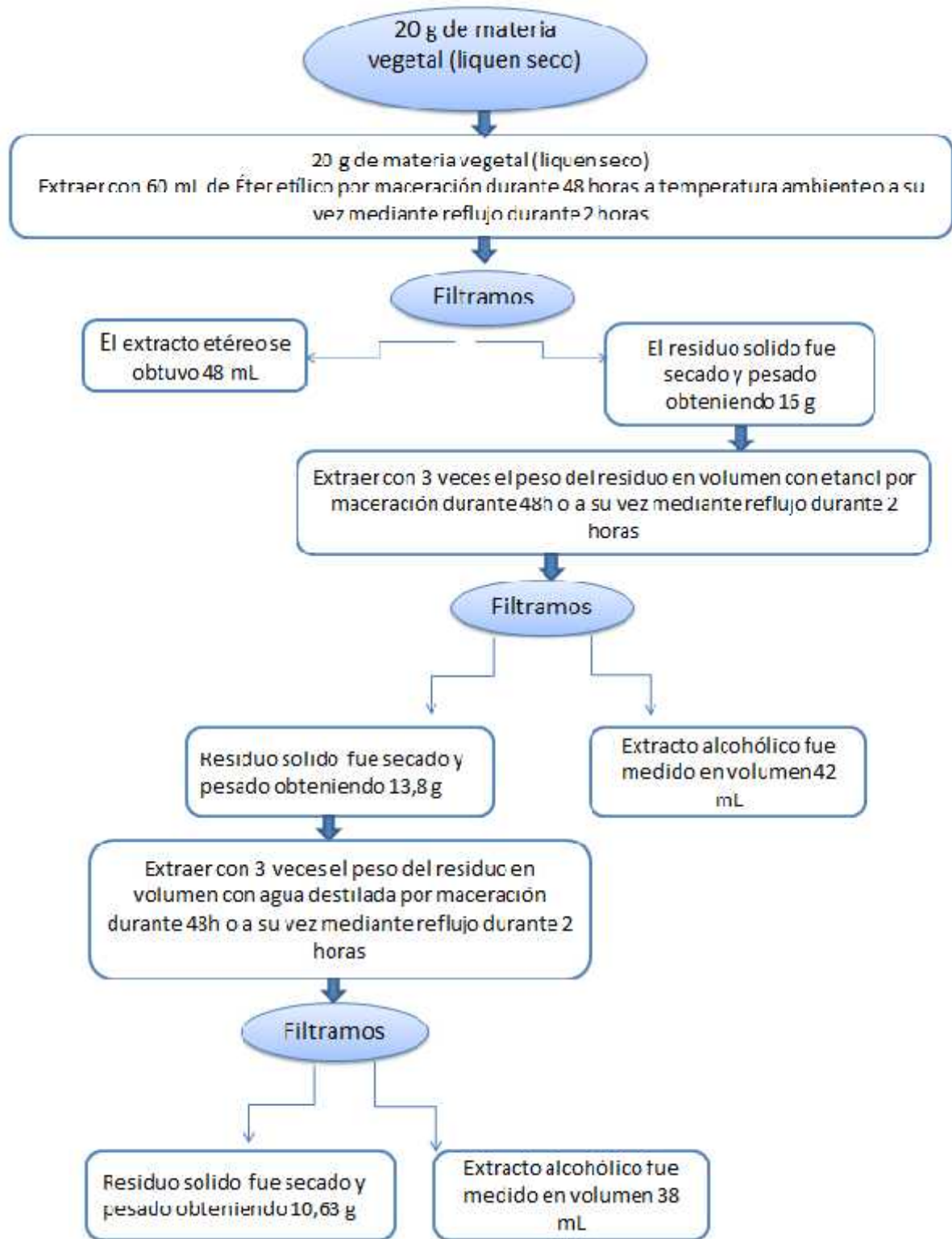
Figura. 3.2 Tamizaje fitoquímico



Realizado por (Janeta, 2015)

Se procedió a realizar el tamizaje fitoquímico del liquen; a continuación se redacta el procedimiento:

Cuadro. 2-2. Procedimiento tamizaje fitoquímico



Realizado por (Janeta, 2015)

A partir del extracto etéreo se dividió este en porciones de 2,5mL y se realizaron las siguientes pruebas:

Ensayo de Sudán III

Permite conocer si dentro de un extracto se puede observar la presencia de compuestos grasos, el ensayo se considera positivo si se observa manchas o una capa de un color rojo en el centro del tubo o en las paredes respectivamente.

Ensayo de Dragendorff

Esta prueba permite reconocer la presencia de alcaloides, para ello la muestra se tiene que calentarse a baño maría hasta la sequedad. Este concentrado se debe recuperar en 1 ml de HCl al 1 %. A este se le adiciona una gota de HCl concentrado, se lo calienta levemente y se deja en reposo para que se enfríe para su acidez, para determinar Dragendorff se adicionan 3 gotas de reactivo y se observa, si se encuentra opalescencia se determina como positivo.

Ensayo de Mayer y el de Wagner

Esta prueba permite reconocer la presencia de alcaloides, se procede de la misma manera que para el ensayo de Dragendorff, hasta obtener la solución acida después de añadir el HCL al 1%. Se añade 2 o 3 gotas a esta solución y se nota opalescencia dentro del tubo, alguna turbidez o un precipitado coposo se nota que la reacción es positiva a presencia de alcaloides.

Cuando exista presencia de alcaloides cuaternarios o también presencia de aminoácidos libres estos solo estarán presentes dentro del extracto acuoso y para determinar la presencia se observará si presenta turbidez o algún precipitado será positivo, ya que la opalescencia puede dar un resultado falso.

Ensayo de Baljet

Permite identificar la presencia de compuestos que contengan el grupo Lactónico, en especial de las Cumarinas. Se denota la presencia por la aparición de coloración y un precipitado.

Para identificar la presencia de quinonas se desarrolla el ensayo de Borntrager. Si la parte acuosa alcalina se torna roja-rosado se considera positiva.

Ensayo de Liebermann – Burchard

Este ensayo se lo realiza para la determinación de triterpenos o esteroides.

Ensayo de Ninhidrina

Se determina la presencia de aminoácidos libres y también la presencia de aminos en general se puede considerar como positivo cuando se torna un color violeta.

Ensayo de Shinoda

Determina la presencia de flavonoides en un extracto. El ensayo se lo puede considerar positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, tomate, rojo.

Ensayo de antocianidinas

Por medio de este ensayo se puede identificar la existencia de las estructuras con la siguiente secuencia C6-C3-C6 del grupo que pertenece a los flavonoides. La reacción se considera positiva a la aparición de un color rojo tono marrón.

Los mucílagos pueden estar presentes cuando estructuras polisacáridos las cuales pueden formar un coloide hidrófilo se forman dentro del agua una masa la cual aumenta la densidad de esta.

Ensayo de espuma

Permite determinar la presencia de saponinas, pudiendo ser del tipo esterooidal como también triterpénicas.

Ensayo de Fehling

En este ensayo se reconoce la presencia de azúcares reductores esta prueba se considera positiva si la muestra toma un color rojo ladrillo o precipita rojo

El tamizaje fitoquímico presentó los siguientes resultados.

Cuadro. 3.2. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto Etéreo

PRUEBA	DETERMINACIÓN	RESULTADO
Ensayo de sudan	Determinación de aceites y grasas	(+)
Ensayo de Alcaloides	Determinación de Alcaloides	
Ensayo de Dragendorff		(-)
Ensayo de Mayer		(-)
Ensayo de Wagner		(-)
Ensayo de Baljet	Determinación de lactonas y coumarinas	(-)
Ensayo de Liebermann-Buchard	Determina la presencia de Triterpenos y esteroides	(++)

Realizado por (Janeta, 2015)

A continuación, al extracto etanólico se lo dividió en porciones de 2,5 ml y se realizaron las siguientes pruebas presentando los siguientes resultados:

Cuadro. 4-2. .Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto Etanólico

PRUEBA	DETERMINACIÓN	RESULTADO
Ensayo de Hidroxamato férrico	Determinación de Coumarinas	(-)
Ensayo de Alcaloides	Determinación de Alcaloides	
Ensayo de Dragendorff		(-)
Ensayo de Mayer		(-)
Ensayo de Wahner		(-)
Ensayo de Borntrger	Determinación de Quinolonas	(-)
Ensayo de Liebermann-Buchard	Determina la presencia de Triterpenos y esteroides	(++)
Ensayo de Catequinas		(-)
Ensayo de resinas		(-)
Ensayo de Fehling	Determinación de azúcares reductores	(-)
Ensayo de Espuma	Determinación de Saponinas	(-)
Ensayo de Cloruro Férrico	Determinación de compuestos fenólicos	(+++)
Ensayo de Ninhidrina	Determina presencia de Aminoácidos	(-)

Realizado por (Janeta, 2015)

A continuación, al extracto Acuoso se lo dividió en porciones de 2,5mL y se realizaron las siguientes pruebas presentando los siguientes resultados

Cuadro. 5-2. .Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto Acuoso

PRUEBA	DETERMINACIÓN	RESULTADO
Ensayo de Alcaloides	Determinación de Alcaloides	
Ensayo de Dragendorff		(-)
Ensayo de Mayer		(-)
Ensayo de Wahner		(-)
Ensayo de principios amargos		(-)
Ensayo de resinas		(-)
Ensayo de Fehling	Determinación de azúcares reductores	(-)
Ensayo de Espuma	Determinación de Saponinas	(-)
Ensayo de Cloruro Férrico	Determinación de compuestos fenólicos	(+++)
Ensayo de Ninhidrina	Determina presencia de Aminoácidos	(-)

Realizado por (Janeta, 2015)

2.1.4 Obtención del extracto etanólico

En un balón de 500 ml se procedió a colocar 20 g de líquen seco, triturado y 200 ml de etanol absoluto; se colocó en un reflujo por 2 horas como se muestra en la Fig. 5, con cuidado del aumento de temperatura y el flujo de corriente de agua; después se filtró el extracto y se obtuvo aproximadamente 129 ml, los cuales fueron concentrados en un rotavapor hasta obtener 10 ml de extracto listo para realizar punciones para la cromatografía a 50°C y presión negativa adecuada.

Figura. 4-2.Reflujo



Realizado por (Janeta, 2015)

2.1.5 CROMATOGRAFÍA

2.1.5.1 La cromatografía en fase reversa (RPC)

La presente se dio por la suposición de poder obtener ácido úsnico a partir del líquen *Parmelia tiliácea* y partiendo de la bibliografía (Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites) en la cual nos indicaban que al obtener un extracto a partir de Acetona y separarlos mediante cromatografía (HPLC en columna C18) en una fase móvil que se trataba de Metanol-agua-Ácido fosfórico en proporciones 75:25:0,9 el ácido úsnico sería visualizado de manera muy clara en la separación. (Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen *Usnea longissima*, 2005)

Se replicó en el laboratorio de la siguiente manera:

Se tomó una muestra de 25 gramos de líquen y se reflujo durante 2 horas con Acetona a fuego lento

Después de obtener el extracto se lo concentró hasta sequedad en el rota vapor a 40°C y fue puesto en desecador por 12 horas para mantener el extracto lo más seco posible

Al momento de tener la muestra de extracto acetónico de líquen para cromatografía se preparó una placa de sílica gel en fase reversa (RPC) 20x20 cm la cual fue cortada en 4.

A una de ella se la activó con metanol.

Al momento de cada aplicación en la placa esta se dejó secar hasta poder aplicarla de nuevo, así sucesivamente hasta poder tener una muestra significativa que pueda correr por toda la placa.

Se Preparó la cuba de cromatografía con 25 mL de metanol 8,3 de agua destilada y 0,3 de ácido fosfórico manteniendo la concentración mostrada en el paper,

Se corrió la placa durante 6 horas aproximadamente y se presentó de la siguiente manera como muestra la Fig. 3.4

Figura. 6-2. (RPC)



Fuente: (Janeta, 2015)

Al observar que teníamos aún más compuestos dentro del extracto además del posible Ácido úsnico, se determinó que se podría obtener a partir del extracto Acetónico.

Ácidos polares como proctocetarico, hiasico, leprarico, cryptostictico, Así se mezcló el extracto con benceno, según bibliografía en el precipitado se encontraría ácido úsnico

Luego se procedió a filtrar y a concentrar el lavado con benceno a partir del extracto acetónico.

Para poder obtener de esta manera ácidos polares quedando listo para una posterior cromatografía en fase reversa junto al precipitado que debería contener ácido úsnico, junto al extracto acetónico como control de estos compuestos.

Para la cromatografía se procedió a activar la placa con metanol, dejarla secar y después a realizar cada uno de los pinchazos en las 3 zonas con posible ácido úsnico, ácidos polares y extracto acetónico respectivamente.

Nuevamente la fase móvil de la cromatografía fue 25 MI de metanol 8,3 de agua destilada y 0,3 de ácido fosfórico manteniendo la concentración 75:25:0,9.

Figura. 6-2. (RPC)



Fuente: (Janeta, 2015)

La cromatografía corrió durante 6 horas aproximadamente y no existió una buena separación tampoco, y se presentaron un gran número de manchas.

Para probar cuál de las manchas presentes en la cromatografía de ácido úsnico pertenecía a este se utilizó de control Acido Usnico al 98% de pureza y se realizó nuevamente una cromatografía en fase reversa.

Nuevamente se utilizó metanol como activante, se lo dejó secar y después se realizó cada uno de los pinchazos ahora en 4 zonas con ácido úsnico al 98% de pureza, extracto acetónico, y precipitado de benceno y extracto total a partir de extracto acetónico. Se concluyó que no hubo una buena separación de los compuestos totales y del posible ácido úsnico ya que se vieron afectados por otros compuestos liquénicos; siendo así se procedió a un cambio de fase estacionaria en la cual utilizaríamos placas de silica gel 60 F₂₅₄ TLC aluminium roll

Figura. 7-2. (RPC)



Fuente: (Janeta, 2015)

2.1.5.2 Cromatografía en columna

2.1.5.2.1. Cromatografía en columna de poliamida

Durante la preparación de la columna se utilizó una columna de 24 cm de largo y 5 cm de diámetro la fase estacionaria fue poliamida.

Figura 8-2. Columna de poliamida



Fuente: (Janeta, 2015)

Procedimiento:

Lavamos exhaustivamente la columna con agua, jabón y la secamos a 105°C en la estufa.

Colocamos cuidadosamente la poliamida dentro de la columna hasta llenarla, después procedemos a empaquetarla con fase móvil cloroformo: acetato de etilo (50:50), después cerramos la columna y empezamos a dar pequeños golpes a las paredes para liberar el aire dentro de ésta y dejamos reposar para que el proceso de compactación sea completo.

Al ya mostrarse empacada la columna se procedió a mezclar el extracto etanólico concentrado con poliamida disuelta en fase móvil y poco a poco con mucho cuidado se fue colocando el extracto dentro de la columna. Al momento en que el extracto se presentó de una manera uniforme por toda

la parte superior de la columna, se dejó que el solvente bajara poco a poco y con mucho cuidado se fue añadiendo más solvente por la parte superior de la columna.

Al principio de la columna se mostró una buena separación de los compuestos apolares que migraron más pronto que los polares y medianamente polares, pero al momento de la separación de los compuestos medianamente polares empezaron a presentar velas en la zona media de la columna y poco a poco la buena separación presentada al inicio se fue perdiendo por éstas.

Se analizó las posibilidades de una repetición pero en este caso se repitió el mismo proceso pero con un cambio de fase móvil Etanol: Cloruro metileno en proporciones (50:50)

2.1.5.2.2. Cromatografía en columna de poliamida (2)

Durante la preparación de la columna se utilizó una columna de 24 cm de largo y 5 cm de diámetro, la fase estacionaria fue poliamida la fase móvil fue Etanol: Cloruro metileno en proporciones (50:50)

Procedimiento:

- 1.- Lavamos exhaustivamente la columna con agua, jabón y la secamos a 105°C en la estufa.
- 2.- Colocamos cuidadosamente la poliamida dentro de la columna hasta llenarla, después procedimos a empaquetarla con fase móvil etanol: Cloruro metileno en proporciones (50:50), después cerramos la columna y empezamos a dar pequeños golpes a las paredes para liberar el aire dentro de ésta y dejamos reposar para que el proceso de compactación sea completo.
- 3.-Al ya mostrarse empacada la columna se procedió a mezclar el extracto etanólico concentrado con poliamida disuelta en fase móvil y poco a poco con mucho cuidado se fue colocando el extracto dentro de la columna.
- 4.-Al momento en que el extracto se presentó de una manera uniforme por toda la parte superior de la columna se dejó que el solvente bajara poco a poco y con mucho cuidado se fue añadiendo más solvente por la parte superior de la columna.

Figura. 9-2. Columna



Fuente: (Janeta, 2015)

5.- Al principio de la columna, al dejar caer las primeras gotas de solvente se presentó un problema: Los compuestos medianamente polares al ser más afines al solvente empezaron a bajar más pronto que los polares y apolares que se encontraban más bajos, así estos empezaron a bajar pero en forma de vela lo cual dio por pérdida total de la columna.

6.-Al presentarse este problema se decidió realizar una cromatografía en columna flash para que la presión ayude a una mejor separación.

3.1.5.3. Cromatografía en columna flash

Se utilizó como columna un filtro para cromatografía flash de longitud de 6 cm de alto y 4,5 cm de diámetro con fase móvil cloroformo: acetato de etilo (50:50).

Procedimiento:

- 1.- Lavamos exhaustivamente la columna con agua, jabón y la secamos a 105°C en la estufa.
- 2.- Colocamos cuidadosamente la poliamida dentro de la columna hasta llenarla, después procedemos a empaquetarla con fase móvil cloroformo: acetato de etilo (50:50), después cerramos la columna y empezamos a dar pequeños golpes a las paredes para liberar el aire dentro de ésta y dejamos reposar para que el proceso de compactación sea completo como se muestra en la Fig:

Figura. 10-2. Columna flash



Fuente: (Janeta, 2015)

3.-Al ya mostrarse empacada la columna se procedió a mezclar el extracto etanólico concentrado con poliamida disuelta en fase móvil y poco a poco con mucho cuidado se fue colocando el extracto dentro de la columna.

4.-Al momento en que el extracto se presentó de una manera uniforme por toda la parte superior de la columna; se colocó con mucho cuidado la bomba de presión y mucho cuidado y precisión se fue bombeando mientras por la parte superior a manera de goteo por las paredes se fue adicionando el solvente como se muestra en la Fig:

Figura. 11-2. Columna flash



Fuente: (Janeta, 2015)

5.-Con ayuda de la presión, la disociación fue mucho mejor ya que se controlaba la velocidad de separación de los compuestos así se pudo observar la clara separación de 3 zonas como la Fig.:

Figura. 12-2. Columna flash



Fuente: (Janeta, 2015)

Pero se apreció también que la zona de compuestos polares no tuvo una separación dando solo 3 posibles compuestos, los cuales al momento de su separación y concentración fueron analizados por cromatografía en capa fina silica gel y mostraron que la primera fracción mostraba un solo compuesto a la vista pero 3 a la luz UV y más de 5 al momento del revelado, que el segundo también no se encontraban purificado sino que tenía la presencia de más compuestos que a la vista normal no eran susceptibles pero al momento de revisarlos en la cámara UV eran muy notables y la tercera fracción presentaba 2 compuestos uno en gran cantidad y otro en una cantidad muy baja, con lo cual podríamos separar el compuesto que se presentaba en mayor cantidad; Como no se presentó la separación de cada compuesto en cada fracción se procedió un cambio de fases, tal como muestra la Fig:

Figura. 13-2. Cromatografía TLC



Fuente: (Janeta, 2015)

La imagen muestra la Cromatografía de compuestos de columna de poliamida de izquierda a derecha se presentan el extracto total, fracción 1, fracción 2 y fracción 3

6.- Se optó por un cambio el cual fue realizar la cromatografía en placa silica gel con cambio de fase estacionaria siendo TLC silica gel 60 F₂₅₄ y un cambio en la fase móvil siendo cloruro metileno y metanol en proporción (65:35)

2.1.5.4. Cromatografía TLC en silica gel 60 F₂₅₄

1.- Se tomó como inicio el sistema de solventes cloruro metileno y metanol en proporción (65:35) para poder probar la polaridad de los compuestos liquénicos que poseíamos.

La comparación de ácido úsnico control respecto a nuestros compuestos quedo descartada, ya que los R_f de los anteriores no coincidían y quedo descartada que ningún otro compuesto del extracto acetónico era parecido ni en R_f ni en mancha observada ni visualizada dentro de la cámara UV, como se visualiza en la Fig.

Figura. 14-2 Cromatografía TLC



Fuente: (Janeta, 2015)

La imagen muestra la cromatografía de compuestos de columna de poliamida de izquierda a derecha se presentan el control ácido úsnico 1, fracción 1, fracción 2 y fracción 3.

Así se demostró que la parte polar de nuestros líquenes no tomaba acción frente a este sistema de solventes y la parte apolar se veía sin separación, procediendo así a un cambio de fase móvil.

2.- Este segundo sistema continuó con una fase cloroformo- metanol en una proporción (50:50) para ver si la polaridad bajó lo suficiente para poder llevar los compuestos polares y medianamente polares.

En este sistema de solventes la polaridad siguió demasiado alta ya que no hubo una separación sustancial de los compuestos así que se decidió bajar aún más para ver si se consigue una mejor resolución, como muestra la Fig.

Figura. 15-2. Cromatografía TLC



Fuente: (Janeta, 2015)

Fig.16. Cromatografía de compuestos de columna de poliamida de izquierda a derecha se presenta la fracción 1 y fracción 2. (Janeta, 2015)

3.-En el tercer sistema de solventes se utilizó cloroformo y acetato de etilo en una proporción (60-40) para probar si con este sistema lográbamos resolver el problema de la polaridad.

Este sistema de solventes tuvo un buen recorrido de manchas pero no una resolución en la cual podamos distinguir manchas de compuestos como podemos ver en la Fig.17. Así que se procedió a un cambio de fase móvil.

Figura.16-2.
Cromatografía
TLC

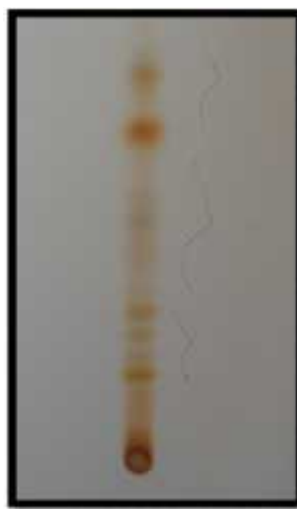


Realizado por (Janeta, 2015)

4.-La fase utilizada fue Tolueno-Acetato de etilo-Ac fórmico en proporción (139:83:8) basándonos en la técnica de catálogo de cromatografía estandarizada de sustancias liquénicas (Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen *Usnea longissima*, 2005)

Este sistema de solventes tuvo la mejor resolución y separación de los compuestos liquénicos a la vista y en cámara UV, para mostrar los compuestos en la placa que no son visibles a simple vista se procedió a realizar un revelado con H_2SO_4 al 10% dando como resultado la siguiente imagen. Fig. 17.

Figura. 17-2Cromatografía TLC



Realizado por (Janeta, 2015)

Se observa en la imagen la cromatografía extracto etanólico de fase móvil Tolueno-Acetato de etilo-Ac fórmico (139:83:8).

Este sistema de solventes es tomado como uno de los estándares entre compuestos liquénicos, así que al ver la buena resolución de este se empezó a la posible identificación de los compuestos.

2.1.6. Separación e identificación de los compuestos por Cromatografía

1.-Al tener la tercera fracción separada por cromatografía flash en la cual se presentaron dos compuestos uno en más concentración que otro, se procedió a realizar una separación por medio de una placa preparativa de 17c m de largo por 12 cm.

La fase utilizada fue Tolueno-Acetato de etilo-Ac fórmico en proporción (139:83:8), después se tomó el compuesto que se encontraba en mayor cantidad, se hizo un raspado en la zona donde este se presentaba con un bisturí y posteriormente la silica de la placa la cual presentaba el compuesto fue mezclada con metanol caliente y filtrada para poder separar la silica del compuesto y así purificarlo como muestra la Fig.

Figura. 18-2 Placa preparativa



Realizado por (Janeta, 2015)

Se muestra en la imagen una cromatografía en placa preparativa extracto etanólico de fase móvil Tolueno-Acetato de etilo-Ac fórmico (139:83:8)

2.- El compuesto separado fue reconstituido en 2ml de metanol y fue corrida en una cromatografía TLC en el sistema ya mencionado para comprobar si la separación fue exitosa. Dando como resultado la siguiente imagen. Fig.

Figura. 19-2 Compuesto 1



Realizado por (Janeta, 2015)

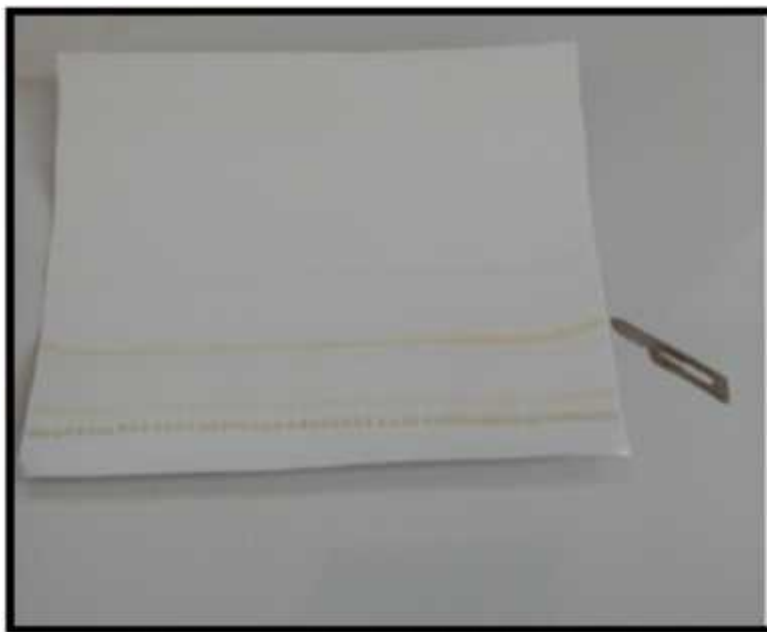
La imagen muestra una Cromatografía del aislamiento del compuesto N°1 fase móvil Tolueno-Acetato de etilo-Ac fórmico (139:83:8)

3.-La imagen nos demuestra que hubo mucha pérdida de compuesto ya que al UV y al momento de revelado de la placa se mostró casi imperceptible. Se analizó que así no se podría lograr una concentración adecuada del compuesto para realizar los análisis de identificación por espectroscopia Ir y UV.

4.- Así se realizó una placa preparativa del extracto total para extraer los componentes directamente y esperar una mejor concentración de cada uno de los compuestos.

5.-El resultado se presenta en la Fig.

Figura. 20-2. Cromatografía placa preparativa extracto etanólico

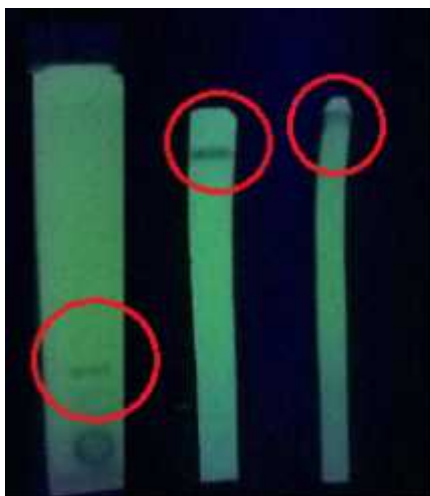


Realizado por (Janeta, 2015)

6.-Se intentó separar cada uno de los 12 compuestos que se mostraban en la placa; para los compuestos de RF altos se utilizó un solvente no polar como es el tolueno para su reconstitución y para los compuestos medianamente polares y polares se utilizó un solvente como es el metanol.

7.-Durante esta separación se pudieron extraer tres compuestos: dos de la zona alta de RF y uno de la zona baja con cuales se comprobó la existencia de un único compuesto en cada uno mostrado en la Fig.

Figura. 21-2. Cámara UV de los 3 compuestos



Realizado por (Janeta, 2015)

Figura. 22-2. Compuestos aislados



Realizado por (Janeta, 2015)

Fig.22.Compuestos separados por placa preparativa en fase móvil Tolueno-Acetato de etilo-Ac fórmico (139:83:8)

8.- Los demás compuestos se encontraron ionizados y no pudieron ser separados de la silica así que se procedió a continuar el estudio solamente con estos 3.

3.1.6.1. Identificación de los compuestos liquénicos

Para su identificación se utilizó la tercera edición de A. Jhon Elix un catálogo de datos sobre cromatografía estandarizada de relaciones biosintéticas de sustancias liquénicas, seguida de espectroscopia UV y espectroscopia IR para comparar con bibliografía nuestros compuestos.

1.-Esta tercera edición del catálogo incorpora 854 sustancias liquénicas los cuales han sido reportados y caracterizados durante 20 años, clasificados según los siguientes parámetros:

- Valores del Rf en sistemas estándares para compuestos liquénicos
- Color frente a la luz UV
- Tonalidad frente al revelado con H₂SO₄
- Pruebas estándares para líquenes (K,C,KC,CK)
- Espectrofotometría de masas

Con estos parámetros la identificación de cada una de las sustancias liquénicas se daría de una manera más sencilla y junto a la espectrometría UV e IR se podría tener una identificación óptima de cada uno de los compuestos aislados.

Cuadro.6-2 fase estacionaria silica gel, fase móvil Tolueno-Acetato de etilo-Ac fórmico (139:83:8)

A.- Tolueno-Acetato de etilo-Ac fórmico (139:83:8)

NUMERO DE MANCHA ORDEN DESCENDENTE	RF CORRESPONDIENTE
Mancha Numero 1	$\frac{6.9}{7.7} = 0.896$
Mancha Numero 2	$\frac{5.9}{7.7} = 0.766$
Mancha Numero 3	$\frac{5.7}{7.7} = 0.740$
Mancha Numero 4	$\frac{5.4}{7.7} = 0.701$
Mancha Numero 5	$\frac{4.9}{7.7} = 0.636$
Mancha Numero 6	$\frac{4.4}{7.7} = 0.571$
Mancha Numero 7	$\frac{4.2}{7.7} = 0.545$
Mancha Numero 8	$\frac{3.75}{7.7} = 0.487$
Mancha Numero 9	$\frac{3.1}{7.7} = 0.403$
Mancha Numero 10	$\frac{1.8}{7.7} = 0.234$
Mancha Numero 11	$\frac{1.5}{7.7} = 0.195$
Mancha Numero 12	$\frac{1.2}{7.7} = 0.156$

Cada compuesto aislado presentó los siguientes Rf:

NUMERO DE MANCHA ORDEN DESCENDENTE	RF CORRESPONDIENTE
Compuesto Numero 1	$\frac{6.5}{7.8} = 0.833$
Compuesto Numero 2	$\frac{6.0}{7.8} = 0.769$
Compuesto Numero 3	$\frac{1.6}{7.8} = 0.205$

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro.7-2. fase estacionaria silica gel, fase móvil Hexano/Di Etil Éter/Ácido fórmico (130:80:20)



B.- Hexano/Di Etil Éter/Ácido fórmico (130:80:20)

NUMERO DE MANCHA ORDEN DESCENDENTE	RF CORRESPONDIENTE
Mancha Numero 1	$\frac{6.5}{7.7} = 0.84$
Mancha Numero 2	$\frac{5.75}{7.7} = 0.74$
Mancha Numero 3	$\frac{4.85}{7.7} = 0.629$
Mancha Numero 4	$\frac{4.2}{7.7} = 0.54$
Mancha Numero 5	$\frac{3.8}{7.7} = 0.49$
Mancha Numero 6	$\frac{2.8}{7.7} = 0.364$
Mancha Numero 7	$\frac{2.35}{7.7} = 0.30$
Mancha Numero 8	$\frac{1.75}{7.7} = 0.22$
Mancha Numero 9	$\frac{1.4}{7.7} = 0.18$
Mancha Numero 10	$\frac{1.0}{7.7} = 0.13$
Mancha Numero 11	$\frac{0.75}{7.7} = 0.09$
Mancha Numero 12	$\frac{0.5}{7.7} = 0.06$

Cada compuesto aislado presentó los siguientes Rf:

NUMERO DE MANCHA ORDEN DESCENDENTE	RF CORRESPONDIENTE
Compuesto Numero 1	$\frac{6.4}{7.7} = 0.83$
Compuesto Numero 2	$\frac{5.75}{7.7} = 0.75$
Compuesto Numero 3	$\frac{1.2}{7.7} = 0.15$

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro.8-2. Fase estacionaria silica gel, fase móvil Tolueno/Ácido acético (170:30)

C.- Tolueno/Ácido acético (170:30)

NUMERO DE MANCHA ORDEN DESCENDENTE	RF CORRESPONDIENTE
Mancha Numero 1	$\frac{6.7}{7.7} = 0.87$
Mancha Numero 2	$\frac{6.1}{7.7} = 0.79$
Mancha Numero 3	$\frac{5.1}{7.7} = 0.66$
Mancha Numero 4	$\frac{4.2}{7.7} = 0.54$
Mancha Numero 5	$\frac{3.8}{7.7} = 0.49$
Mancha Numero 6	$\frac{2.8}{7.7} = 0.364$
Mancha Numero 7	$\frac{2.35}{7.7} = 0.30$
Mancha Numero 8	$\frac{1.75}{7.7} = 0.22$
Mancha Numero 9	$\frac{1.4}{7.7} = 0.18$
Mancha Numero 10	$\frac{1.0}{7.7} = 0.13$
Mancha Numero 11	$\frac{0.75}{7.7} = 0.09$
Mancha Numero 12	$\frac{0.5}{7.7} = 0.06$

Cada compuesto aislado presentó los siguientes Rf:

NUMERO DE MANCHA ORDEN DESCENDENTE	RF CORRESPONDIENTE
Compuesto Numero 1	$\frac{7.1}{8} = 0.87$
Compuesto Numero 2	$\frac{6.5}{8.2} = 0.79$
Compuesto Numero 3	$\frac{1}{8} = 0.125$

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro.9-2.Fase estacionaria silica gel, fase móvil Tolueno/Etil Acetato/Ácido fórmico (139:83:8)

➤ D.- Tolueno/Etil Acetato/Ácido fórmico (139:83:8)

NUMERO DE MANCHA ORDEN DESCENDENTE	RF CORRESPONDIENTE
Mancha Numero 1	$\frac{6.3}{7.7} = 0.818$
Mancha Numero 2	$\frac{5.6}{7.7} = 0.727$
Mancha Numero 3	$\frac{5.0}{7.7} = 0.64$
Mancha Numero 4	$\frac{4.3}{7.7} = 0.55$
Mancha Numero 5	$\frac{3.8}{7.7} = 0.49$
Mancha Numero 6	$\frac{3.6}{7.7} = 0.47$
Mancha Numero 7	$\frac{3.1}{7.7} = 0.40$
Mancha Numero 8	$\frac{2.9}{7.7} = 0.37$
Mancha Numero 9	$\frac{2.4}{7.7} = 0.31$
Mancha Numero 10	$\frac{2.2}{7.7} = 0.28$
Mancha Numero 11	$\frac{1.8}{7.7} = 0.23$
Mancha Numero 12	$\frac{0.9}{7.7} = 0.11$

➤ Cada compuesto aislado presentó los siguientes Rf:

NUMERO DE MANCHA ORDEN DESCENDENTE	RF CORRESPONDIENTE
Compuesto Numero 1	$\frac{6.3}{7.7} = 0.818$
Compuesto Numero 2	$\frac{5.6}{7.7} = 0.727$
Compuesto Numero 3	$\frac{2.2}{7.7} = 0.28$

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro.10-2. Rf del compuesto 1 a diferentes fases móviles

SOLVENTE	RF CORRESPONDIENTE
Solvente A	$\frac{6.5}{7.8} = 0.883$
Solvente B	$\frac{6.4}{7.7} = 0.83$
Solvente C	$\frac{7.1}{8} = 0.87$
Solvente G	$\frac{6.3}{7.7} = 0.818$

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro.11-2. Rf del compuesto 2 a diferentes fases móviles

SOLVENTE	RF CORRESPONDIENTE
Solvente A	$\frac{6.0}{7.8} = 0.769$
Solvente B	$\frac{5.75}{7.7} = 0.75$
Solvente C	$\frac{6.5}{8.2} = 0.79$
Solvente G	$\frac{5.6}{7.7} = 0.727$

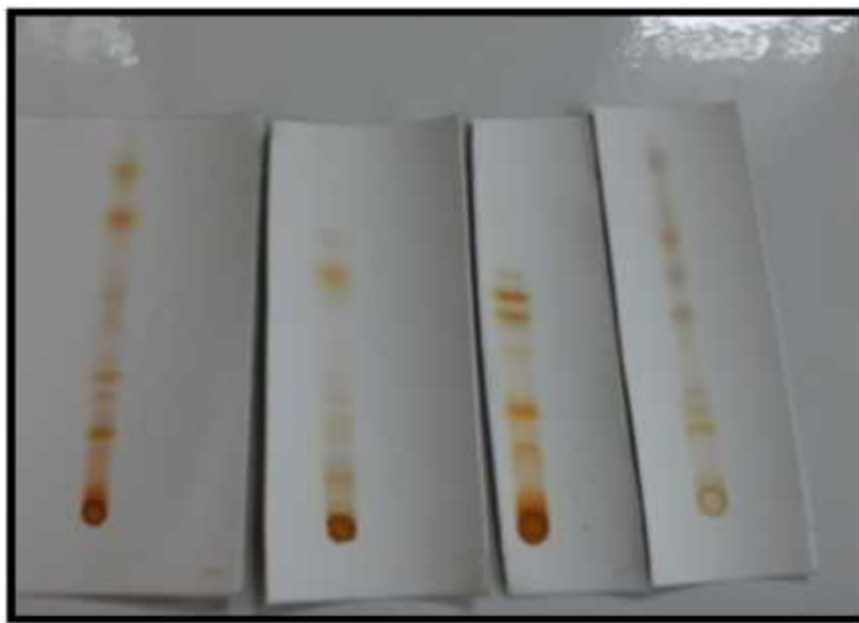
Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro. 12-2. Rf del compuesto 3 a diferentes fases móviles

SOLVENTE	RF CORRESPONDIENTE
Solvente A	$\frac{1.6}{7.8} = 0.20$
Solvente B	$\frac{1.2}{7.7} = 0.15$
Solvente C	$\frac{1}{8} = 0.125$
Solvente G	$\frac{2.2}{7.7} = 0.28$

Realizado por (Janeta, 2015)

Figura.23-2. Compuestos separados por placa preparativa en diferentes fases



Realizado por (Janeta, 2015)

En la figura se observa los compuestos separados por placa preparativa en diferentes fases de izquierda a derecha fase móvil G, A, B, C.

Para su identificación se utilizó como comparación la tercera edición de A. Jhon Elix un catálogo de datos sobre cromatografía estandarizada de relaciones biosintéticas de sustancias líquénicas, se comparó con cada una de las relaciones de Rf mostradas, como se puede observar en la figura 23..

(A catalogue of standardized Chromatographic Data and Biosynthetic relationships for Lichen substances., 2014)

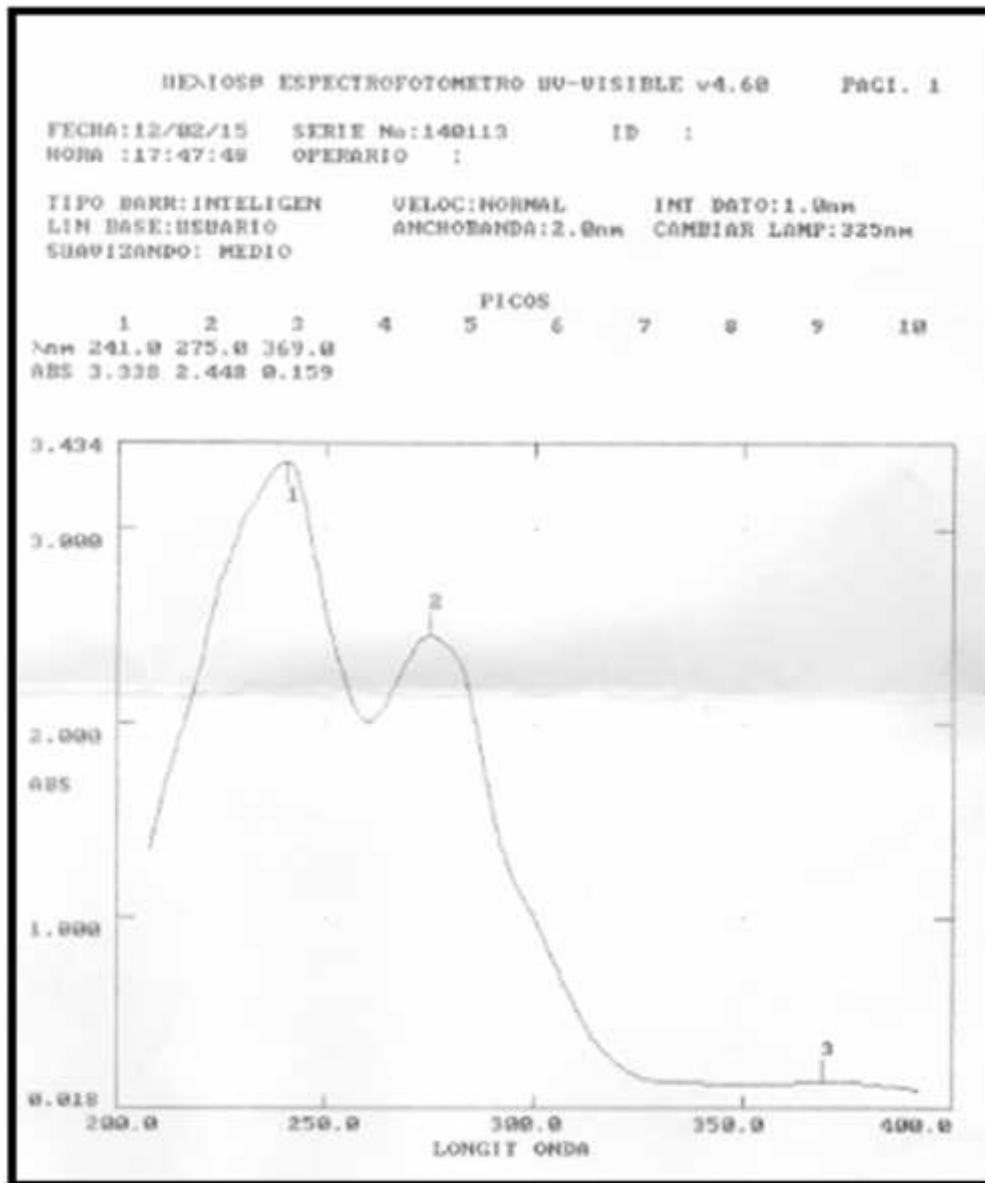
2.1.7. Espectroscopia UV

1.- Los extractos fueron llevados a sequedad y en un tubo previamente tarado se llevó a una concentración de 0.001 g/ml de solvente; para lectura del equipo se utilizó metanol como solvente reconstituyente.

2.-Los extractos fueron analizados uno a uno por espectroscopia UV mostrando los siguientes resultados en cada figura:

UV compuesto 1

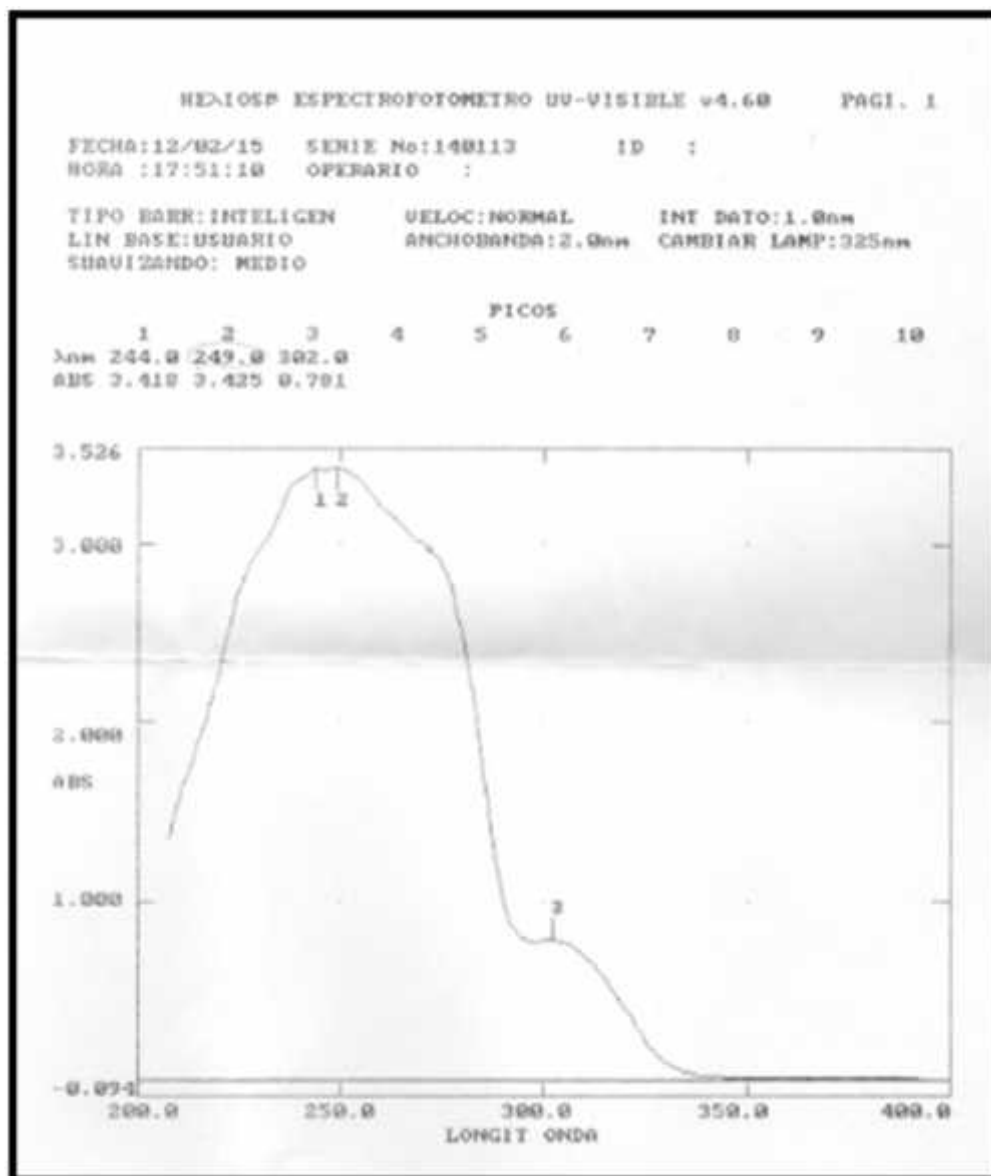
Figura.24-2. UV compuesto 1 Analizado de 200-400 nm en UV de barrido



Realizado por (Janeta, 2015)

UV compuesto 2

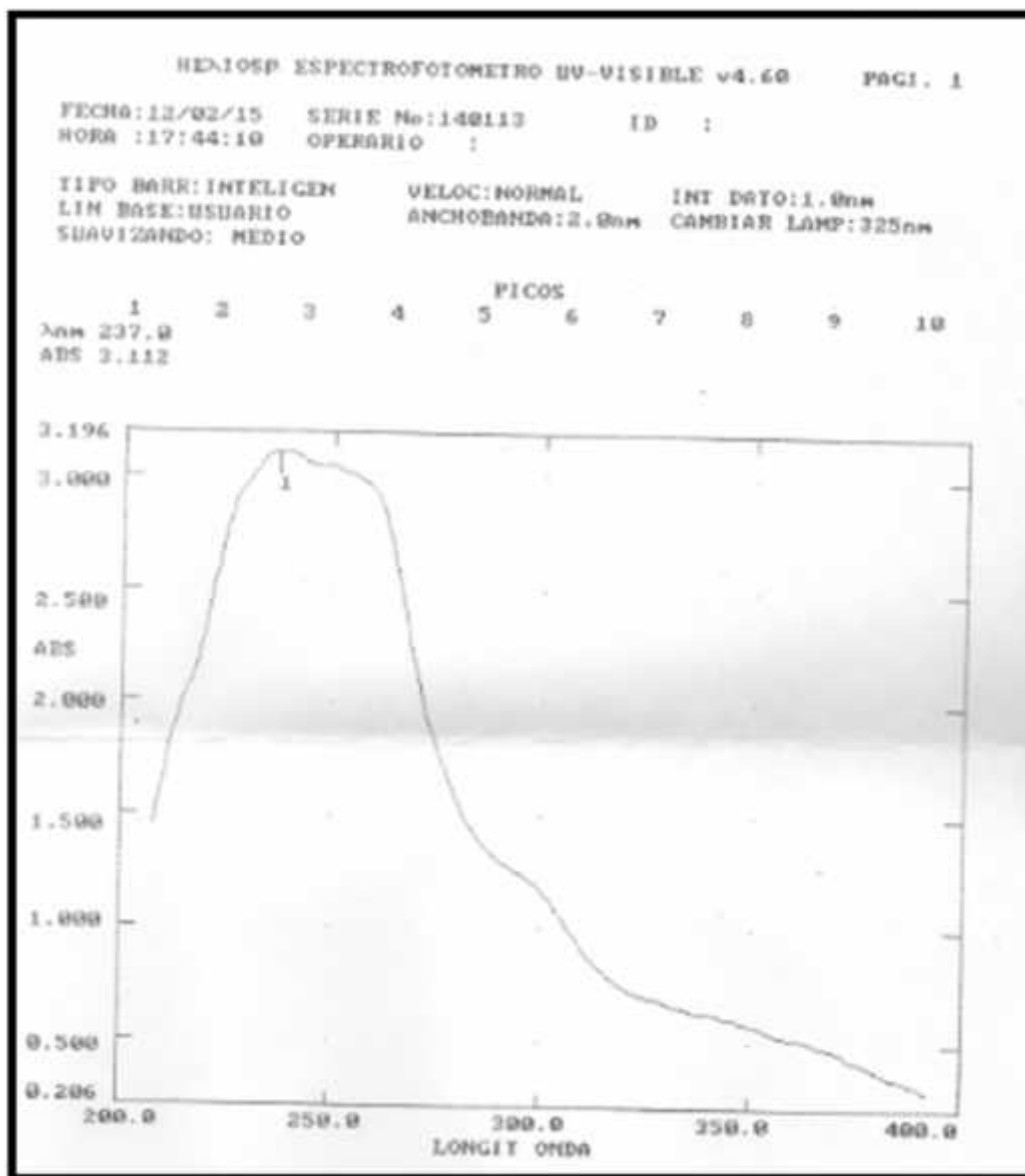
Figura.25-2. UV compuesto 1 Analizado de 200-400 nm en UV de barrido



Realizado por (Janeta, 2015)

UV compuesto 3

Figura.26-2 UV compuesto 1 Analizado de 200-400 nm en UV de barrido

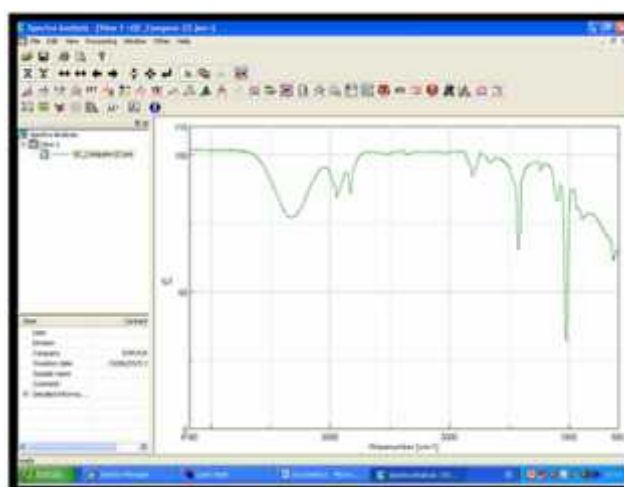
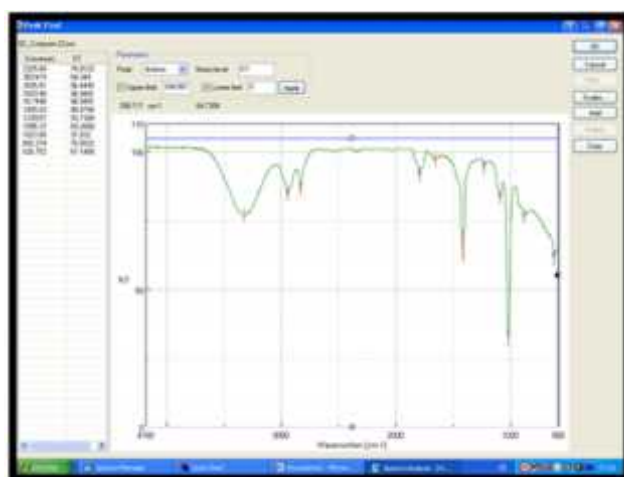
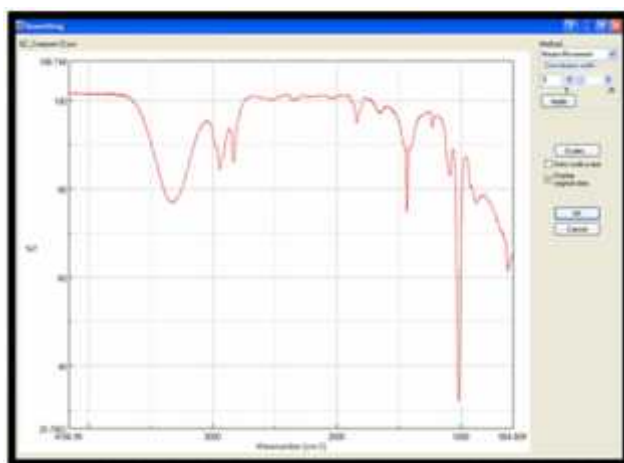


Realizado por (Janeta, 2015)

2.1.8. Espectroscopia IR

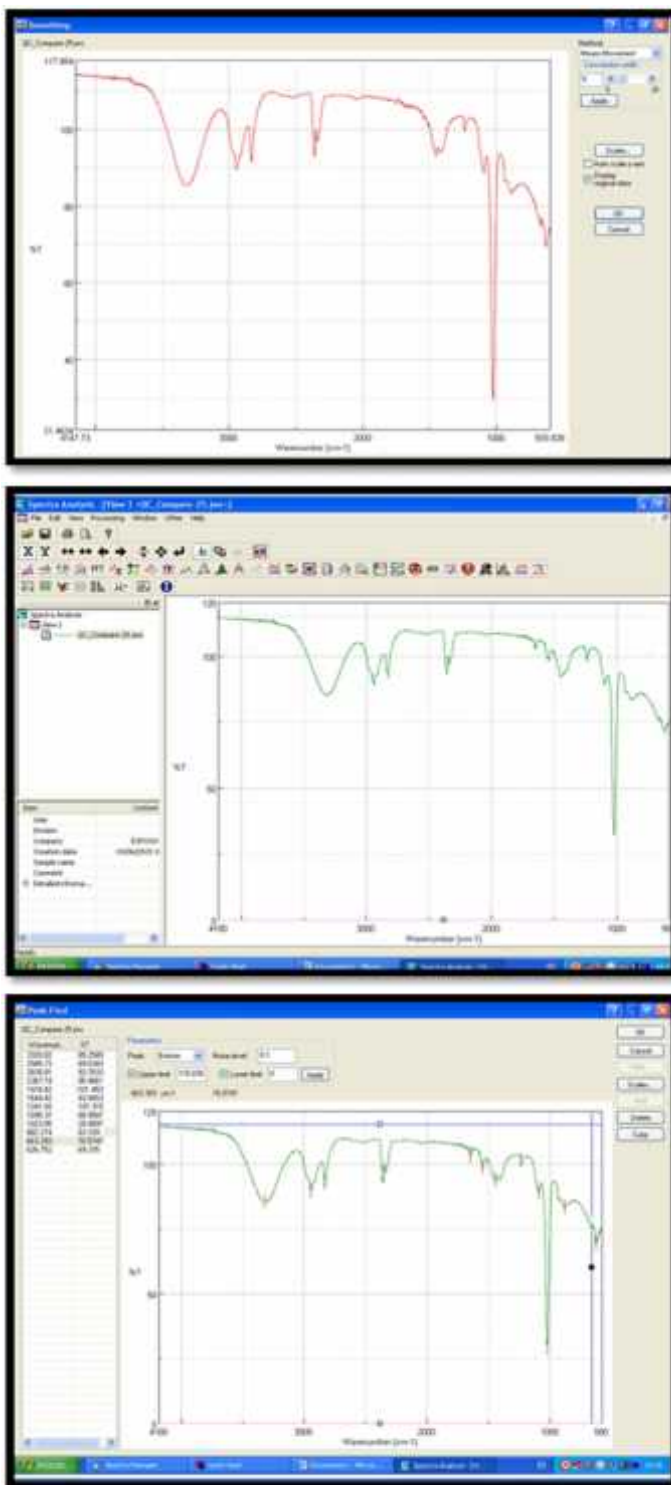
Los extractos fueron analizados uno a uno por espectroscopia Infrarroja manifestando los siguientes resultados como muestran las Fig. 27, 28, 29:

Figura. 27-2. IR compuesto 1



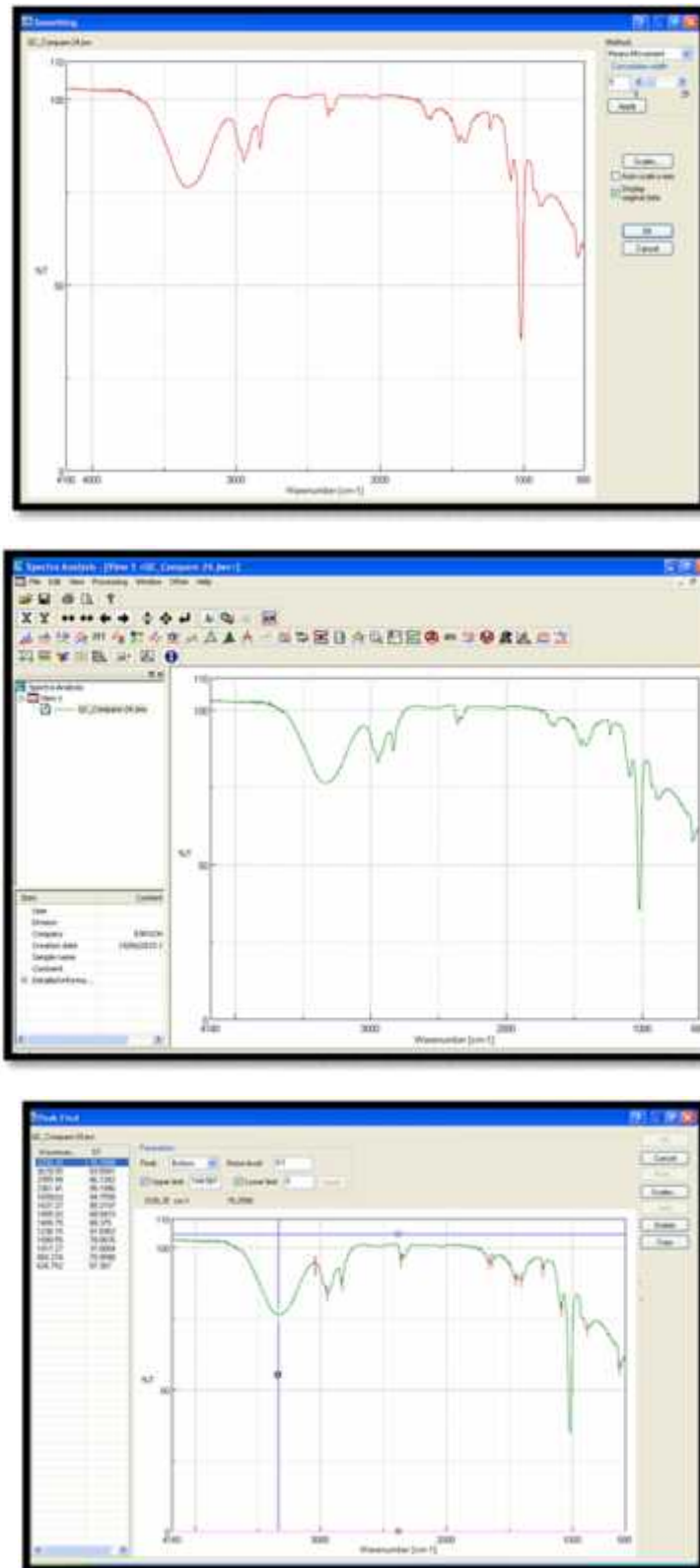
Realizado por (Janeta, 2015)

Figura. 28-2. IR compuesto 2



Realizado por (Janeta, 2015)

Figura.29-2. IR compuesto 3



Realizado por (Janeta, 2015)

Los resultados fueron comparados con, (NEW DEPSIDONES FROM LOBARIA OREGANA, 1980), (Vicente Marcano, 15/04/10) , (Molecular structural studies of lichen substances II:

atranorin gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin pulvinic dilactone and usnic acid, 2002). (Comparative metabolite profiling and chemical study of *Ramalina siliquosa*, 2013), para su posterior análisis y su conclusión

Después de tener nombrados e identificados los compuestos, se procedió a llevarlos a sequedad, concluyendo que solo se podría hacer el análisis de Atranorina y del Pulvinic dilactone ya que no se contaba con una cantidad sustancial del ácido ciprostético para realizar las pruebas *in vitro*.

2.1.9. Ensayos *in vitro*.

2.1.9.1 Protocolo para el aislamiento de neutrófilos humanos

Recolectar sangre venosa fresca de voluntarios sanos en un tubo con anticoagulante heparina; adicionar a esta MHS en relación 1:1 a la cantidad de sangre.

La sangre se adiciona suavemente al ficoll paque y con toda la precaución del caso en proporción 4/3 en relación al Ficoll paque se deja reposar para la sedimentación de los eritrocitos no deseados. Como se presenta en la Fig. 30

Figura. 30-2. Sangre + Ficoll



Realizado por (Janeta, 2015)

Después de 30 minutos en la centrifuga a 1500rpm, se toma la porción de neutrófilos como la que se observa en la imagen Fig. 31 y se coloca en otro tubo resuspendiendo estos con MHS en

proporción 1:3 y se centrifuga por igual período de tiempo a 1500 rpm. Después de descartar el sobrenadante, las células rojas son lisadas mediante una mezcla con solución hipotónica de cloruro de amonio (0.83%). Se centrifuga de nuevo y los neutrófilos son lavados con MHS pH 7.4 por una sola vez y resuspendidos a la concentración de 10^7 células/mL a 37°C para su posterior utilización. Fig 31.

Figura. 31-2. Tubo con plasma –neutrófilos-MHS- eritrocitos



Realizado por (Janeta, 2015)

Se requieren para esta actividad:

- ✓ Preparar la solución modificada de Hank's (9.5 g/L)
- ✓ Preparar la solución de cloruro de amonio (0.83%)
- ✓ Extraer sangre a voluntario sano (60 mL)
- ✓ Agua bidestilada
- ✓ Ficoll paque (listo para uso)
- ✓ Centrífuga
- ✓ Microscopio
- ✓ Cámara de Neubauer
- ✓ Puntas de pipeta (amarillas y azules)
- ✓ Pipetas automáticas graduables
- ✓ Vacoutainer
- ✓ Aguja vacoutanier
- ✓ Tubos de centrífuga
- ✓ 2 Matraces aforados de 1000 ml
- ✓ 2 vasos de 250 ml

- ✓ 10 jeringas de 10 ml
- ✓ Guantes de nitrilo

2.1.9.2 Ensayo de actividad citotóxica sobre neutrófilos aislados

Las células vivas (metabólicamente activas) reducen las sales de tetrazolio para formar compuestos coloreados tipo formazan. Entonces, los ensayos colorimétricos basados en sales de tetrazolio detectan las células viables exclusivamente. Estos ensayos sensibles pueden ser realizados en una placa de micropocillos (MTP) con un relativo pequeño número de células mediante la utilización del método modificado de Berridge et al. (1996). Durante este estudio, neutrófilos humanos aislados (10^7 células/ml) fueron incubados con los compuestos de prueba por 30 minutos entonces WST-1 (250 μ M) fue añadido e incubado en un baño de agua con agitación a 37 °C por 3 horas. La absorbancia fue medida a 450 nm. Triton X-100 (0.1%) fue usado como control negativo mostrando un 0.00% de viabilidad celular. La densidad óptica representa la media de cinco réplicas experimentales (Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction, 2005)

Protocolo:

Se prepara una solución madre del compuesto de prueba disolviendo 1 mg de aquel en 2 ml de solución modificada de Hank's enriquecida con cantidad suficiente de dimetilsulfóxido (hasta el 5%) para solubilizar el sólido. Luego se procede a realizar las diluciones pertinentes para obtener las concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 ppm, después de añadir el WST-1 se procede a incubar durante 3 horas antes de la medición de las absorbancias; En el cuadro siguiente se verifica de mejor forma el modus operandi y en la figura N°25 se muestra cada tratamiento.

Para obtener la suspensión de células a la concentración deseada, se debe realizar un conteo en el que se logren visualizar 90 células por cuadro exterior de un hemocitómetro (cámara de Neubauer).

Preparación de solución diluyente:

Dimetilsulfóxido 5%.- Se prepara mezclando 4.75 ml de MHS y 0.25 ml de DMSO.

Preparación de controles:

Triton X-100 0.1%.- Se prepara mezclando 9.965 ml de MHS y 0.025 ml de Tritón X-100.

Dimetilsulfóxido 5%.- Se prepara mezclando 0.95 ml de MHS y 0.05 ml de DMSO.

Preparación de las diluciones de los compuestos de prueba:

De la solución madre (S.M.) se toman 600 μ L y se mezclan con 600 μ L de solución diluyente, esta dilución toma el nombre de D1, 500 μ L de D1 se mezclan con 500 μ L de solución diluyente, esta dilución se denomina D2, 400 μ L de D2 se mezclan con 400 μ L de solución diluyente, esta

dilución se llama D3, 300 μL de D3 se mezclan con 300 μL de solución diluyente, esta última recibe el nombre de D4, como se muestra en la Fig.

Figura. 32-2. Micro pocillos actividad citotóxica antes de incubación



Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro.13-2. Preparación de las diluciones de los compuestos para ensayo citotóxico

TRATAMIENTOS	Compuesto de prueba/controles, μL	Suspensión de células, μL	WST-1, μL
Control DMSO 5%	100	140	10
Control TRITON X-100 0.1%	100	140	10
[Compuesto de prueba] ₁ , 200 ppm	100 (D1)	140	10
[Compuesto de prueba] ₂ , 100 ppm	100 (D3)	140	10
[Compuesto de prueba] ₃ , 50 ppm	100 (D2)	140	10
[Compuesto de prueba] ₄ , 25 ppm	100 (D1)	140	10
[Compuesto de prueba] ₅ , 12,5 ppm	100 (S.M.)	140	10

Realizado por (Janeta, 2015)

Después de la incubación se puede observar claramente el cambio de color como muestra la figura

Figura. 33-2. Micro pocillos actividad citotóxica después de incubación



Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro. 14-2. Absorbancias Atranorina en ensayo citotóxico

[Atranorina], µg/mL	ABSORBANCIA	Promedio A	Desviación. Estándar	A1	A2	A3	A4	A5
200	0,063	0,0628	0,00295	0,06	0,064	0,06	0,067	0,063
100	0,101	0,1014	0,00114	0,103	0,101	0,102	0,101	0,1
50	0,177	0,1772	0,001304	0,178	0,176	0,179	0,177	0,176
25	0,298	0,2978	0,001095	0,298	0,298	0,299	0,298	0,296
12,5	0,35	0,3498	0,001643	0,348	0,351	0,349	0,352	0,349
0	0,419	0,4192	0,001924	0,418	0,42	0,422	0,417	0,419

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro. 15-2. Absorbancias Pulvinic dilactone en ensayo citotóxico

[Pulvinic dilactone], µg/mL	Absorbancia	Promedio A	Desviación. Estándar	A1	A2	A3	A4	A5
200	0,079	0,0788	0,001483	0,077	0,079	0,081	0,078	0,079
100	0,098	0,0984	0,000894	0,097	0,099	0,099	0,098	0,099
50	0,15	0,1494	0,002702	0,149	0,145	0,151	0,15	0,152
25	0,227	0,227	0,003391	0,229	0,225	0,222	0,229	0,23
12,5	0,35	0,347	0,011811	0,344	0,356	0,343	0,331	0,361
0	0,386	0,3862	0,003834	0,391	0,387	0,388	0,384	0,381

Realizado por (Janeta, 2015)

3.1.9.3 Protocolo *del ensayo antiinflamatorio*

La actividad antiinflamatoria de los compuestos de prueba fue determinada mediante el ensayo modificado de Tan y Berridge (2000). Este ensayo *in vitro* está basado en la reducción de la sal de tetrazolio altamente soluble en agua WST-1 en presencia de neutrófilos activados.

La actividad antiinflamatoria fue determinada en un volumen total de 250 µl el cual contenía 140 µl de MHS (pH 7.4) conteniendo 10⁴ neutrófilos/µl, 10 µl WST-1 y 100 µl de varias concentraciones de los compuestos de prueba (12.5, 25, 50, 100, 200 µg/ml).

El control positivo contiene buffer MHS con DMSO al 5%, neutrófilos y WST-1

El control comparativo contiene aspirina a 200 µg/ml, neutrófilos y WST-1

El control negativo contiene buffer MHS con Tritón al 0,1%, neutrófilos y WST-1

Preparación de solución diluyente:

Dimetilsulfóxido 5%.- Se prepara mezclando 4.75 ml de MHS y 0.25 ml de DMSO.

Preparación de controles:

Triton X-100 0.1%.- Se prepara mezclando 9.965 ml de MHS y 0.025 ml de Tritón X-100.

Dimetilsulfóxido 5%.- Se prepara mezclando 0.95 ml de MHS y 0.05 ml de DMSO.

Preparación de las diluciones de los compuestos de prueba:

De la solución madre (S.M.) se toman 600 µl y se mezclan con 600 µl de solución diluyente, esta dilución toma el nombre de D1, 500 µl de D1 se mezclan con 500 µl de solución diluyente, esta dilución se denomina D2, 400 µl de D2 se mezclan con 400 µl de solución diluyente, esta dilución se llama D3, 300 µl de D3 se mezclan con 300 µl de solución diluyente, esta última recibe el nombre de D4.

Cuadro. 16-2. Preparación de las diluciones de los compuestos para ensayo antiinflamatorio

TRATAMIENTOS	Compuesto de prueba/controles, µl	Suspensión de células, µl	WST-1, µl
Control DMSO 5%	100	140	10
Control TRITON X-100 0.1%	100	140	10
Control Aspirina 200 ppm	100	140	10
[Compuesto de prueba] ₁ , 12.5 ppm	100 (D1)	140	10
[Compuesto de prueba] ₂ , 25 ppm	100 (D3)	140	10
[Compuesto de prueba] ₃ , 50 ppm	100 (D2)	140	10
[Compuesto de prueba] ₄ , 100 ppm	100 (D1)	140	10
[Compuesto de prueba] ₅ , 200 ppm	100 (S.M.)	140	10

Realizado por (Janeta, 2015)

Todos los compuestos fueron equilibrados a 37 °C como se observa en la figura 27; y la reacción fue iniciada al añadir Zymosan A (el cual fue opsonizado al añadirle suero de sangre venosa en una proporción 3.8mg por cada 1.5 mL de suero después centrifugado a 3000rpm durante 5min y finalmente resuspendido en MHS.), se añadió a cada pocillo 50 uLde Zymosan A opsonizado, como muestra la Fig. 31.

Figura. 34-2. Micro pocillos actividad antiinflamatoria antes de incubación



Realizado por (Janeta, 2015)

Después de la adición del Zymosan A opsonizado se incubo durante una hora a 37°C como se observa en la Fig. 28 y se midió la absorbancia a 450 nm presentando los siguientes resultados mostrados en la Fig. 32.

Figura. 35-2. Micro pocillos actividad antiinflamatoria después de incubación



Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro. 17-2. Absorbancias Atranorina y Pulvinic dilactone en ensayo antiinflamatorio

Atranorina			promedio A	Desviación. Estándar	A1	A2	A3	A4	A5
BLANCO DMSO	0,322		0,3224	0,00517687	0,323	0,331	0,321	0,319	0,318
BLANCO TRITON	0		0	0	0	0	0	0	0
CONTROL ASPIRINA	0,052		0,0522	0,00109545	0,052	0,052	0,054	0,052	0,051
200 ppm	0,078		0,0776	0,00181659	0,079	0,076	0,08	0,077	0,076
100 ppm	0,117		0,1168	0,00164317	0,116	0,118	0,119	0,116	0,115
50 ppm	0,174		0,1736	0,00270185	0,172	0,177	0,175	0,174	0,17
25 ppm	0,235		0,2346	0,00260768	0,233	0,237	0,237	0,231	0,235

Realizado por (Janeta, 2015)

PULVINIC DILACTONE			Promedio A	Desviación. Estándar	A1	A2	A3	A4	A5
BLANCO DMSO	0,329		0,3294	0,003209361	0,333	0,332	0,325	0,328	0,329
BLANCO TRITON	0		0	0	0	0	0	0	0
CONTROL ASPIRINA	0,054		0,0536	0,00167332	0,055	0,051	0,053	0,054	0,055
200ppm	0,087		0,0868	0,001923538	0,088	0,089	0,086	0,084	0,087
100 ppm	0,149		0,1486	0,003361547	0,146	0,151	0,148	0,145	0,153
50 ppm	0,206		0,2058	0,002280351	0,203	0,209	0,205	0,207	0,205
25 ppm	0,257		0,2574	0,002302173	0,261	0,258	0,255	0,256	0,257

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

3.1.1 Tamizaje fitoquímico

- Ensayo de Liebermann-Buchard determinó la presencia de Triterpenos y esteroides (++) lo que nos indica que son estructuras muy grandes de aproximadamente 30 carbonos, unidas por partes de isopreno, así concluyendo que estas estructuras son muy parecidas a las estructuras liquénicas, nos encontrábamos muy bien encaminados a la determinación de estas. (Nevaera, 2015).
- Ensayo de Cloruro Férrico determinó la presencia de compuestos fenólicos (+++), los compuestos fenólicos son los más representativos de entre las estructuras liquénicas, su alta presencia demuestra una gran concentración de metabolitos secundarios presentes. (Antioxidant activity of Venezuelan lichens, 2014)

3.1.2 Identificación de compuestos por Cromatografía

La mejor separación de compuestos por cromatografía TLC en silica gel se dió por la siguiente fase móvil de solventes (Tolueno/Etil Acetato/Ácido fórmico (139:83:8) la cual se fundamentó de la tercera edición de A. Jhon Elix un catálogo de datos sobre cromatografía estandarizada de relaciones biosintéticas de sustancias liquénicas, como se muestra en la Fig. 37. (A catalogue of standardized Chromatographic Data and Biosynthetic relationships for Lichen substances., 2014)

Figura. 1-4 (TLC)



Realizado por (Janeta, 2015)

La identificación de cada uno de los compuestos se dio a partir de los sistemas de solventes presentados en este, mostrando los siguientes resultados de Rf y a continuación su comparación bibliográfica con estos.

Cuadro. 1-3. Compuesto 1 Rf

SOLVENTE	RF CORRESPONDIENTE
Solvente A	$\frac{6.5}{7.8} = 0.883$
Solvente B	$\frac{6.4}{7.7} = 0.83$
Solvente C	$\frac{7.1}{8} = 0.87$
Solvente G	$\frac{6.3}{7.7} = 0.818$

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro. 2-3. Compuesto 2 Rf

SOLVENTE	RF CORRESPONDIENTE
Solvente A	$\frac{6.0}{7.8} = 0.769$
Solvente B	$\frac{5.75}{7.7} = 0.75$
Solvente C	$\frac{6.5}{8.2} = 0.79$
Solvente G	$\frac{5.6}{7.7} = 0.727$

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro. 3-3. Compuesto 3 Rf

SOLVENTE	RF CORRESPONDIENTE
Solvente A	$\frac{1.6}{7.8} = 0.20$
Solvente B	$\frac{1.2}{7.7} = 0.15$
Solvente C	$\frac{1}{8} = 0.125$
Solvente G	$\frac{2.2}{7.7} = 0.28$

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro. 4. 3 comparaciones de Rf

Pulvinic dilactone [Pulvinic acid lactone]						
A: 80	B: 82	B': 82	C: 90	E: 81	F: x	G: x
HPLC: 43						
V: +			UV: +			
Acid Spray: Yellow			LW UV: Yellow			
Archers: x						
K: No Result		C: No Result		KC: No Result		PD: No Result
Mass Spectrum: 290, 261, 234, 178						
Substance Class: Pulvinic acid derivatives						

Fuente: (A catalogue of standardized Chromatographic Data and Biosynthetic relationships for Lichen substances., 2014)

Atranorin						
A: 76	B: 78	B': 73	C: 79	E: 57	F: 85	G: x
HPLC: 38						
V: -			UV: +			
Acid Spray: Orange			LW UV: Orange			
Archers: Orange						
K: P.Yellow		C: No Result		KC: No Result		PD: P.Yellow
Mass spectrum: 374, 196, 179, 178						
Substance Class: β -Orcinol Depsides						

Fuente: (A catalogue of standardized Chromatographic Data and Biosynthetic relationships for Lichen substances., 2014)

Cryptostictic acid						
A: 14	B: 14	B': 10	C: 10	E: x	F: x	G: 27
HPLC: 4						
V: -			UV: +			
Acid Spray: Orange			LW UV: Orange			
Archers: x						
K: No Result		C: No Result		KC: No Result		PD: No Result
Mass spectrum: 388, 370, 177						
Substance Class: β -Orcinol Depsidones						

Fuente: (A catalogue of standardized Chromatographic Data and Biosynthetic relationships for Lichen substances., 2014)

3.1.3 Identificación de compuestos por pruebas químicas.

Con fines de identificación se realizó pruebas químicas; para asegurarnos de que cada compuesto sea el identificado por bibliografía.

Las pruebas de coloración con reactivos específicos se han venido utilizando habitualmente en líquenes desde aproximadamente desde hace 50 años y se puede realizar por la adición directa (con micro pipeta o pincel fino) de unas cuantas gotas de estos. (EVA Barreno, 2003)

Prueba de K

(Solución 10% de hidróxido de potasio en agua)

compuesto	Resultado
Compuesto 1	No reactivo
Compuesto 2	No reactivo
Compuesto 3	No reactivo

Realizado por (Janeta, 2015)

Prueba de C

(Lejía comercial sin diluir)

compuesto	Resultado
Compuesto 1	No reactivo
Compuesto 2	No reactivo
Compuesto 3	No reactivo

Realizado por (Janeta, 2015)

Prueba del KC o cK

En este caso se aplica primero un reactivo y a continuación el otro

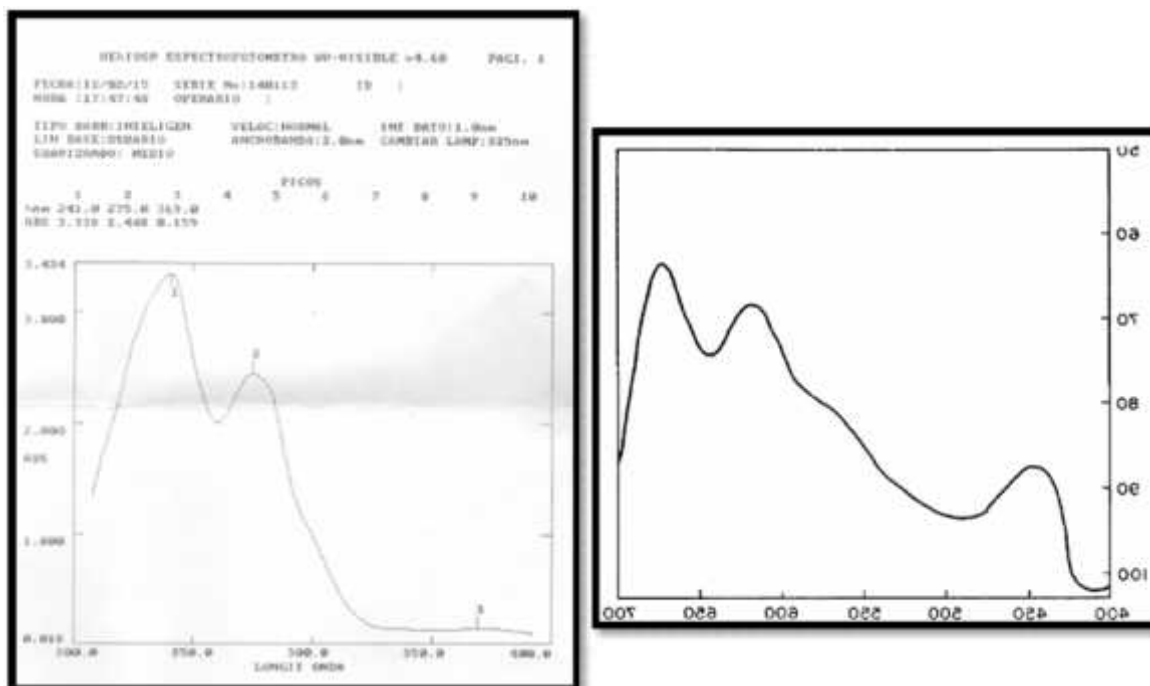
Compuesto	Resultado
Compuesto 1	No reactivo
Compuesto 2	No reactivo
Compuesto 3	No reactivo

Realizado por (Janeta, 2015)

3.1.4 Identificación de compuestos por espectroscopia UV

3.1.4.1 Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia UV.

Figura. 2-3. Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia UV.

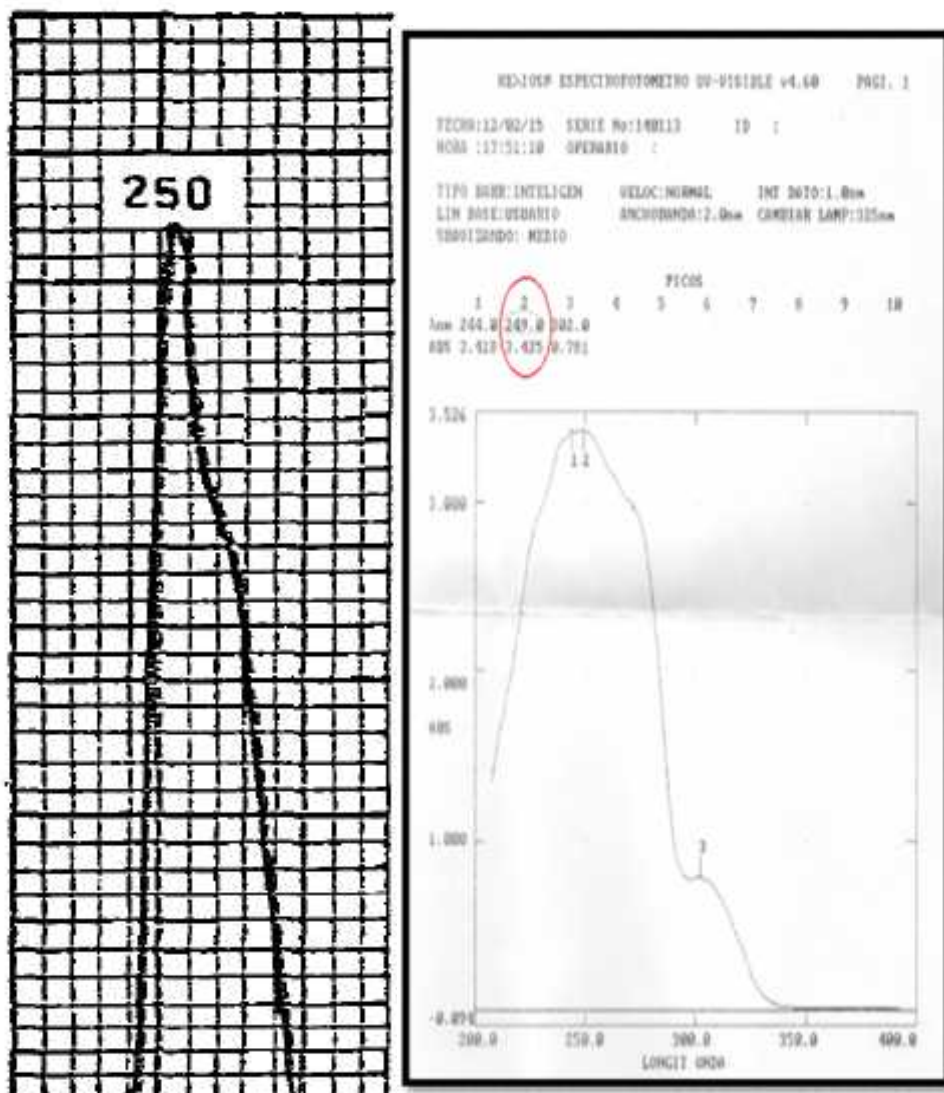


Realizado por (Janeta, 2015)y (Jayasankar, 2008)

Al no existir registros de espectroscopia UV de Pulvinic dilactone se lo compara con un control de parecida estructura química perteneciente igualmente a compuestos liquénicos y también con un Rf similar como es el Ácido úsnico como se muestra en la Fig. 32.

3.1.4.2 Identificación de Atranorina por espectroscopia UV.

Figura. 3-3. Identificación de Atranorina por espectroscopia UV.



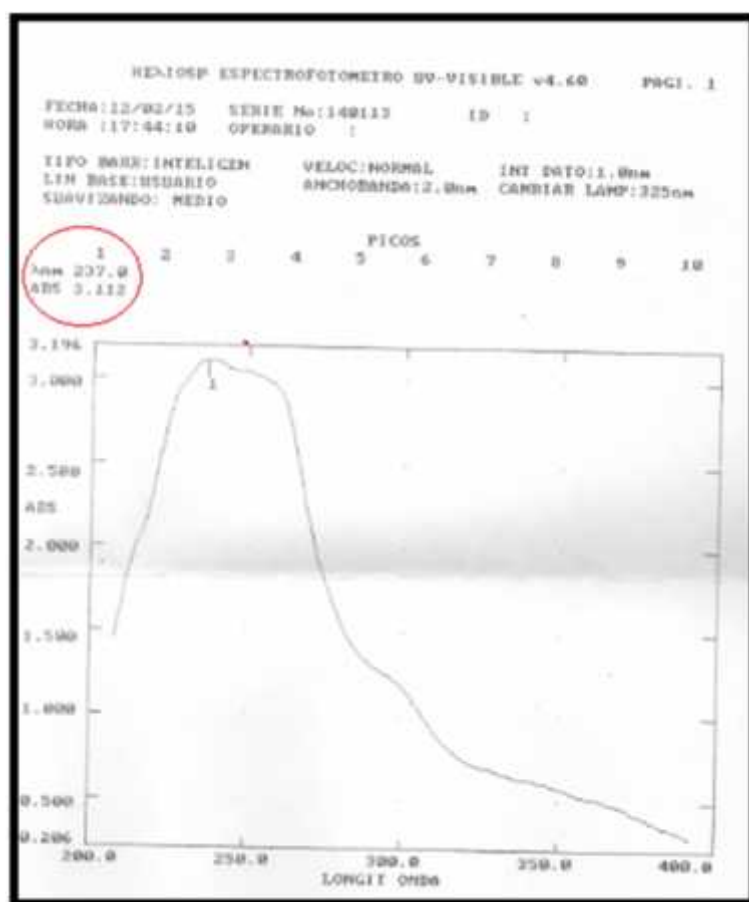
Realizado por (Janeta, 201) y (Quantitative analysis of atranorin by TLC, 1976)

El pico de 249 nm de la Atranorina perteneciente a bibliografía es igual al pico presentado en espectroscopia UV de barrido con un valor de 250 nm,.

3.1.4.3 Identificación de Ácido cryptostictico por espectroscopia UV.

Figura. 4.3 Identificación de Ácido cryptostictico por espectroscopia UV.

No	R _T	UV λ _{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Productos (m/z at 25 eV (REL))	Identification	Samples (Table 1)							
						Cu	Ar	St	Cr	Sr	Ca	26	Dt
a	4.74	—	345	18 (8.7), 260(9), 281(100), 301(17), 326(6), 329(25), 345(3)	Unknown compound	—	—	—	—	—	—	tr.	—
b	5.21	—	389	153(0.9), 200(1.2), 243(0.7), 300(7), 327(4), 345(7), 37 (100)	Unknown compound	—	—	—	tr.	—	—	—	—
c	7.05	—	758	—	Unknown compound	—	—	—	—	tr.	—	—	—
d	7.45	—	447	34 (19), 355(2), 387(100), 401(3), 427(37)	Unknown compound	—	—	—	—	tr.	—	—	—
e	8.33	235, 265, 300, 341	181	113(2), 137(100), 138(5), 151(99), 168(5), 180(1), 181(2), 183(2)	β-Oriental carboxylic acid ^b	—	tr.	—	—	—	—	tr.	tr.
f	8.79	—	245	—	Unknown compound	—	—	—	—	—	—	tr.	—
g	9.19	—	373	—	Unknown compound	—	—	tr.	—	—	—	—	—
h	9.69	235, 262, 284, 307, 324, 340	259	211(2.3), 252(4.2), 271(0.6), 276(3.2), 315(6.8), 341(19), 358(41), 359(100)	Conly poproterraric acid ¹¹	—	tr.	—	—	—	—	tr.	—
i	9.91	240, 267, 311	307	177(4), 247(6), 260(7), 295(5), 317(17), 325(17), 347(100), 365(4)	Galonic acid ⁴	—	—	—	tr.	tr.	—	—	tr.
j	10.39	283, 283, 285, 307	401	175(0.1), 227(0.9), 265(8), 285(7), 313(29), 358(93), 357(100), 263(0.5), 283(0.9), 401(0.3)	Penicilic acid ⁶	tr.	+	—	—	—	—	—	—
k	11.01	236, 262,	307	145(1), 227(9), 243(7), 269(1.8), 295(8), 325(11), 342(100), 369(1)	Cryptostictic acid ¹²	+	+	—	—	—	—	—	—



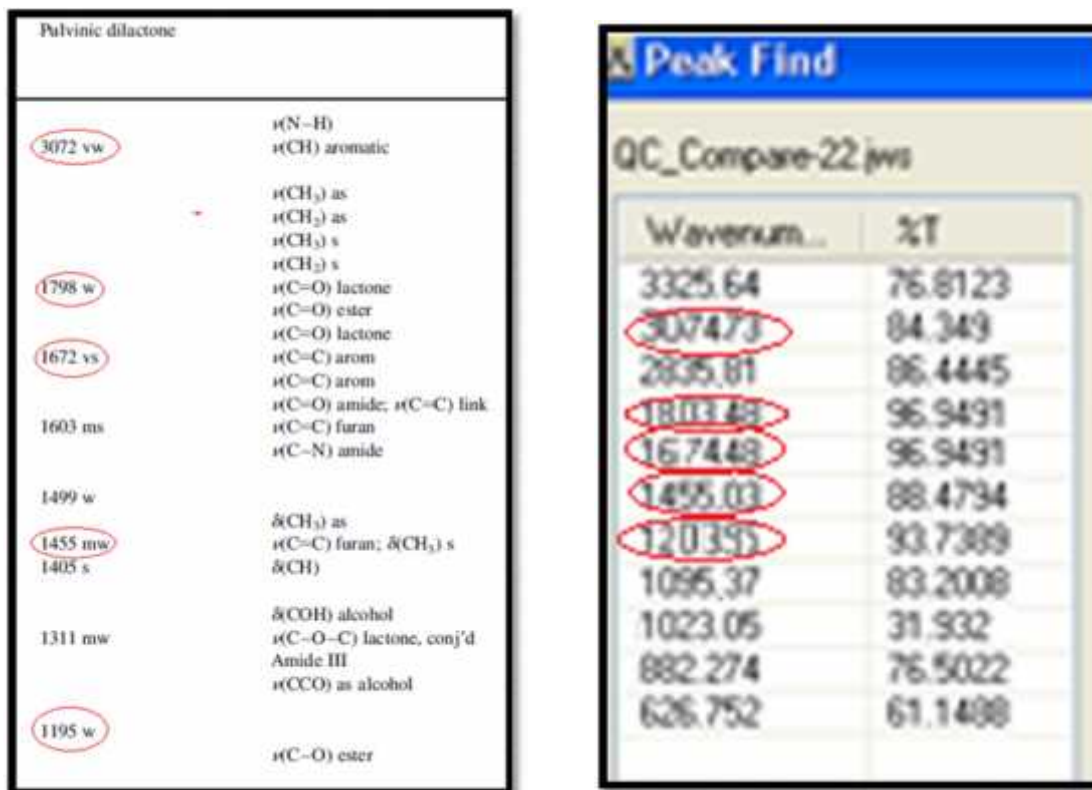
Realizado por (Janeta, 201) y (Comparative metabolite profiling and chemical study of Ramalina siliquosa complex using LC-ESI-MS/MS approach, 2013)

Se observó la relación existente entre el pico UV con un valor de 236 nm en bibliografía y el pico presentado a UV barrido de nuestro compuesto a 237 nm.

3.1.5 Identificación de compuestos por espectroscopia IR.

3.1.5.1 Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia IR.

Figura. 5-3. Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia IR.



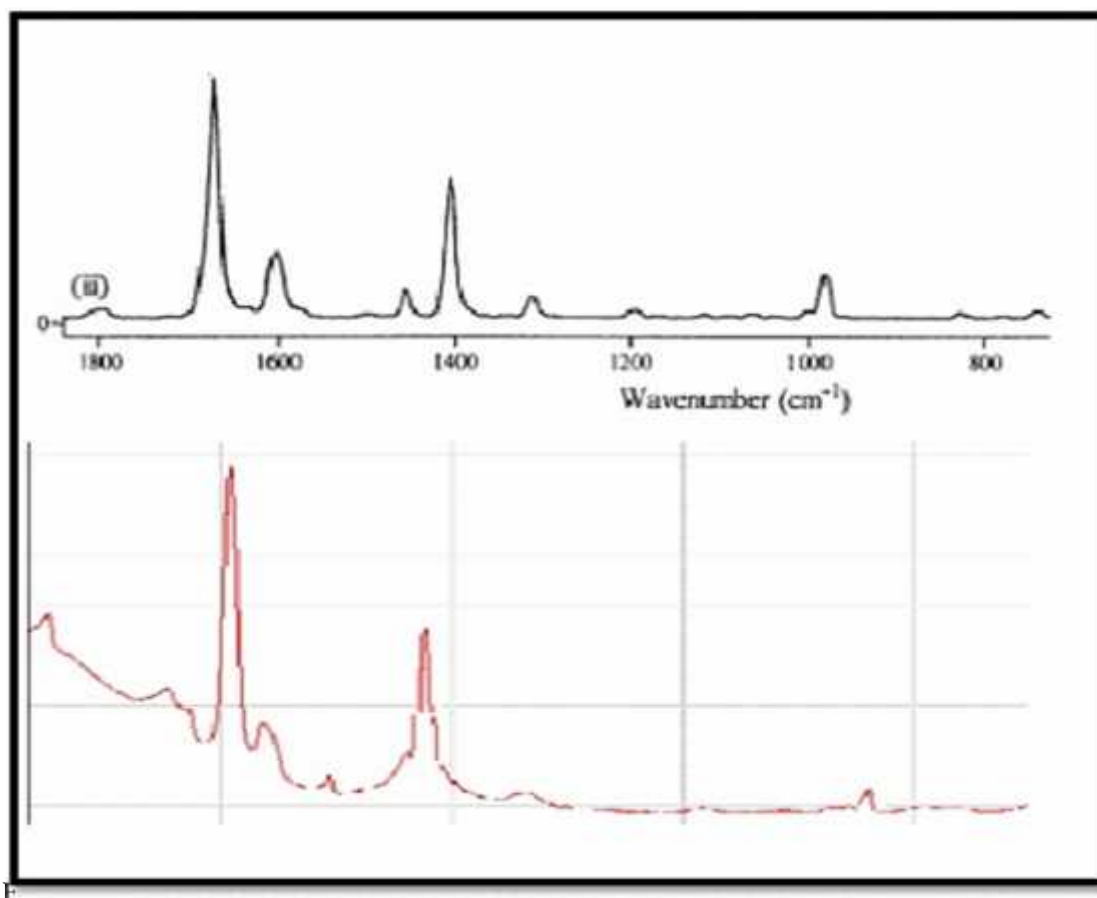
Fuente : (Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin pulvinic dilactone and usnic acid, 2002)

Los picos de nuestro compuesto en coincidencia con bibliografía y que se muestran en la Fig. 41 son los siguientes:

Picos bibliografía	Picos IR nuestro compuesto	Diferencia
3072	3074	2
1798	1803	5
1672	1674	2
1455	1455	0
1195	1203	8

Realizado por (Janeta, 2015)

Comparación espectro IR de bibliografía de color negro vs el espectro IR del compuesto Pulvinic dilactone aislado a partir de *Parmelina tiliacea*.



Fuente: (Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin pulvinic dilactone and usnic acid, 2002)

- Se concluye por la identificación cromatográfica, química, por espectroscopia IR y UV que nuestro primer compuesto es Pulvinic dilactone.

3.1.5.2 Identificación de Atranorina por espectroscopia IR.

Figura. 6-3. Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia IR

Atranorin	
Raman	Infrared
3040 vw	3040 vw
2986 w	2984 mw
2932 mw, sh	2932 m
2876 w	2873 w
1666 ms	1667 s
1658 ms	1653 s
1620 mw, sh	1620 m,
1588 mw	1584 m
1437 mw	1440 m
1411 w	1406 m, br
1380 mw	1380 w
1303 vs	1303 m, sh
1294 vs	1287 s
1266 ms, sh	1270 s

QC_Compare-25.jvs	
Wavenum...	%T
3320.82	85.2589
2945.73	89.5343
2835.81	92.7833
2367.19	95.9661
1614.42	101.453
1544.42	93.8453
1241.93	101.315
1095.37	88.9587
1023.05	28.9897
882.274	83.339
663.393	76.5747
626.752	69.335

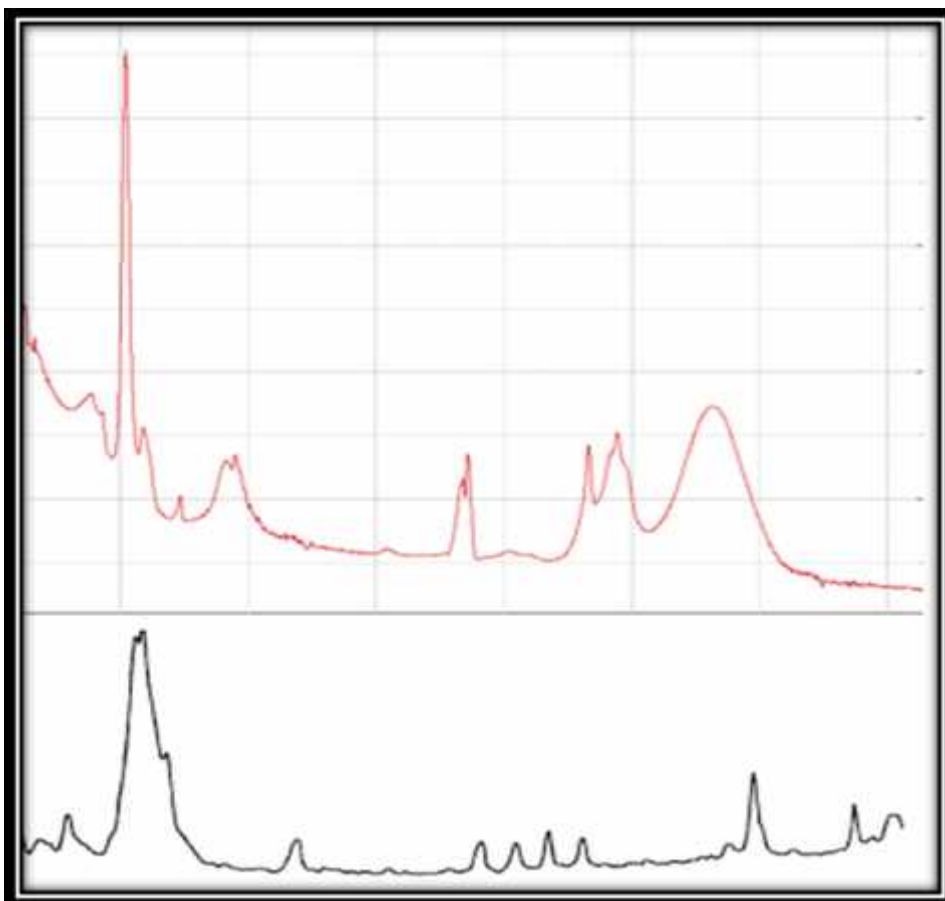
Realizado por (Janeta, 2015) y (*Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin pulvinic dilactone and usnic acid*, 2002)

Los picos de nuestro compuesto en coincidencia con bibliografía mostrada

Picos bibliografía	Picos IR nuestro compuesto	Diferencia
2984	2945	39
2873	2835	38
1667	1614	53
1584	1544	40
1287	1242	45

Realizado por (Janeta, 2015)

Si la diferencia entre picos se mantiene estable; el compuesto analizado al bibliográfico es aceptado ya que se considera como una vibración del equipo.



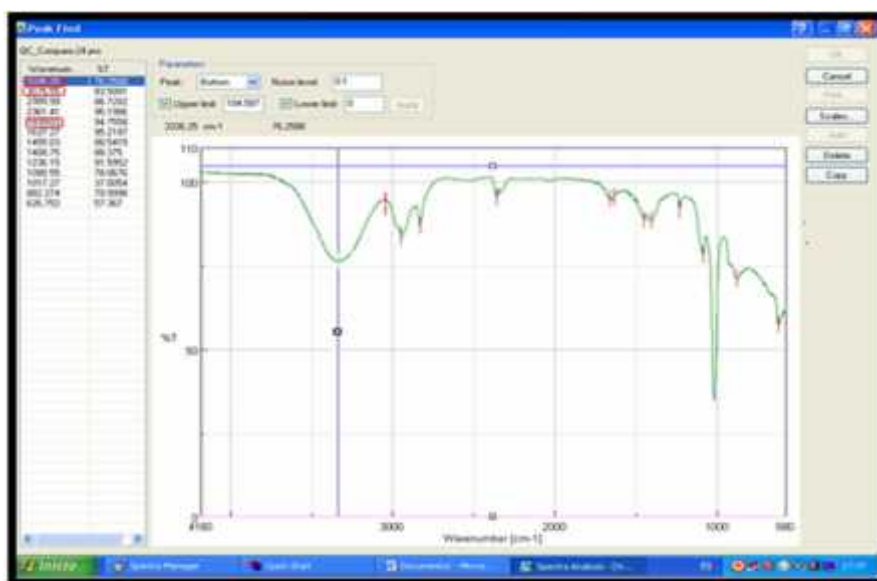
Fuente: (Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin pulvinic dilactone and usnic acid, 2002)

Comparación espectro IR de bibliografía de color negro vs el espectro IR del compuesto Pulvinic dilactone aislado a partir de *Parmelina tiliacea*.

- Se concluye por la identificación cromatográfica, química, por espectroscopia IR y UV que nuestro segundo compuesto es la Atranorina

3.1.5.3 Identificación de Ácido cryptostictico por espectroscopia Ir.

Figura. 7-3 Identificación de Pulvinic dilactone por espectroscopia IR



Cryptostictic acid (5). $C_{19}H_{16}O_9$; IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3370, 3110, 1736; 1H NMR (in $DMSO-d_6$) δ ppm: 2.17 (3H, s, Me at C-3'), 2.42 (3H, s, Me at C-6), 3.84 (3H, s, OMe), 4.60 (1 H, d, $J = 10$ Hz, $-CH_2-OH$), 4.72 (1 H, d, $J = 10$ Hz $-CH_2-OH$), 6.92 (2 H, arom-H and $O-C(H)-OMe$), 8.20 (1 H, s, OH), 10.05 (1 H, s, OH); 1H NMR ($Py-d_5$) δ ppm: 2.34 (3 H, s, Me at C-3'), 2.5 (3 H, s, Me at C-6), 3.7 (3 H, s, MeO), 5.39 (2 H, $-CH_2OH$), 6.79 (1 H, s, arom-H), 8.03 (1 H); MS: m/z 388 (M^+), 370 ($M^+ - H_2O$ (100)), 177. Anal. Calc. for $C_{19}H_{16}O_9$: C, 58.76; H, 4.15 Found: C, 58.58; H, 4.10%; $FeCl_3$, bluish-purple.

Fuente: (NEW DEPSIDONES FROM LOBARIA OREGANA, 1980)

Los picos de nuestro compuesto en coincidencia con bibliografía son los siguientes:

Picos bibliografía	Picos IR nuestro compuesto	Diferencia
3370	3336	34
3110	3075	35
1736	1699	37

Realizado por (Janeta, 2015)

Si la diferencia entre picos se mantiene estable; el compuesto analizado al bibliográfico es aceptado ya que se considera como una vibración del equipo

- Se concluye por la identificación cromatográfica, química, por espectroscopia IR y UV que nuestro tercer compuesto es el Ácido cryptostictico

3.2. Pruebas in vitro

3.2.1 Ensayo Citotóxico

3.2.1.1 Pulvinic dilactone

Cuadro. 5-3. Absorbancias del ensayo citotóxico de Pulvinic dilactone

[Pulvinic dilactone], µg/mL	Absorbancia	Prom A	D. EST	A1	A2	A3	A4	A5
200	0,079	0,0788	0,001483	0,077	0,079	0,081	0,078	0,079
100	0,098	0,0984	0,000894	0,097	0,099	0,099	0,098	0,099
50	0,15	0,1494	0,002702	0,149	0,145	0,151	0,15	0,152
25	0,227	0,227	0,003391	0,229	0,225	0,222	0,229	0,23
12,5	0,35	0,347	0,011811	0,344	0,356	0,343	0,331	0,361
0	0,386	0,3862	0,003834	0,391	0,387	0,388	0,384	0,381

[Pulvinic dilactone], µg/mL	Viabilidad celular, %	Prom Vc	D. EST	Vc1	Vc2	Vc3	Vc4	Vc5
200	20,47	20,47	0,46	19,69	20,41	20,88	20,31	20,73
100	25,39	25,39	0,42	24,81	25,58	25,52	25,52	25,98
50	38,86	38,86	0,93	38,11	37,47	38,92	39,06	39,90
25	58,81	58,81	1,24	58,57	58,14	57,22	59,64	60,37
12,5	90,67	90,67	3,45	87,98	91,99	88,40	86,20	94,75

Realizado por (Janeta, 2015)

% Viabilidad celular = % de neutrófilos viables (vivos)

$$\%Vc = \left(\frac{\text{Absorbancia de cada compuesto a diferentes concentraciones}}{\text{Absorbancia del blanco DMSO (valor máximo de viabilidad celular)}} \right) * 100$$

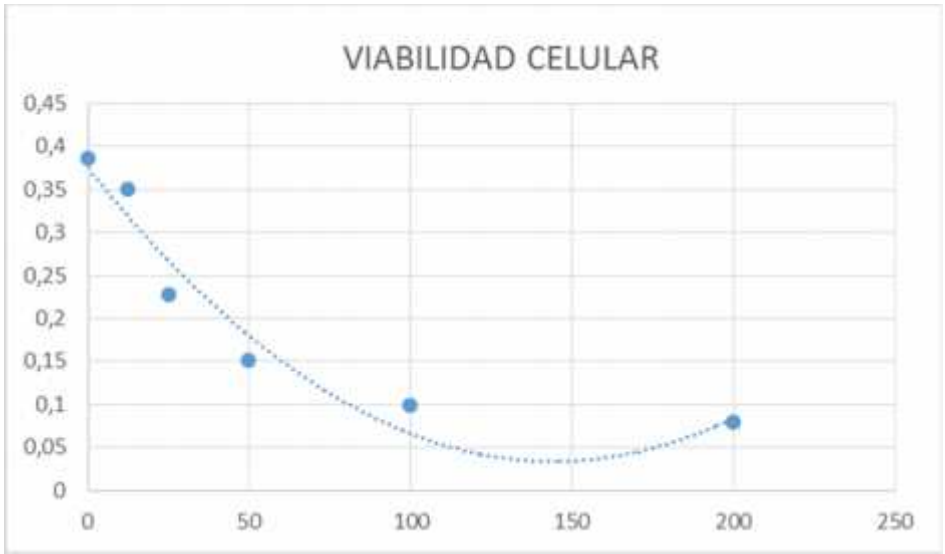
% Promedio Vc = Es la relación entre la suma de los porcentajes y el número de mediciones

D.E. = Desviación estándar.

Pulvinic dilactone	Absorbancias
200ppm	0,079
100 ppm	0,098
50 ppm	0,15
25 ppm	0,227
12,5ppm	0,355
0ppm	0,386

Realizado por (Janeta, 2015)

Figura. 8-3. Porcentaje de viabilidad celular de Pulvinic dilactone



Realizado por (Janeta, 2015)

% Viabilidad celular = % de neutrófilos viables (vivos)

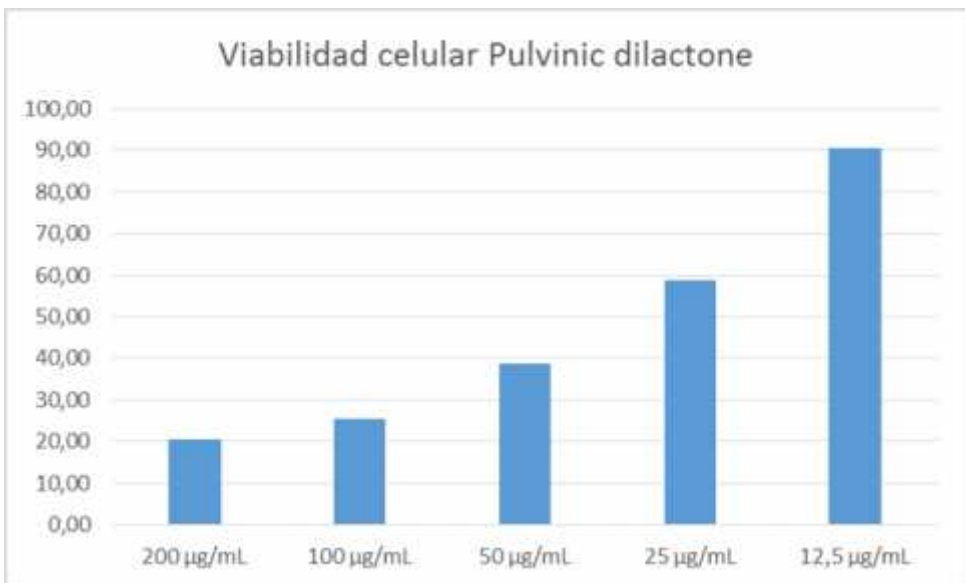
Cuadro. 6-3. Porcentaje de viabilidad celular

Pulvinic dilactone	Viabilidad celular, %
200ppm	20,47
100 ppm	25,39
50 ppm	38,86
25 ppm	58,81
12,5ppm	90,67

Realizado por (Janeta, 2015)

Por medio del programa estadístico probit se determinó la concentración letal

Figura. 9-3. Viabilidad celular de Pulvinic dilactone



Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro. 7-3. CL50 Pulvinic dilactone

CL50, µg/mL	43,92
Límite inferior	19,76
Límite superior	84,96

Realizado por (Janeta, 2015)

3.2.1.2 Atranorina

Cuadro 8-3 . Absorbancias del ensayo citotóxico de Atranorina

[Atranorina], µg/mL	ABSORBANCIA	Prom A	D.EST	A1	A2	A3	A4	A5
200	0,063	0,0628	0,00295	0,06	0,064	0,06	0,067	0,063
100	0,101	0,1014	0,00114	0,103	0,101	0,102	0,101	0,1
50	0,177	0,1772	0,001304	0,178	0,176	0,179	0,177	0,176
25	0,298	0,2978	0,001095	0,298	0,298	0,299	0,298	0,296
12,5	0,35	0,3498	0,001643	0,348	0,351	0,349	0,352	0,349
0	0,419	0,4192	0,001924	0,418	0,42	0,422	0,417	0,419

[Atranorina], µg/mL	Viabilidad celular, %	Prom A	D.EST	A1	A2	A3	A4	A5
200	15,04	14,98	0,75	14,35407	15,2381	14,21801	16,06715	15,0358
100	24,11	24,19	0,29	24,64115	24,04762	24,17062	24,22062	23,86635
50	42,24	42,27	0,30	42,58373	41,90476	42,41706	42,44604	42,00477
25	71,12	71,04	0,33	71,29187	70,95238	70,85308	71,46283	70,64439
12,5	83,53	83,44	0,63	83,25359	83,57143	82,70142	84,41247	83,29356

Realizado por (Janeta, 2015)

% Viabilidad celular = % de neutrófilos viables (vivos)

Se calcula de la siguiente manera

$$\%Vc = \left(\frac{\text{Absorbancia de cada compuesto a diferentes concentraciones}}{\text{Absorbancia del blanco DMSO (valor máximo de viabilidad celular)}} \right) * 100$$

% Promedio Vc = Es la relación entre la suma de los porcentajes y el número de mediciones

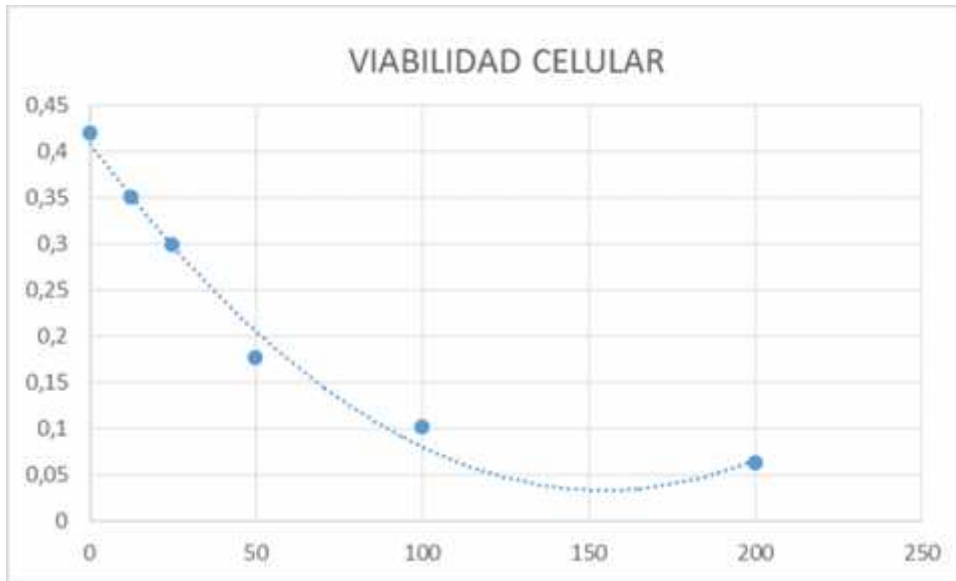
D.E. = Desviación estándar.

- Evaluación de error entre absorbancias de la Atranorina.

Atranorina	Absorbancias
200ppm	0,063
100 ppm	0,101
50 ppm	0,177
25 ppm	0,298
12,5ppm	0,35
0ppm	0,419

Realizado por (Janeta, 2015)

Figura. 10-3. Absorbancias del ensayo de viabilidad celular de Atranorina



Realizado por (Janeta, 2015)

% Viabilidad celular = % de neutrófilos viables (vivos)

Cuadro 9-3. Porcentaje de viabilidad celular de Atranorina

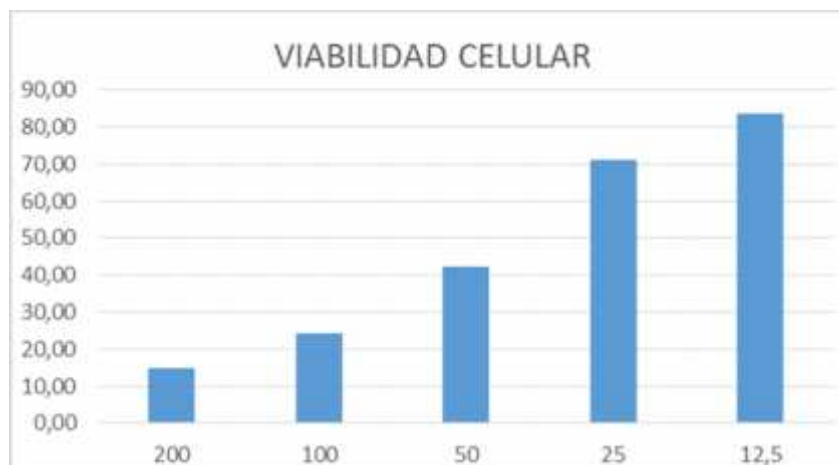
Atranorina	Viabilidad celular, %
200ppm	15,04
100 ppm	24,11
50 ppm	42,24
25 ppm	71,12
12,5ppm	83,53

Realizado por (Janeta, 2015)

Por medio del programa estadístico probit se determinó la concentración letal

Media en la prueba de sensibilidad

Figura. 11-3. Viabilidad celular de Atranorina



Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro. 10-4. CL50 Atratorina

CL50, µg/mL	44,22
Límite inferior	34,53
Límite superior	55,98

Realizado por (Janeta, 2015)

Se concluyó que la CL50, µg/ml de Pulvinic dilactone fue de 43,92 para neutrofilos aislados en una concentración de 1×10^4 N/ml Y que la CL50, µg/ml de la Atratorina fue de 44,22 para neutrófilos aislados en una concentración de 1×10^4 N/ml

3.2.2. Ensayo antiinflamatorio**3.2.2.1. Pulvinic dilactone****Cuadro 11-3.** Absorbancias del ensayo *antiinflamatorio* de Pulvinic dilactone

PULVINIC DILACTONE									
			promedio A	viación. Están	A1	A2	A3	A4	A5
BLANCO DMSO	0,329		0,3294	0,00320936	0,333	0,332	0,325	0,328	0,329
BLANCO TRITON	0		0	0	0	0	0	0	0
CONTROL ASPIRINA	0,054		0,0536	0,00167332	0,055	0,051	0,053	0,054	0,055
200ppm	0,087		0,0868	0,00192354	0,088	0,089	0,086	0,084	0,087
100 ppm	0,149		0,1486	0,00336155	0,146	0,151	0,148	0,145	0,153
50 ppm	0,206		0,2058	0,00228035	0,203	0,209	0,205	0,207	0,205
25 ppm	0,257		0,2574	0,00230217	0,261	0,258	0,255	0,256	0,257
83,58662614	83,73	0,53035771			83,4834835	84,6385542	83,6923077	83,5365854	83,2826748
73,556231	73,65	0,44274525			73,5735736	73,1927711	73,5384615	74,3902439	73,556231
54,7112462	54,88	1,08219183			56,1561562	54,5180723	54,4615385	55,7926829	53,4954407
37,38601824	37,52	0,90992627			39,039039	37,0481928	36,9230769	36,8902439	37,6899696
21,88449848	21,86	0,29717948			21,6216216	22,2891566	21,5384615	21,9512195	21,8844985
	%TII	D.E.T.M			%II (A1)	%II (A2)	%II (A3)	%II (A4)	%II (A5)

Realizado por (Janeta, 2015)

%TII = Porcentaje promedio total de inhibición inflamatoria

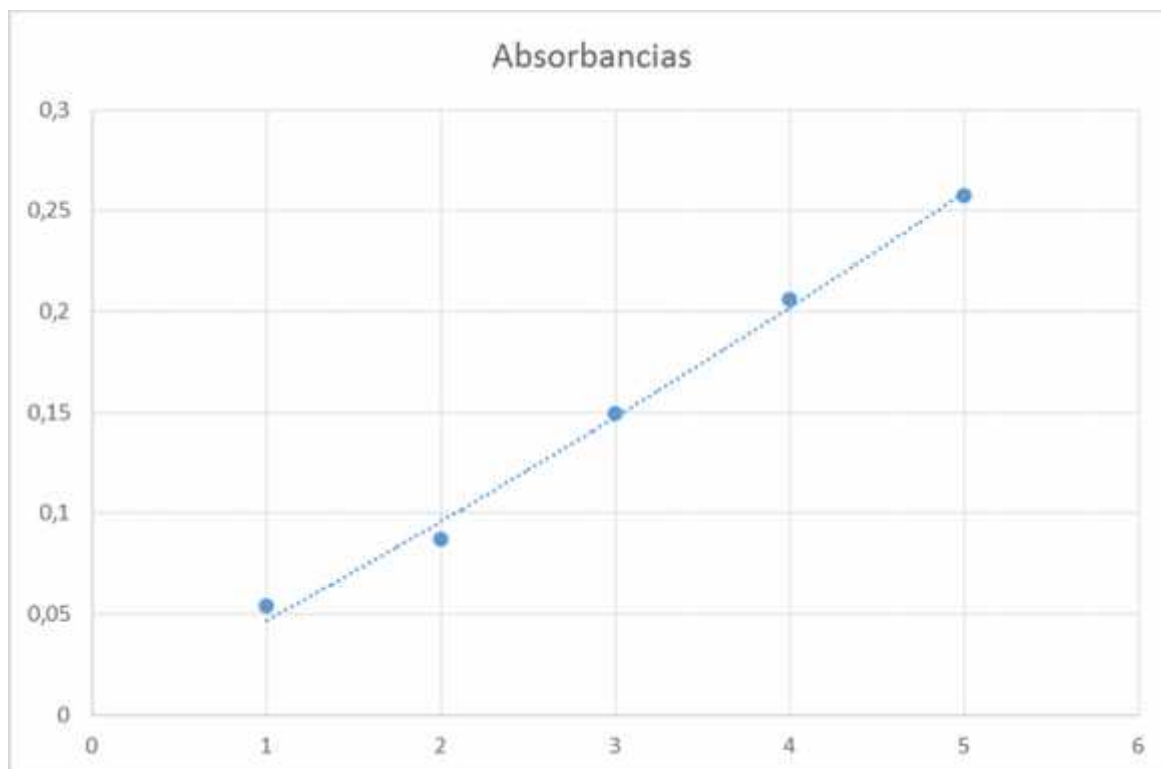
%TII = Es la relación entre la suma de los porcentajes y el número de mediciones

D.E.T.M = desviación estándar de Absorbancia para cada concentración.

Pulvinic dilactone	Absorbancias
CONTROL ASPIRINA 200ppm	0,054
200ppm	0,087
100 ppm	0,149
50 ppm	0,206
25 ppm	0,257

Realizado por (Janeta, 2015)

Figura. 12-3. Absorbancias ensayo antiinflamatorio



Realizado por (Janeta, 2015)

%II = Porcentaje de inhibición inflamatoria

Se lo calcula con la siguiente formula

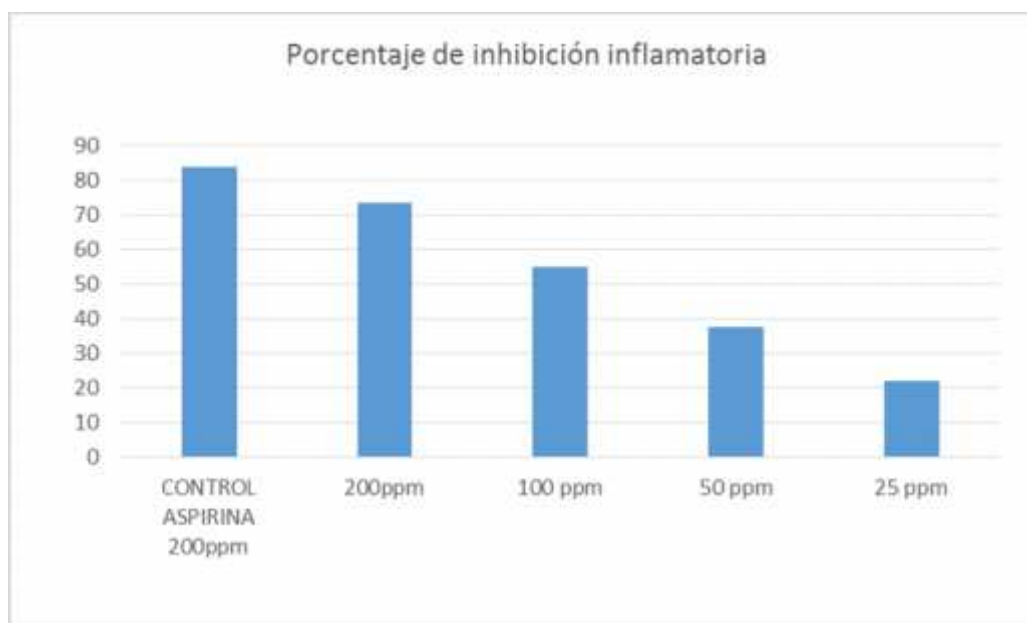
$$\%II = 100 - \left(\frac{\text{Absorbancia de cada compuesto a diferentes concentraciones}}{\text{Absorbancia del blanco DMSO}} \right) * 100$$

Cuadro 12-3 Porcentaje de inhibición inflamatoria

Pulvinic dilactone	Porcentaje de inhibición inflamatoria
CONTROL ASPIRINA 200ppm	83,73
200ppm	73,65
100 ppm	54,88
50 ppm	37,52
25 ppm	21,86

Realizado por (Janeta, 2015)

Figura. 13-3. Porcentaje de inhibición inflamatoria de Pulvinic dilactone



Realizado por (Janeta, 2015)

Pulvinic dilactone presentó una buena inhibición de efecto antiinflamatorio a 200 ppm pero no tanto como la aspirina, ya que esta fue efectiva aproximadamente con un 10% más de inhibición de efecto respecto a la Atranorina.

3.2.2.2. Atranorina

Cuadro 13-3. Absorbancias del ensayo *antiinflamatorio* de Atranorina

ATRANORINA									
			Promedio A	D. Estándar	A1	A2	A3	A4	A5
BLANCO DMSO	0,322		0,3224	0,005176872	0,323	0,331	0,321	0,319	0,318
BLANCO TRITON, 0,01%	0		0	0	0	0	0	0	0
CONTROL ASPIRINA, 200 ppm	0,052		0,0522	0,001095445	0,052	0,052	0,054	0,052	0,051
200 ppm	0,078		0,0776	0,00181659	0,079	0,076	0,08	0,077	0,076
100 ppm	0,117		0,1168	0,001643168	0,116	0,118	0,119	0,116	0,115
50 ppm	0,174		0,1736	0,002701851	0,172	0,177	0,175	0,174	0,17
25 ppm	0,235		0,2346	0,002607681	0,233	0,237	0,237	0,231	0,235
	83,85	83,8059706	0,41051054		83,9009288	84,2900302	83,1775701	83,6990596	83,9622642
	75,78	75,92433	0,73158515		75,5417957	77,0392749	75,0778816	75,862069	76,1006289
	63,66	63,7676662	0,54033417		64,0866873	64,3504532	62,9283489	63,6363636	63,836478
	45,96	46,1506396	0,62883172		46,749226	46,5256798	45,482866	45,4545455	46,5408805
	27,02	27,2235258	1,03649258		27,8637771	28,3987915	26,1682243	27,5862069	26,1006289
		%TII	D.E.T.M		%II (A1)	%II (A2)	%II (A3)	%II (A4)	%II (A5)

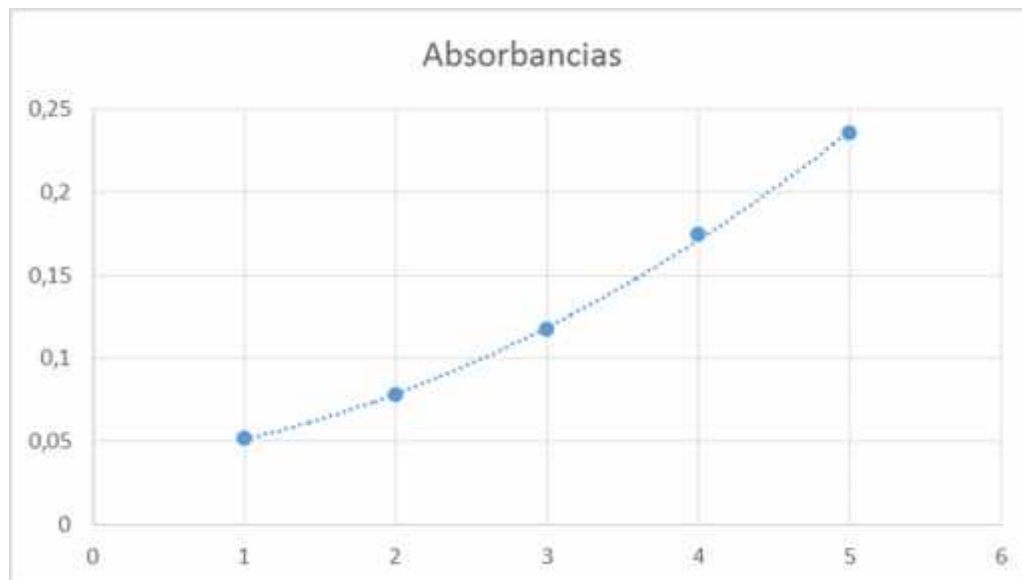
Realizado por (Janeta, 2015)

- **%TII** = Porcentaje promedio total de inhibición inflamatoria
Se calcula de la siguiente manera
- **%TII** = Es la relación entre la suma de los porcentajes y el número de mediciones
- **D.E.T.M** = Desviación estándar total por medición.
- **%II** = Porcentaje de inhibición inflamatoria

Atranorina	Absorbancias
CONTROL ASPIRINA 200ppm	0,052
200ppm	0,078
100 ppm	0,117
50 ppm	0,174
25 ppm	0,235

Realizado por (Janeta, 2015)

Figura. 14-3. Absorbancia de Atranorina en ensayo antiinflamatorio



Realizado por (Janeta, 2015)

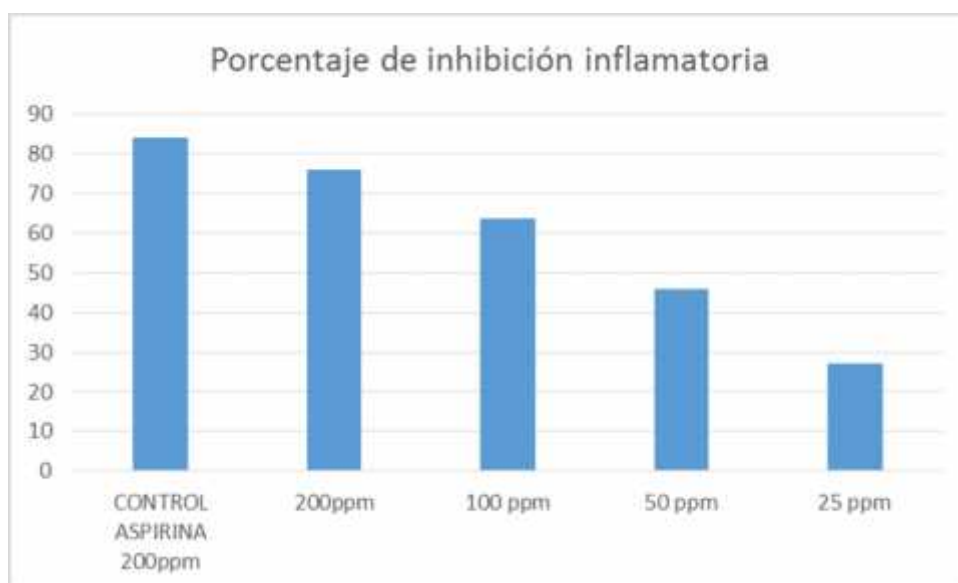
Se lo calcula con la siguiente fórmula

$$\%II = 100 - \left(\frac{\text{Absorbancia de cada compuesto a diferentes concentraciones}}{\text{Absorbancia del blanco DMSO}} \right) * 100$$

Atranorina	Porcentaje de inhibición inflamatoria
CONTROL ASPIRINA 200ppm	83,85
200ppm	75,78
100 ppm	63,66
50 ppm	45,96
25 ppm	27,02

Realizado por (Janeta, 2015)

Figura. 15-3. Porcentaje de inhibición inflamatoria



Realizado por (Janeta, 2015)

Atranorina presenta una buena inhibición del efecto antiinflamatorio a 200 ppm, aproximadamente 3 % más que Pulvinic dilactone, pero aun así no tanto como la aspirina, ya que esta fue efectiva aproximadamente con un 8% más de inhibición de efecto respecto a la Atranorina.

Se comprobó que la diferencia existente entre la aspirina y cada uno de nuestros compuestos es grande ya que en porcentajes de inhibición del efecto inflamatorio, un 8% y 10% respectivamente.

3.3. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

3.3.1 Aislamiento de compuestos

Por pruebas cromatográfica, químicas, espectroscópicas IR y UV se determinó que los compuestos aislados a partir de *Parmelina tiliacea* fueron:

Cuadro 14-3. Determinación de compuestos

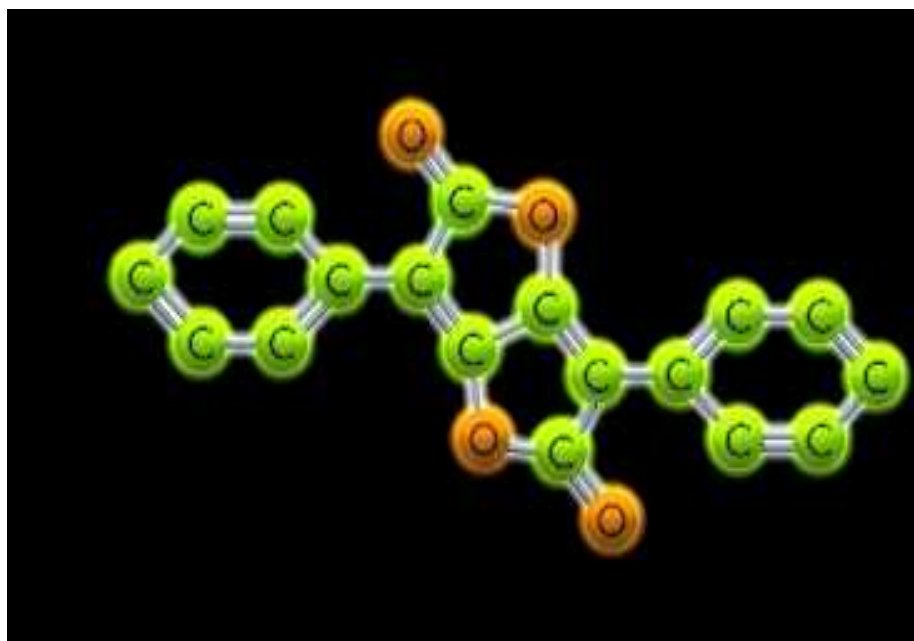
Compuesto	Nombre
Compuesto 1	Pulvinic dilactone
Compuesto 2	Atranorina
Compuesto 3	Ácido cryptostictico

Realizado por (Janeta, 2015)

3.3.2 Formulas de los compuestos aislados

3.3.2.1 Pulvinic dilactone

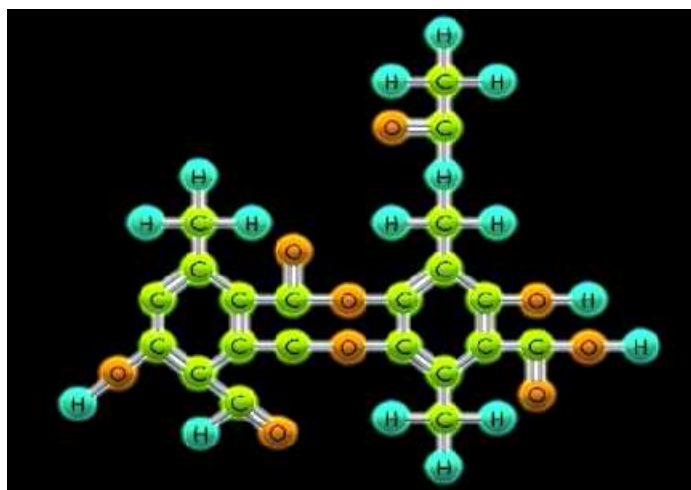
Figura. 16-3. Fórmula estructural de Pulvinic dilactone



Realizado por (Janeta, 2015)

3.3.2.2 Atranorina

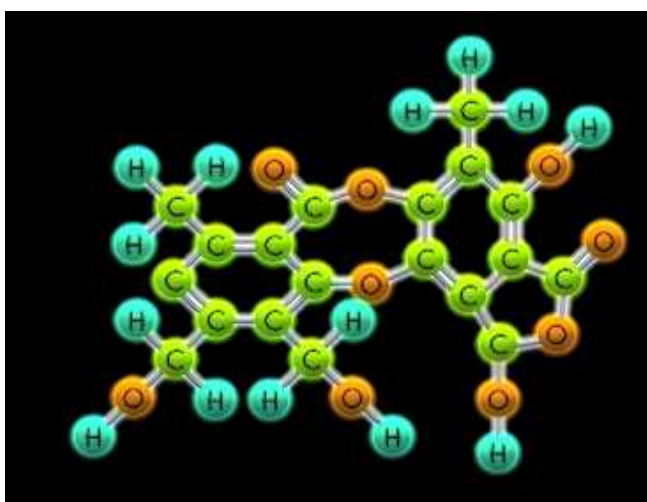
Figura. 17-3. Fórmula estructural de Atranorina



Realizado por (Janeta, 2015)

3.3.2.3 Acido cryptostictico.

Figura. 18-3. Fórmula estructural del Ácido cryptostictico



Realizado por (Janeta, 2015)

4.3.3 Ensayo antiinflamatorio

Cuadro 15-4. Porcentaje de inhibición inflamatoria de Antranorina

Atranorina	Porcentaje de inhibición inflamatoria
CONTROL ASPIRINA 200ppm	83,85
200ppm	75,78
100 ppm	63,66
50 ppm	45,96
25 ppm	27,02

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro 16-3. Porcentaje de inhibición inflamatorio de Pulvinic dilactone

Pulvinic dilactone	Porcentaje de inhibición inflamatoria
CONTROL ASPIRINA 200ppm	83,73
200ppm	73,65
100 ppm	54,88
50 ppm	37,52
25 ppm	21,86

Realizado por (Janeta, 2015)

3.3.4 Ensayo Citotóxico**Cuadro 17-3.** Porcentaje de viabilidad celular de la Atranorina

Atranorina	Viabilidad celular, %
200ppm	15,04
100 ppm	24,11
50 ppm	42,24
25 ppm	71,12
12,5ppm	83,53

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro 18-3. Porcentaje de viabilidad celular de Pulvinic dilactone

Pulvinic dilactone	Viabilidad celular, %
200ppm	20,47
100 ppm	25,39
50 ppm	38,86
25 ppm	58,81
12,5ppm	90,67

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro 19-3. CL 50 de Atranorina

CL50, µg/mL	43,92
Límite inferior	19,76
Límite superior	84,96

Realizado por (Janeta, 2015)

Cuadro 20-3. CL 50 Pulvinic dilactone

CL50, µg/mL	44,22
Límite inferior	34,53
Límite superior	55,98

Realizado por (Janeta, 2015)

CONCLUSIONES

- Se comprobó la presencia de triterpenos, esteroides y compuestos fenólicos durante el tamizado fitoquímico de los extractos etéreo, metanólico y acuoso de la especie *Parmelina tiliacea*.
- Se identificó mediante pruebas cromatográficas, químicas, espectrofotométricas UV e IR cada uno de los compuestos aislados y comparé mediante bibliografía cada uno de ellos.
- Se aisló mediante cromatografía de capa fina TLC sílica gel₆₀ los compuestos liquénicos: Pulvinic dilactone, Atranorina, ácido cryptostictico a partir de *Parmelina tiliacea*.
- La Atranorina aislada a partir de *Parmelina tiliacea* ostenta actividad antiinflamatoria, ésta presenta aproximadamente un efecto antiinflamatorio de 75,78 % a 200ppm en relación al control aspirina a 200ppm con un efecto de 83,85
- Pulvinic dilactone separada a partir de *Parmelina tiliacea* posee actividad antiinflamatoria, presenta aproximadamente un efecto antiinflamatorio de 73,65 % a 200ppm en relación al control aspirina a 200ppm con un efecto de 83,73.
- Los compuestos liquénicos aislados a partir de *Parmelina tiliacea* presentan alta citotoxicidad celular.
- A 200 ppm se muestra 15,04 % (Viabilidad celular) o 84,96 % (citotoxicidad) para la Atranorina y 20,47 % (Viabilidad celular) o 79,53% (citotoxicidad) para Pulvinic dilactone.
- Se concluyó que la CL₅₀ de Pulvinic dilactone fue de 43,92 µg/ml para neutrófilos aislados en una concentración de 1×10^4 N/ml
- Respectivamente que la CL₅₀ de la Atranorina fue de 44,22 µg/ml para neutrófilos aislados en una concentración de 1×10^4 N/ml

RECOMENDACIONES

- Se recomienda seguir un estudio de *Parmelina tiliacea* de actividad antibacterial a partir de sus compuestos liquénicos por su alta citotoxicidad
- Se recomienda un estudio de actividad foto protectora en líquenes por sus antecedentes foto protectores.
- En Ecuador se encuentra una gran cantidad de líquenes de diferentes especies los cuales nunca han sido estudiados, por tanto se invita seguir trabajando en estas especies que esconden aún nuevas moléculas y estructuras que podrían convertirse en nuevas cabezas de serie para en un futuro convertirse en nuevos fármacos.

BIBLIOGRAFIA

ALEXADER, A., & STORER, I. “Metabolism, Pharmacokinetics, and Toxicity of Functional”. Cambridge-Reino Unido. 2010. Pp 65-80.

<https://books.google.com.ec/books?id=Z7PmWUe0wmAC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

2014/10/19

ELVIRA Conde B. Regulation mechanisms of phenolic production in the lichen *Himantormia lugubris*, as deduced from the analysis of metabolite accumulation, *Plant Science*, 77. 1991. Ireland. P.1-9

DELPHINE & PARROT, Comparative metabolite profiling and chemical study of *Ramalina siliquosa* complex using LC–ESI-MS/MS approach, *Phytochemistry* 89, (2013) Pags. 114–124

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942213000393>

2014-11-26

DEMET, A. CANSARAN. Identification and Quantitation of Usnic Acid from the Lichen *Usnea* Species of Anatolia and Antimicrobial Activity, *Tangaran*, 45. 2006, Turkey, P.773-776

FERNÁNDEZ, J., CREHUET N., GÓMEZ, J., & GÓMEZ, E. Epidemiología y prevención de las drogodependencias. 11ª ed, Elsevier Masson. Barcelona – España. 1992 - 2001, Pp. 1108 - 1117.

<http://media.axon.es/pdf/68463.pdf>

2014/11/23

HOWELL G.M. EDWARDS, Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid, *Journal of Molecular Structure* 651–653, British, 2003, Pags.27–37.

<http://www.journals.elsevier.com/journal-of-molecular-structure>

2015-02-12

JHON A, ELIX, Catalogue of standardized chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances, Tercera edición, Canberra, 12-sep-2014, Pags. 128,280,296.

KARAMA MAKNI-MAALEJ, Zymosan induces NADPH oxidase activation in human neutrophils by inducing the phosphorylation of p47phox and the activation of Rac2: Involvement of protein tyrosine kinases, PI3Kinase, PKC, ERK1/2 and p38MAPkinase, *Biochemical Pharmacology* 85, (2013), Pags. 92–100.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295212006855>

2014-09-19.

MABBERLEY, D. *A Portable Dictionary of Plants, their Classifications, and Uses.* Cambridge Cambridge University Press, 2009, P. 60-100.

<http://books.google.com.ec/books?id=9RyKKhTwXUYC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

2014/11/23

MUHAMMAD, I. CHOUDHARY. Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen, *Usnea longissima*. *Phytochemistry*, 66. August 2005. Pakistan, p.2346–2350

NISHITOBA, Y., NISHIMURA, H. Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*. *Phytochemistry* 26, 1987, P3181–3185.

SACHIKO SHIMADA, New depsidones from *lobaria oregano*, *Phytochemistry*, 1980, Pergamon Press Ltd. England Vol. 19, pp. 32&330.

TAIZ, L., & ZEIGER, E. *Fisiología E. Planta.* (Sinauer Asociados). Vol. 91., N° 3, (España), Pp 550-569. Mayo 2002

<http://aob.oxfordjournals.org/content/91/6/750.full>

2014/11/19

ANEXOS.

Anexo A.- recolección del liquen



Anexo B.- laboratorio de productos naturales



Anexo C.- Liquen molido



Anexo D.- Columna flash en poliamida



Anexo E.- Filtrado del extracto Etanólico



Anexo F.- Placa preparativa



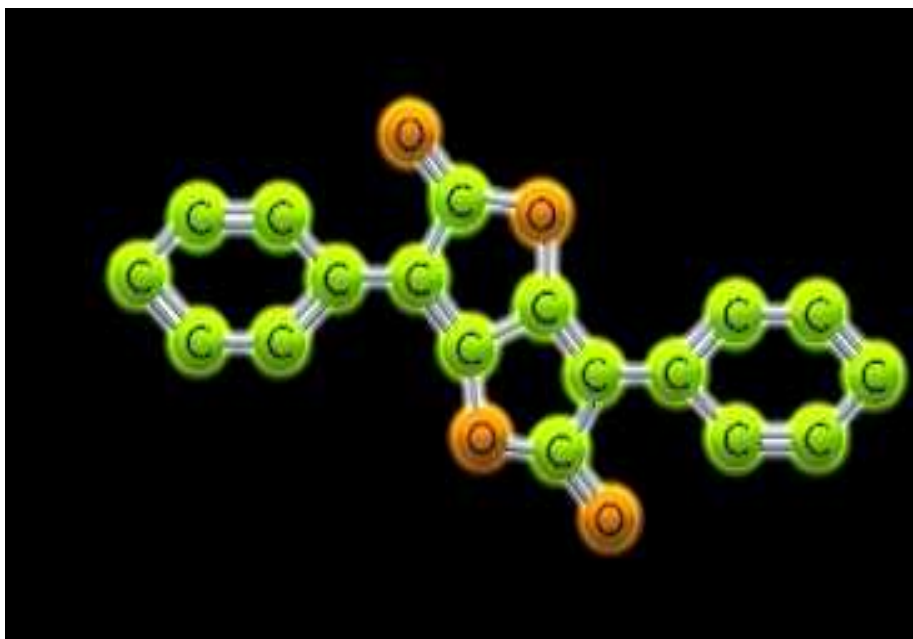
Anexo G- Placa silica gel revelada



Anexo H - Cámara y reactivos para conteo de Neutrófilos

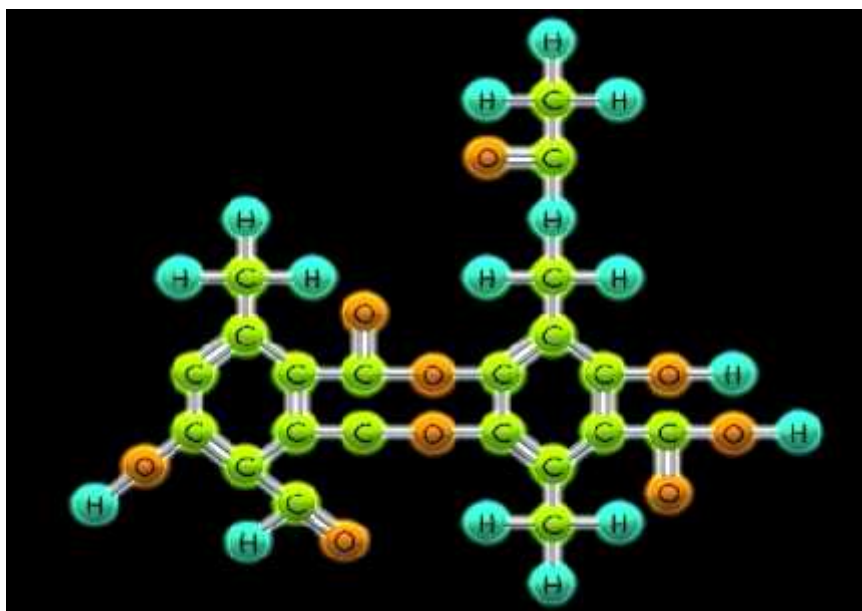


Anexo I Fórmula estructural de Pulvinic dilactone



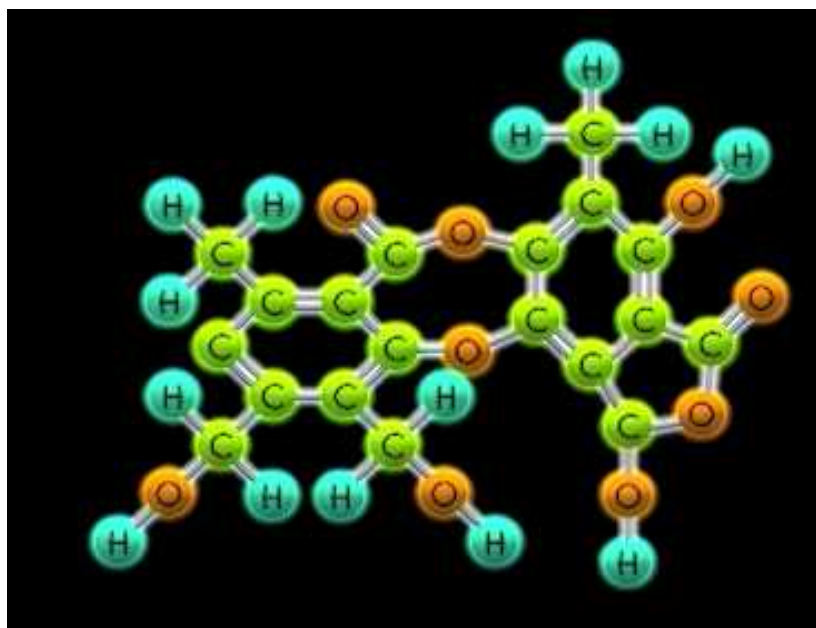
Realizado por (Janeta, 2015)

Anexo J. Fórmula estructural de Atranorina



Realizado por (Janeta, 2015)

Anexo K. Fórmula estructural del Ácido cryptostictico



Anexo L. Ruta metabólica de los compuestos liquénicos

