



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE SÍNTESIS Y PRODUCTOS NATURALES

**AISLACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS
DESDE LIQUÉN ANTÁRTICO *Himantormia lugubris* (Hue.) Lamb.**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

CINTHYA BELÉN CABRERA ROJAS

Director de Tesis: Dr. Mauricio Cuellar F.
Co-director: Prof. Wanda Quilhot P.

2015

*A mi familia, en especial Eduardo y Verónica,
por ser los pilares en la construcción de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Debo comenzar agradeciendo a mi gran y hermosa familia, en especial a mis padres Eduardo y Verónica por sus enseñanzas, apoyo y amor incondicional, son y serán siempre mi ejemplo a seguir. A mis hermanos Diego, Juan, Mabelyn, Tammy y Victor por ser parte de mi vida, les doy gracias por su amor y gran paciencia. A todos los amo infinitamente.

A mi pololo Sebastián, gracias por tu apoyo incondicional durante toda esta etapa, por alentarme y confiar en mí en los momentos difíciles, por amarme por sobre todas las cosas y por estar presente de alguna u otra forma pese a la distancia. Te amo mi vida.

A mi querido profesor Mauricio Cuellar, por permitirme realizar esta etapa junto a él, la cual inició de una forma muy particular e inolvidable y culminó de la mejor manera posible. Gracias por su confianza y apoyo durante estos meses, pero por sobre todo por ser la misma persona siempre, transparente y leal. Me quedo con todos los momentos compartidos, gracias por eso y por el gran cariño.

A mi querida Vivy y Naty, gracias por su compañía y complicidad, por su apoyo durante este proceso, pero sobre todo por el cariño día a día entregado, por las risas y momentos vividos. Me siento afortunada por haber compartido con dos personas tan lindas y sinceras como Uds, las quiero mucho.

A mi querida profesora Wanda Quilhot, por su apoyo incondicional desde principio a fin, por todos los conocimientos entregados y su total dedicación. Me siento privilegiada de haberla conocido y poder trabajar junto a usted. Gracias por todo, la quiero mucho.

A mis amigas de universidad Fabi, Kicha y Carla, por hacer mi experiencia universitaria inolvidable, siempre recordare las risas y momentos únicos compartidos, las amo mucho. En especial a mi amiga Vale, te doy las gracias por tu compañía durante todos estos años, por ser parte de mi vida y de mi familia, te amo mucho querida y gran amiga.

Para finalizar se agradece al proyecto Fondef idea 12i10224, por el financiamiento para la recolección del material liquénico.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Metabolitos secundarios de origen liquénico.	4
1.1.1 Vía del acetato-polimalonato.	6
1.1.2 Vía del ácido mevalónico.	8
1.1.3 Vía del ácido chiquímico.	9
1.2 Rol biológico de metabolitos de origen liquénico.	10
1.3 Actividad biológica de metabolitos liquénicos.	11
1.4 Líquenes Antárticos.	14
2. HIPÓTESIS.	16
3. OBJETIVOS.	18
4. METODOLOGIA	20
4.1 Análisis químico.	21
4.2 Ensayos biológicos.	30
5. RESULTADOS.	34
5.1 Metabolitos aislados.	35
5.2 Ensayos de viabilidad celular	39
6. DISCUSIÓN	41
7. CONCLUSIONES	46
8. REFERENCIAS	48
9. ANEXOS	58

RESUMEN

En este trabajo se investigaron los metabolitos secundarios acumulados por el líquen antártico *Himantormia lugubris* (Hue.) Lamb por métodos fitoquímicos convencionales y análisis espectroscópicos. Los productos aislados corresponden a los compuestos aromáticos atranol (500,0 mg, 0,11%) y 5,7-dihidroxi-6-metilftalida (270,0 mg, 0,10%) y el esteroide peroxiesterol (200,0 mg, 0,05%). No se detectaron compuestos previamente informados para la especie, que incluyen: atranorina, β -orcinolcarboxilato y los ácidos barbatólico, úsnico, alectoriálico, hipoalectoriálico y decarboxihipoalectoriálico.

Se evaluó la actividad antineoplásica de los metabolitos en las líneas celulares de: carcinoma de mama (MCF-7) y carcinoma de próstata (PC-3); los compuestos no presentaron efecto citotóxico de interés.

ABSTRACT

Secondary metabolites accumulated in the antarctic lichen *Himantormia lugubris* (Hue.) Lamb were investigated by means of conventional phytochemical methods and spectral analysis. The isolated products were the aromatic compounds atranol (500.0 mg, 0.11%) and 5,7-dihydroxy-6-methyl phthalide (270.0 mg, 0.10%); and the steroid peroxyergosterol (200.0 mg, 0.05%). Previously reported compounds for the species such as atranorine, β -orcinolcarboxylate, barbatolic acid, usnic acid, alectorialic acid, hypoalectorialic acid and decarboxyhypoalectorialic acid, were not detected.

Antineoplastic activity was evaluated for the identified metabolites in the following cell lines: breast carcinoma (MCF-7) and prostate carcinoma (PC-3). Compounds did not present any interesting cytotoxic effect.

1. INTRODUCCIÓN.

Los productos naturales son compuestos generados en los organismos vivos y su estudio incluye la investigación de estructuras, origen biosintético, función y rol en los organismos productores. Las plantas, en general los autótrofos, sintetizan dos tipos de compuestos: metabolitos primarios -como resultado de la fotosíntesis- que incluyen carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos, polioles, polisacáridos y vitaminas que, por ser universales, representan la unidad del mundo vivo. Los metabolitos secundarios -que expresan la diversidad- derivan biosintéticamente de los metabolitos primarios y están restringidos a grupos taxonómicos particulares (especies, géneros, familias) (Ramawat 2007). La mayoría de las drogas de origen natural corresponden a metabolitos secundarios y sus derivados (Merillon y Ramawat 2007). En este contexto, los productos secundarios de líquenes son un recurso para obtener prototipos o modelos para la síntesis de nuevos fármacos.

Los líquenes u hongos liquenizados, son organismos simbióticos formados por un componente fúngico -el micobionte- generalmente de la clase Ascomycetes, y uno o más componentes fotosintéticos -el fotobionte- correspondiente a algas unicelulares verdes y/o cianobacterias. Desde una perspectiva genética y evolutiva no son considerados individuos, lo que tiene implicancias en investigaciones tales como desarrollo y reproducción. Desde una perspectiva ecológica, se les define como microecosistemas por la existencia de un consumidor primario (micobionte) y un productor primario (fotobionte) responsable de la autotrofia del organismo liquénico (Farrar 1976).

Chile tiene una de las micobiotas liquénicas más diversas del mundo en términos de número de especies y biomasa. La situación geográfica del país, la extensión entre cordillera y mar, además del relieve, permiten la existencia de numerosos biomas y ecotonos desde el desierto cálido en el norte al desierto frío en el sur, ofreciendo un enorme rango de microhabitats y microclimas favorables para el desarrollo de los líquenes (Galloway 1998). Actualmente se han registrado alrededor de 1600 especies, incluyendo aquellas antárticas que se encuentran en Chile continental y las Islas Oceánicas (Quilhot y Rubio, com. pers), número que aumentará con la intensidad de la exploración.

La simbiosis liquénica es muy exitosa. Los líquenes se encuentran en casi todos los ecosistemas terrestres del mundo; son dominantes en algunas zonas polares y subpolares (Longton 1988), en alpinas o de altura, costeras y forestales, como los bosques temperado-lluviosos del Hemisferio Sur (en Chile, Bosques Valdivianos) o de la taiga en el Hemisferio Norte. Estas especies juegan un rol importante en los ciclos minerales de los ecosistemas; los líquenes que tienen cianobacterias como fotobionte, forman parte de un reducido grupo de organismos capaces de fijar nitrógeno atmosférico convirtiéndolo en nitrógeno soluble; además, contribuyen al enriquecimiento del suelo con nutrientes minerales cuando entran en procesos de descomposición (Guzmán *et al.* 1990; Nash III 1996).

Los líquenes son organismos poiquilohídricos; su estatus de humedad varía con las condiciones ambientales del hábitat, se desecan e hidratan rápidamente.

Son dependientes de fuentes de agua como lluvia, llovizna y neblina (Nash III 1996).

1.1 Metabolitos secundarios de origen liquénico

La mayoría de los compuestos acumulados en líquenes son metabolitos secundarios producidos por el componente fúngico y se depositan en la superficie de las hifas en forma de cristales. Estos compuestos, en general, son muy poco solubles en agua y sólo pueden ser extraídos con solventes orgánicos o surfactantes a diferentes valores de pH (Hidalgo *et al.* 1992). El carbono para su producción proviene de la actividad fotosintética, el tipo de carbohidrato provisto al hongo está determinado por el fotobionte: glucosa en líquenes con cianobacterias y ribitol, eritritol o sorbitol en líquenes con algas verdes (Elix 1996).

Se han descrito más de 1000 compuestos denominados sustancias liquénicas debido a que alrededor del 50 % son exclusivos de líquenes (Huneck & Yoshimura 1996; Quilhot *et al.* 2007); de pocos grupos de organismos se conoce tanto sobre su química. Desde la segunda mitad del siglo XX, las descripciones de especies que no incorporan los caracteres químicos son consideradas incompletas por los liquenólogos contemporáneos. Los metabolitos secundarios constituyen un carácter taxonómico determinante en la identificación de la especie.

Según su biogénesis, los compuestos liquénicos derivan de las tres rutas biogénicas universales: vía del acetato-polimalonato, vía del ácido chiquímico y

vía del ácido mevalónico (Tabla 1) (Elix 1996; Quilhot *et al.* 2007a), en concentraciones que fluctúan, en general, entre 0,1 a 15% de su peso seco.

Tabla.1. Principales clases de metabolitos secundarios en líquenes (Quilhot *et al.* 2007a).

1. Ruta del Acetato- polimalonato:

1.1 Ácidos alifáticos secundarios, ésteres y derivados relacionados

1.2 Policétidos derivados de compuestos aromáticos

1.2.1 Compuestos fenólicos mononucleares.

1.2.2 Derivados diaril y triaril de unidades fenólicas simples

1.2.2a Dépsidos, tridépsidos y ésteres bencílicos

1.2.2b Depsidonas y difeniléteres

1.2.2c Depsonas

1.2.2d Difenzofuranos, ácidos úsnicos y derivados

1.2.3 Antraquinonas

1.2.4 Cromonas

1.2.5 Naftaquinonas

1.2.6 Xantonas

2. Ruta del ácido mevalónico:

2.1 Di-, sester- y triterpenos

2.2 Esteroides

3. Ruta del ácido chiquímico:

3.1 Terfenilquinonas.

3.2 Derivados del ácido pulvínico

4. Productos fotosintéticos del fotobionte

4.1 Polioles

4.2 Monosacáridos y polisacáridos

1.1.1 Vía del acetato- polimalonato.

La mayoría de los metabolitos secundarios producidos en líquenes son derivados de la ruta del acetato-polimalonato. Estos compuestos poliaromáticos están formados por dos, tres y hasta cuatro unidades fenólicas cuyo origen es común a partir de ácidos carboxílicos policetónicos derivados de la condensación de una molécula de acetil-CoA con tres moléculas de malonil-CoA. Estos ácidos de cadena abierta se ciclan de dos formas diferentes para formar unidades fenólicas básicas: ciclación que sigue el modelo del ácido orsenílico (Fig.1), base estructural de dépsidos, depsidonas, éteres diarílicos y dibenzofuranos (derivados del orcinol y del β -orcinol); y la ciclación que sigue el modelo del floroglucinol (Fig.2), base estructural para ácidos úsnicos (Elix 1996; Mosbach 1973). Se considera como la vía más productiva ya que, además, derivan de ella compuestos aromáticos no exclusivos de líquenes como cromonas, xantonas y antraquinonas, formadas por ciclación interna de cadenas de policétidos, las cuales son a menudo análogas de productos de hongos no liquenizados y/o plantas vasculares (Huneck 1973, Romagni & Dayan 2002).

Figura 1: Modelo de ciclación orsenílica.

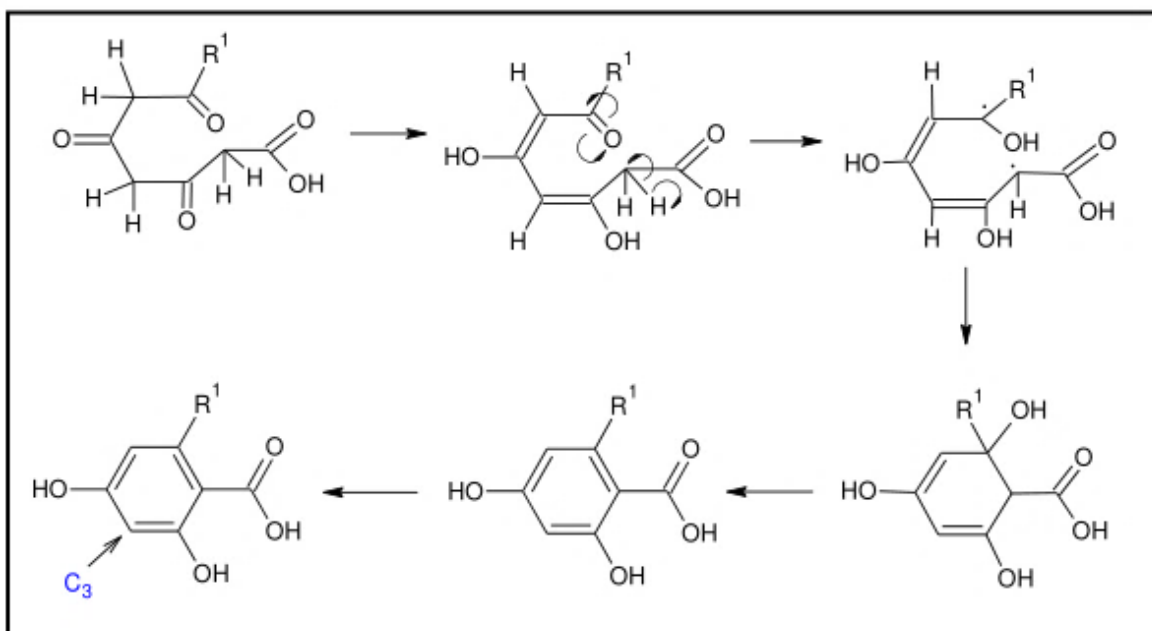
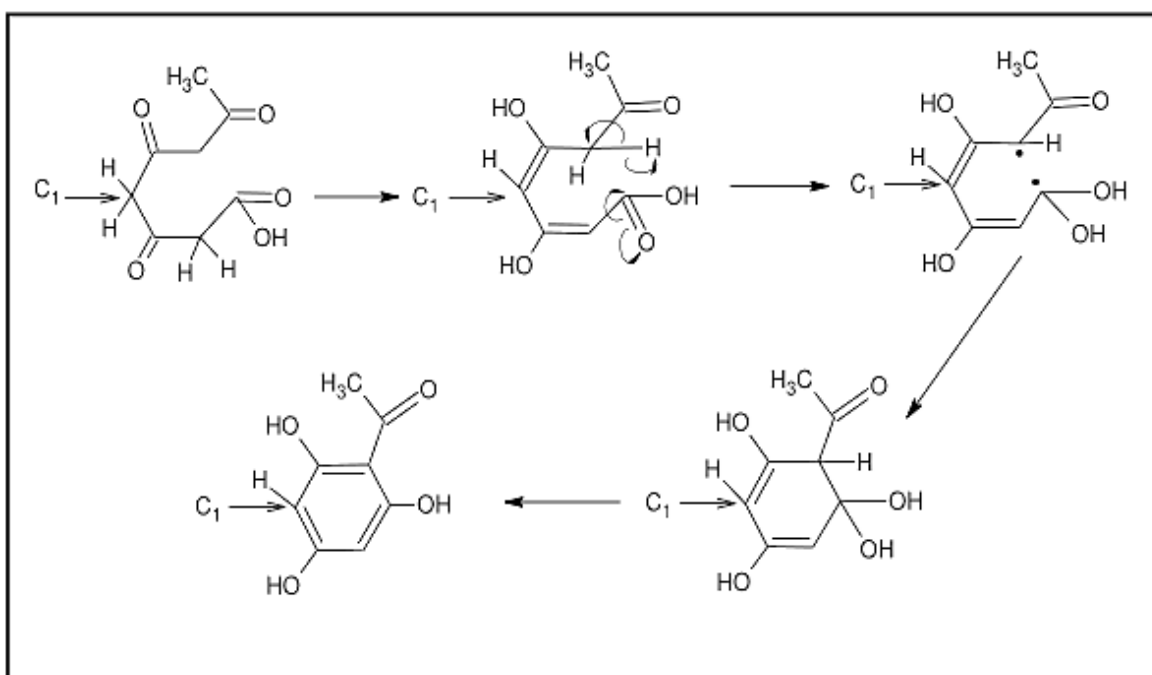


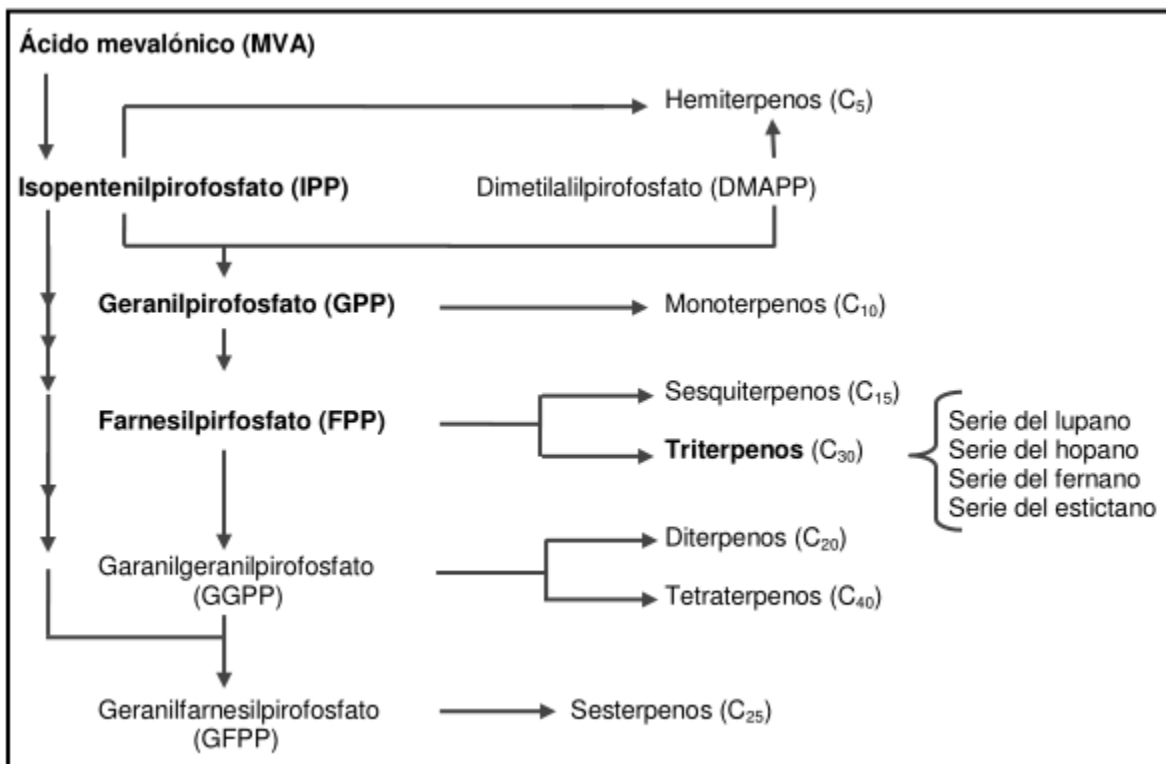
Figura 2: Modelo ciclación floroglucinólica.



1.1.2 Vía del ácido mevalónico

La ruta del ácido mevalónico da origen a compuestos terpénicos, carotenoides y esteroides (Huneck & Yoshimura 1996). La biosíntesis de estos compuestos (Fig. 3) se genera por la condensación de una molécula de acetil-CoA con una de acetoacetil-CoA, formando ácido mevalónico que, mediante sucesivas reacciones de fosforilación, genera isopentilpirofosfato (IPP), correspondiente al compuesto precursor de todos los metabolitos generados en esta vía (Silva *et al.* 1992). Uno de los grupos con mayores tasas de acumulación en líquenes son los triterpenos que exhiben una elevada diversidad tanto estructural como funcional (Connolly & Hill 1991; Cuellar *et al.* 2008). La mayoría de los productos sintetizados en esta ruta biosintética no son exclusivos de líquenes, son comunes a otros organismos vegetales (Huneck & Yoshimura 1996).

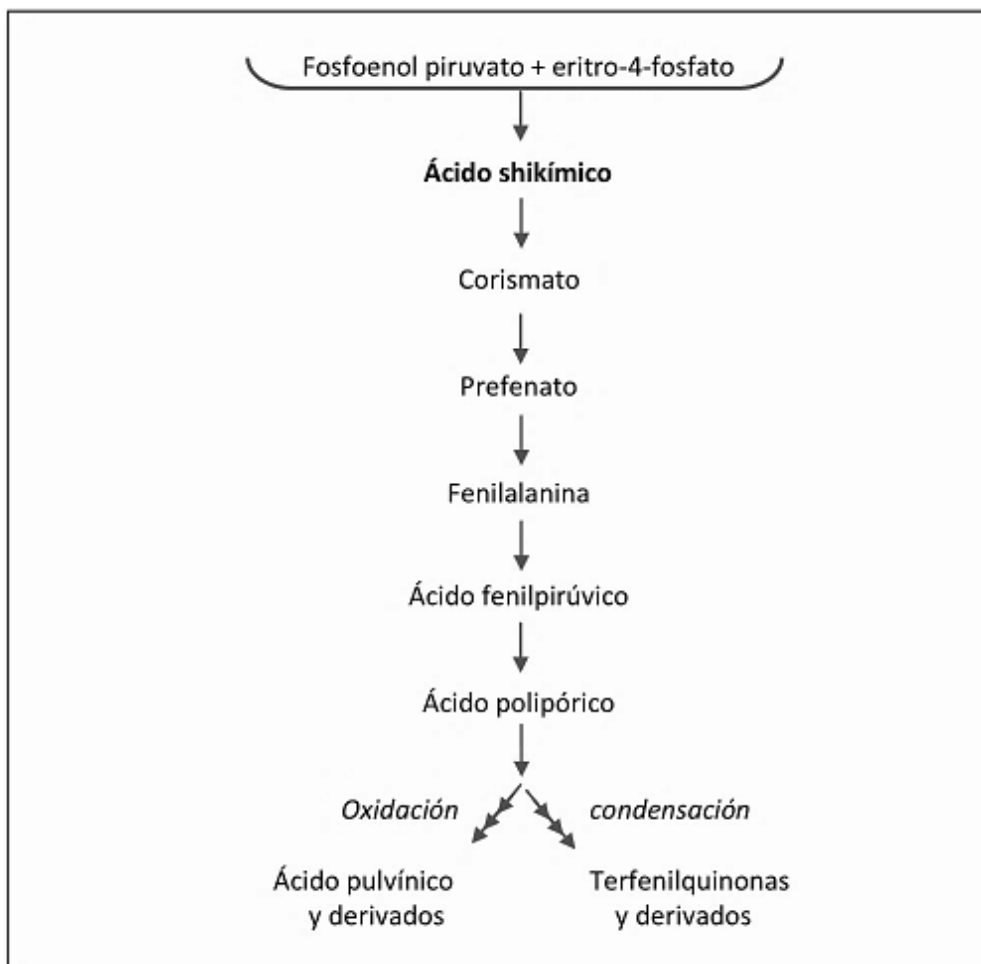
Figura 3: Esquema de biosíntesis de terpenos



1.1.3 Vía del ácido chiquímico

La vía del ácido chiquímico da origen a derivados de terfenilquinonas y ácido pulvínico cuya biosíntesis se produce por una secuencia de reacciones de desaminación a partir de d-eritrosa-4-fosfato y fosfoenol piruvato (Fig. 4). Los metabolitos acumulados pueden encontrarse también en plantas vasculares y en hongos no liquenizados (Culberson *et al.* 1977; Huneck & Yoshimura 1996).

Figura 4: Esquema de ruta del ácido chiquímico



1.2 Rol biológico de metabolitos de origen liquénico.

Las sustancias liquénicas cumplen funciones fisiológicas, ecológicas, ecofisiológicas y ecoquímicas que se relacionan con la adaptación a las condiciones climáticas, permitiéndoles colonizar diferentes hábitats; por ejemplo,

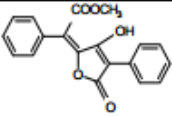
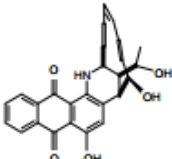
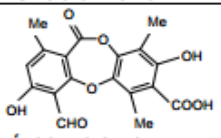
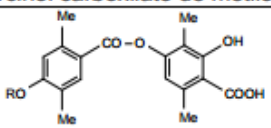
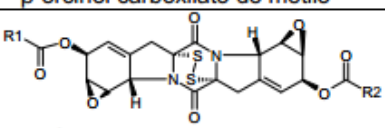
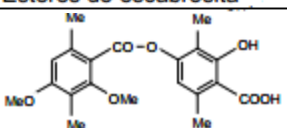
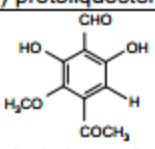
protección frente a la insolación y elevados niveles de radiación ultravioleta B (UV-B) debido a la disminución de la capa de ozono estratosférico (Purvis 2000; Huneck & Yoshimura 1996; Quilhot *et al.* 1996; Quilhot *et al.* 1998; Rubio *et al.* 2002), protección de ataques bacterianos y fúngicos (Lawrey 1986), suministro de energía en periodos críticos de inanición (Vicente *et al.* 1980). Algunos compuestos aromáticos forman complejos con metales y proveen al líquen de minerales desde el sustrato (Purvis 2000). Algunos compuestos actúan como metabolitos de estrés permitiendo al líquen adaptarse en hábitats de ambientes extremos (Huneck & Yoshimura 1996). Otros metabolitos almacenados en la médula del talo presentan propiedades hidrofóbicas que les permiten prevenir la desecación y saturación con agua, facilitando el intercambio de gases con la atmósfera (Armaleo 1993).

1.3 Actividad biológica de metabolitos liquénicos

En las últimas décadas se ha observado un creciente interés científico por los metabolitos secundarios acumulados en líquenes. Estudios químicos y biológicos realizados por métodos *in-vitro* e *in-vivo* (Quilhot *et al.* 2007) demuestran que estos organismos son una fuente potencial de agentes biológicamente activos (Huneck 1999). Dentro de la variedad de propiedades, se destaca la actividad antibacteriana, antineoplásica, antiviral, antioxidante, inhibidora de enzimas, analgésica, antiinflamatoria, antipirética, antiprotozoaria

(Leishmiasis y Enfermedad de Chagas), insecticida y herbicida (Lauterweinet *et al.* 1995; Ingolfsdottir *et al.* 1985; Perry *et al.* 1999; Müller 2001). En la Tabla 2 se muestran ejemplos de sustancias liquénicas con actividad biológica investigada.

Tabla 2. Ejemplos de sustancias liquénicas con actividad biológica (Samari 2011)

Actividad biológica	Compuesto	Referencia
Antibacteriana	Ácido úsnico	Lauterwein <i>et al.</i> , 1995 Ingolfsdottir <i>et al.</i> , 1998 Cocchiato <i>et al.</i> , 2002
	 Ácido vulpínico	Lauterwein <i>et al.</i> , 1995
	 Uncialamicina	Davies <i>et al.</i> , 2005
Antiviral	 Ácido virénsico	Müller, 2001
	Hipericina	Müller, 2001
Antifúngica	β -orcinol carboxilato de metilo	Khanuja <i>et al.</i> , 2004
Antitumoral	 Ácido barbático	Huneck, 1999
	β -orcinol carboxilato de metilo	Khanuja <i>et al.</i> , 2004
	 Ésteres de escabrosita	Huneck, 1999
Analgésica y antipirética	 Ácido difractáico	Okuyama <i>et al.</i> , 1995
	Ácido úsnico	Huneck, 1999
Antiinflamatoria	Ácido (+)-protoliqueterínico	Müller, 2001
	 Longissiminona A	Choudhary <i>et al.</i> , 2005
	Ácido barbático	Müller, 2001

1.4 Líquenes antárticos

El Territorio Antártico es único entre los biomas del mundo por tener una biota terrestre que comprende casi exclusivamente criptógamas. Los líquenes son los organismos dominantes en número de especies y biomasa, cuya primera compilación de su taxonomía, ecología y distribución ha sido publicada por Øvstedal & Lewis Smith (2001), quienes han incluido 386 taxas y 41 especies determinadas solo a nivel de género.

La mayoría de los líquenes de Antártica tienen una distribución bipolar, cosmopolita y austral; varias especies crecen en el sur de América del Sur, en áreas con condiciones ecológicas muy similares. Alrededor del 30 % de las especies antárticas se encuentran en Chile principalmente en las regiones de Aysen y Magallanes, en zonas del altiplano y en hábitats alpinos (Quilhot *et al.* 2007b).

Himantormia lugubris (Hue.) I.M. Lamb es una especie endémica de Antártica; pertenece a la familia *Parmeliaceae* que incluye principalmente géneros aislados o pequeños grupos de géneros sin relación evidente entre uno y otro (Thell *et al.* 2002, 2004). Se distribuye en las islas South Orkney y South Shetland del Sur y en la Península Antártica. Forma comunidades con *Usnea aurantiaco-atra* y musgos pertenecientes al género *Andreaea* (Øvstedal & Lewis Smith 2001).

Los metabolitos secundarios han sido informados por Lamb (1964), Huneck & Follman (1966), Mateos *et al.* (1991) y Thell *et al.* (2007); observándose diferencias químicas en las muestras analizadas (Tabla 3).

Tabla 3. Metabolitos secundarios informados para *Himantormia lugubris*.

Lamb (1964)	Huneck & Follman (1966)	Mateos <i>et al.</i> (1991)	Thell <i>et al.</i> (2007)
Atranorina	Atranorina	Atranorina	_____
Ácido babartólico	Ácido babartólico	Ácido babartólico	Ácido babartólico
_____	_____	_____	Ácido Alectoriálico
_____	_____	_____	Ácido Hipoalectoriálico
_____	_____	_____	Ácido decarboxihipoalectoriálico
_____	Ácido úsnico	_____	_____
_____	_____	β- orcinolcarboxilato	_____

El propósito de esta Tesis fue investigar los productos secundarios de *H. lugubris* en una muestra recolectada en Isla Rey Jorge, Islas Shetland del Sur, Antártica, en enero 2014, y evaluar la actividad antineoplásica de los metabolitos aislados en líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7 y carcinoma de próstata PC-3.

2. HIPÓTESIS.

Los líquenes tienen una química constante independiente del sustrato y de las condiciones del hábitat y, por lo mismo, de su distribución geográfica.

Se ha informado que la especie liquénica *Himantormia lugubris* acumula metabolitos provenientes de la ruta biogenética del acetato-polimalonato.

Existen evidencias experimentales que muestran que algunos de estos metabolitos liquénicos son compuestos bioactivos que inhiben el crecimiento celular en diversos tipos de cáncer, motivo por el cual son de gran interés en el área farmacológica.

Basándose en estos antecedentes la hipótesis de este trabajo es que metabolitos aislados desde el líquen antártico *Himantormia lugubris* poseen actividad en líneas celulares cancerígenas MCF-7 y PC-3.

3. OBJETIVOS.

Objetivo general

- Ampliar el conocimiento químico de líquenes antárticos.

Objetivos específicos

- Aislar y caracterizar metabolitos secundarios acumulados por *Himantormia lugubris* mediante métodos fitoquímicos y espectroscópicos.
- Realizar bioensayos *in-vitro* utilizando los metabolitos aislados para evaluar su posible actividad antineoplásica en líneas celulares MCF-7 (cáncer de mama) y PC-3 (cáncer de próstata).

4. METODOLOGÍA.

Materiales y equipos

4.1 Análisis químico

Materiales

- ✓ Solventes orgánicos: acetato de etilo, diclorometano, etanol y hexano.
- ✓ Material de vidrio Glassco®.
- ✓ Cromatoplasmas de sílice gel Merck 60 F 254.
- ✓ Sílice gel Merck® 60 G de 0,032- 0,063 nm.

Equipos

- ✓ Lámpara UV (254- 365 nm) ViberLourmat®
- ✓ Balanza analítica RADWAG ® AS220/cC/2
- ✓ RotavaporBuchi ® R210
- ✓ Placa calefactora Fargo HMS-102
- ✓ Espectrometro (RMN) BrukerSpectrometer® model AVANCE 400
- ✓ Punto de fusión STUART ® SMP30

Material líquénico: *Himantormia lugubris* (Hue.) Lamb fue recolectada en Enero del 2014 en Isla Rey Jorge, Islas Shetland del Sur, Antártica. La muestra fue almacenada en el herbario de líquenes UV de la Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso.

El material líquénico se limpió para eliminar cualquier elemento de contaminación y secado a 60°C durante 48 h, se obtuvo un peso seco de 441 g. Luego se trituró para ser sometido a maceración con diferentes solventes orgánicos.

Procedimientos generales

Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN y ^{13}C -RMN) se registraron en un espectrómetro Bruker Spectrometer® modelo AVANCE 400; ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100.623 MHz. Los espectros se registraron utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan a escala de ppm (partes por millón) y las constantes de acoplamiento J en Hz. Las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl_3) y/o metanol deuterado (CD_3DOH).

Abreviaturas utilizadas en RMN

s:	singlete
d:	doblete
dd:	doble doblete
m:	multiplete

Cromatografía en capa fina (TLC)

Los cromatogramas se realizaron en cromatofolios de aluminio con gel de sílice Merck ®60 F 254 y se desarrollaron con mezclas de acetato de etilo (AcOEt)/hexano en las proporciones adecuadas para cada caso. Los cromatogramas se revelaron con la luz ultravioleta (254nm- 365 nm) y/o con mezcla Hanessian, calentando posteriormente a 120°C.

Cromatografía en columna (CC)

Las CC se realizó en gel de sílice Merck ®60 G de 0,032 – 0,063 nm, eluidas con mezclas de AcOEt/hexano y AcOEt/etanol en polaridad creciente.

Extracción y purificación de los compuestos liquénicos

El material liquénico se sometió a extracciones sucesivas, a temperatura ambiente, durante 72 h con hexano, diclorometano y etanol. Posteriormente los extractos obtenidos se concentraron en un rotavapor a presión reducida.

La separación y purificación de los compuestos se realizó mediante CC y las fracciones obtenidas se monitorearon por TLC, agrupándose según la similitud de velocidades de elución (R_f), luego se concentraron en rotavapor a presión reducida.

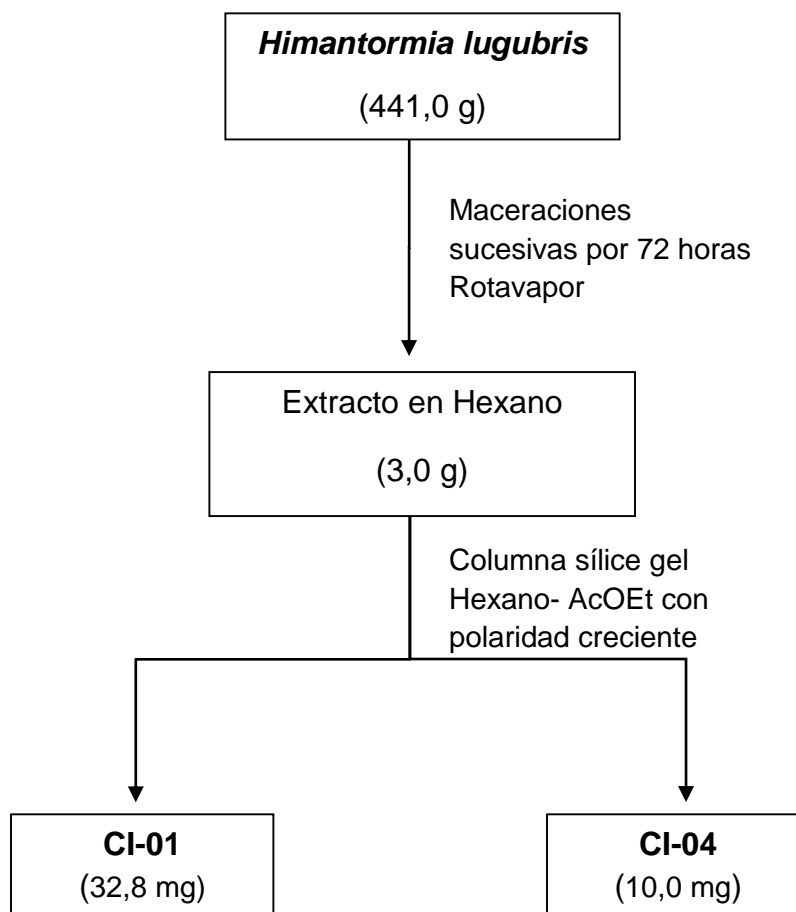
En los casos que corresponde, algunos metabolitos se purificaron utilizando técnicas de cristalización por solvente con mezclas de dietileter-metanol (1:1).

La identificación de los compuestos obtenidos se realizó mediante la determinación de sus características físicas y análisis espectroscópicos.

➤ **Extracto hexano**

El concentrado de hexano (3,0 g) se purificó mediante CC utilizando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo con polaridad creciente. Se recogieron fracciones de aproximadamente 5ml que fueron agrupadas mediante patrones de similitud según monitoreo por TLC, aislándose dos compuestos. El primero corresponde a un aceite amarillo rotulado como **CI-04** (10,0 mg) y el segundo compuesto con las mismas características se rotuló como **CI-01** (32,8 mg). El resto de las fracciones resultó ser una mezcla de compuestos difícil de separar (fig. 5).

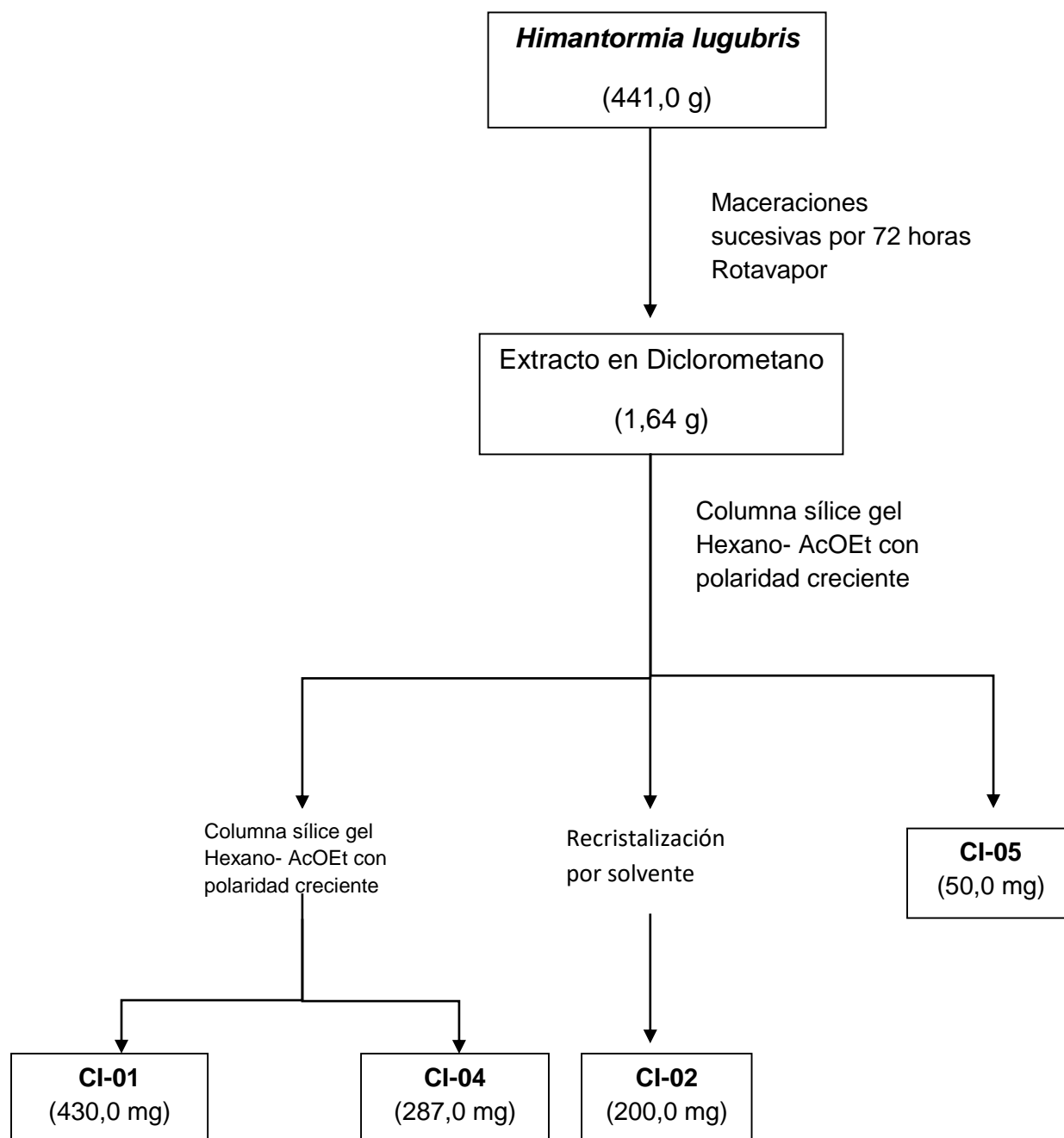
Figura 5. Esquema de separación y purificación de extracto de hexano.



➤ **Extracto de diclorometano**

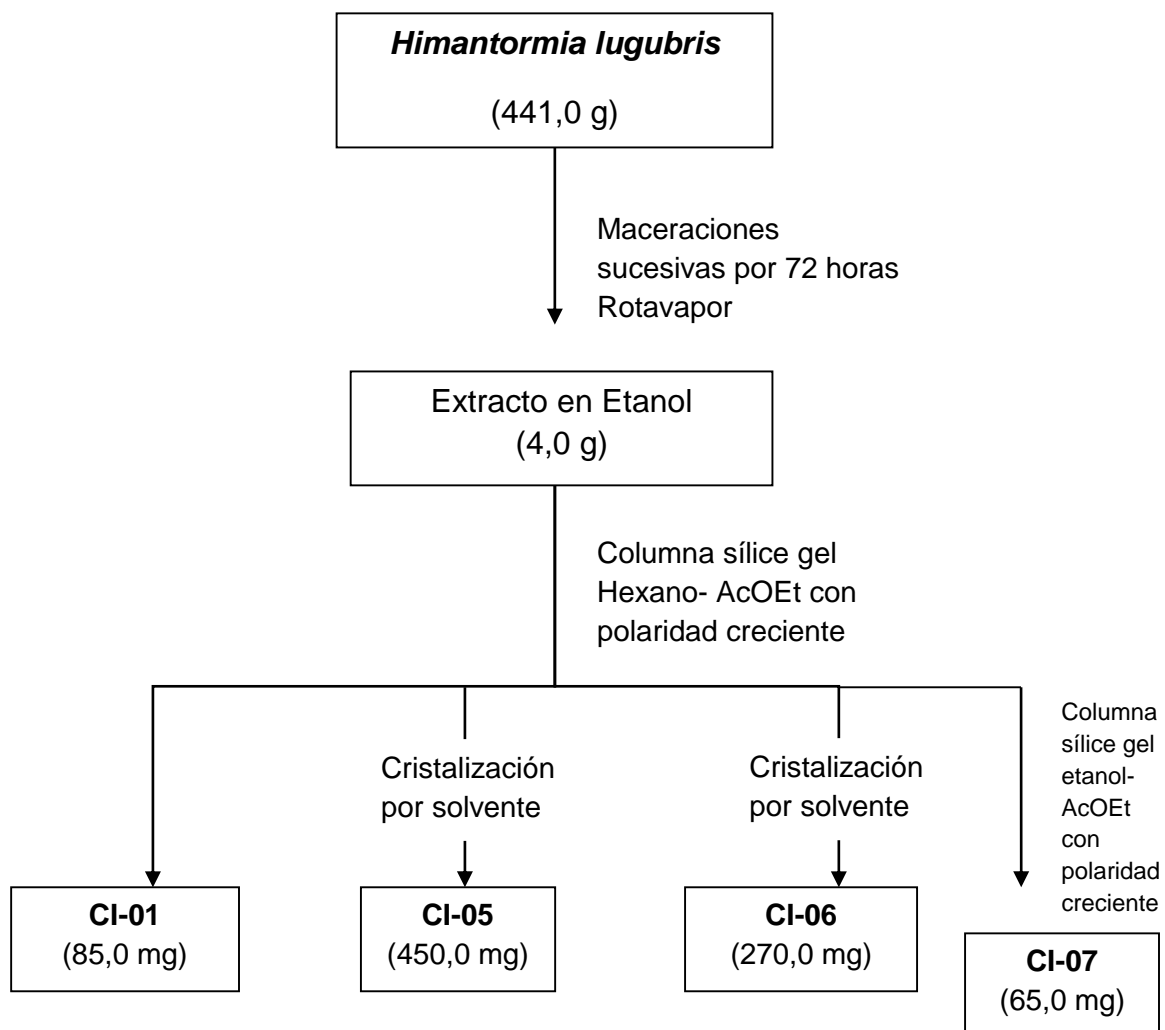
El concentrado de diclorometano (1,64 g) se purificó mediante CC usando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo en polaridad creciente. Se recogieron fracciones de aproximadamente 5ml que fueron agrupadas mediante patrones de similitud según monitoreo por TLC, aislándose 4 compuestos. De las primeras fracciones se obtuvo una mezcla de dos aceites amarillos que, posterior a una nueva separación por CC, fueron rotulados como **CI-01 y CI-04** (287,0 mg y 430,0 mg respectivamente). El tercer producto aislado corresponde a un sólido blanco rotulado como **CI-02** (200,0 mg) que fue purificado mediante cristalización utilizando una mezcla de dietileter/metanol (1:1). El cuarto compuesto corresponde a cristales amarillos en forma de aguja, rotulado como **CI-05** (50,0 mg).

Figura 6. Esquema de separación y purificación de extracto de diclorometano.



➤ **Extracto etanol**

El concentrado de etanol (4,0 g) se purificó mediante CC usando como eluyente una mezcla de hexano-acetato de etilo en polaridad creciente. Cuando se llegó al 100% de polaridad, se utilizó una mezcla de acetato de etilo-etanol con polaridad creciente para seguir eluyendo la columna. Se recogieron fracciones de aproximadamente 5ml que fueron agrupadas mediante patrones de similitud según monitoreo por TLC, aislándose 5 compuestos. De las primeras fracciones se aisló el compuesto rotulado **CI-01** (85,0 mg). El siguiente, en orden creciente de polaridad, fue el compuesto **CI-05** (450,0 mg) purificado mediante cristalización por solvente utilizando una mezcla de dietileter/metanol (1:1). Posteriormente se aisló un sólido amarillo claro, rotulado **CI-06** (270,0 mg) y se purificó por cristalización mediante solvente. Finalmente, en las fracciones eluidas con la mezcla de acetato de etilo- etanol, se obtuvo un sólido de color blanco cristalino rotulado como **CI-07** (65,0 mg). El resto de las fracciones resultó ser una mezcla de compuestos difícil de separar (Fig. 7).

Figura 7. Esquema de separación y purificación de extracto de Etanol.

4.2 Ensayos biológicos: Ensayo colorimétrico sulforodamina B para la detección de citotoxicidad (Vichai & Kirtikara 2006).

Materiales

- Línea celular MCF-7 (cáncer de mama)
- Línea celular PC-3 (cáncer de próstata)
- Medio de cultivo modificado (Dulbecco's Modified Eagle's)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Ácido tricloroacético (TCA) y ácido acético
- Sulforodamina B (SRB)
- Solución trizma base
- Placas de 96 pocillos Orange Scientific®
- Micropipeta multicanal de 200 µl Biopette®.
- Micropipetas Biopette®, modelos p2, p10, p20, p200 y p1000.

Equipos

- Balanza analítica modelo TE 214 S Sartorius®
- Baño termostático Memmert®
- Lector de microplacas modelo ELx808 BioTek®
- Cámara de flujo laminar clase II ESCO®
- Incubadora Memmert®
- Microscopio de fluorescencia invertido motorizado modelo IX 81 Olympus®
- Refrigerador modelo Altus 700 Mademsa®

Procedimientos generales

Condiciones para el cultivo celular

Los cultivos celulares experimentales -células MCF-7 (cáncer de mama) y PC-3 (cáncer de próstata)- se obtuvieron del American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Las células se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) que contiene 10% de suero fetal bovino (FBS), 100UI/mL de penicilina, 100 ug/mL de estreptomicina y 1nM de glutamina. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos con densidades aproximadas de 3000 células/pocillo. Tras la siembra, las placas se mantuvieron a 37°C, 5% CO₂, 95% aire y 100% de humedad relativa durante las 24 horas previas al experimento.

Ensayo de viabilidad celular

El ensayo de sulforodamina B (SRB) fue utilizado de acuerdo a las recomendaciones realizadas por Vichai & Kirtikara (2006). Las líneas celulares se cultivaron en las condiciones normales anteriormente descritas. Los compuestos a evaluar se solubilizaron en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 100-1000 veces la concentración final deseada (0,1M) y se almacenaron a -20°C. Se prepararon cuatro concentraciones para cada uno de los compuestos (100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM) más el control negativo (células cultivadas solo en presencia de DMSO). Posteriormente 10 uL de las

diferentes diluciones de los compuestos se añadieron a los pocillos que tenían 100 uL de DMEM. Las células se fijaron *in-situ* por adición de 25 uL de ácido tricloroacético (TCA) frío 50% p/v (concentración final, 10% TCA) e incubadas durante 60 minutos a 4°C. El medio (sobrenadante) se descartó y la placa fue lavada tres veces por inmersión en agua destilada y luego se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió a cada pocillo 50 uL de solución de SRB al 0,1% en ácido acético 1%, luego las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la tinción con SRB, se realizaron tres lavados con ácido acético 1% y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente el material teñido se solubilizó en 100 uL de solución 10 mM trizma base. La densidad óptica (DO) se midió en un lector de placas de ELISA a 540 nm.

Cálculos

Porcentaje de viabilidad: El análisis de los resultados se expresó como el promedio de los valores de DO y de los valores de desviación estándar (DS), calculados para cada concentración del compuesto evaluado, comparados con el control negativo correspondiente (DMSO). El porcentaje de viabilidad se obtuvo según la fórmula:

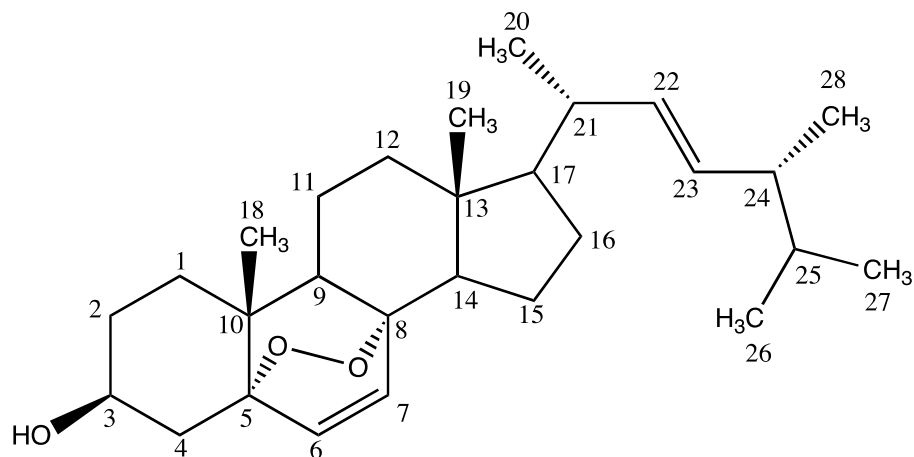
$$\% \text{ viabilidad} = (\text{DO células tratadas} / \text{DO células control}) \times 100.$$

Concentración inhibitoria 50 (IC₅₀): La IC₅₀ (concentración inhibitoria del crecimiento del 50 % de la población celular) de los compuestos puros, se determinó a partir de la construcción de curvas de concentración de compuesto vs % viabilidad celular, obtenidas del promedio de tres experimentos independientes, mediante el software computacional Sigma Plot 10.0.

5. RESULTADOS.

5.1 Metabolitos aislados de *Himantoria lugubris*.

➤ Peroxiergosterol (C₂₈H₄₄O₃)

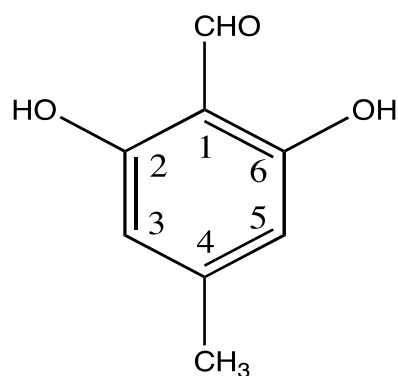


La muestra **CI-02** (200,0 mg) corresponde a un sólido blanco de punto de fusión (mp) 187-188 °C (183-184°C lit. Huneck & Yoshimura 1996), que según los siguientes datos espectroscópicos corresponde a peroxiergosterol (PM: 428.63 g/mol).

¹H- RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 5,57 (1H, d, J= 7,6 Hz); 5,38 (1H, d, J= 7,6 Hz); 5,17-5,21 (2H, m); 3,62 (1H, m); 1,03 (3H, d, J= 6,6 Hz); 0,94 (3H, s); 0,92 (3H, d, J= 3,1 Hz), 0,83 (3H, d, J= 6,4); 0,82 (3H, d, J= 6,5 Hz), 0,62 (3H, s) (Fig. 8).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz) δ: 135.4 (C-6); 135.2 (C-22 o C-7); 132.3 (C-23); 130.71 (C-7 o C-22); 79.4 (C-5 y C-8); 66.4 (C-3); 56.2 (C-17); 51.64 (C-14); 51.0 (C-9); 44.5 (C-13); 42.7 (C-24); 39.7 (C-4); 39.3 (C-1); 36.9 (C-10); 34.7 (C-2); 33.0 (C-25); 30.0 ((C-12); 28.6 (C-16); 23.4 (C-27); 20.8 (C-15 o C-11); 20.6 (C-11 o C-15); 19.9 (C-28 o C-21); 18.1 (C.21 o C-28); 17.5 (C-19); 12.8 (C-18) (Fig. 9)

➤ **Atranol (C₈H₈O₃)**

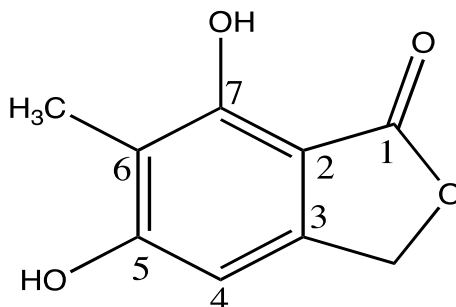


La muestra **CI-05** (500,0 mg) corresponde a cristales amarillos de punto de fusión (mp) 129-130°C (124- 126°C lit. Huneck y Yoshimura 1996) que según los siguientes datos espectroscópicos corresponde a atranol (PM: 152.14 g/mol).

¹H- RMN (CDCl₃, 400 MHz) δ: 10,25 (1H, s, CHO); 6,18 (2H, s, H-3 + H-5); 2,24 (3H, s, CH₃); 2,02 (sa, OH); 1,63 (sa, OH) (Fig. 11).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50 MHz) δ: 193,5 (CHO); 150,7 (C-2 + C-6); 108,5 (C-3 + C-5); 108,1 (C-4); 22,4 (CH₃) (Fig. 12).

➤ **5,7-Dihidroxi-6-metilftalida (C₉H₈O₄)**



La muestra **CI-06** (270,0 mg) corresponde a un sólido amarillo de punto de fusión (mp) 190-194 °C (196-198 °C lit. Huneck y Yoshimura 1996), que según los siguientes datos espectroscópicos corresponde a 5,7-Dihidroxi-6-metilftalida (PM: 180.15 g/mol).

¹H- RMN (MeOD, 400 MHz) δ: 6,44 (1H, s, H-4); 5,17 (2H, s, CH₂); 2,05 (3H, s, CH₃) (Fig. 16)

¹³C-RMN (MeOD, 50 MHz)δ: 174,1 (C-1); 164,9 (C-5); 156,7 (C-7); 148,0 (C-3); 112,4 (C-6); 103,7 (C-2); 101,0 (C-4); 71,1 (CH₂); 7,8 (CH₃) (Fig. 17)

Rendimientos experimentales

Los rendimientos totales obtenidos a partir del peso seco de la muestra inicial, son los siguientes:

Tabla 4 . Rendimientos totales de metabolitos aislados.

Metabolitos	Masa total (g)	Rendimiento (%)
Atranol	0,5000	0,11
5,7-Dihidroxi-6-metilftalida	0,2700	0,10
Peroxiergosterol	0,2000	0,05

Además de los metabolitos descritos, se aislaron tres compuestos que -mediante análisis espectroscópicos- corresponden a dos ácidos grasos y un azúcar. Por tratarse de productos del metabolismo primario, no se continuó con el estudio de identificación de estos compuestos.

5.2 Ensayos de actividad biológica.

➤ Carcinoma de mama (MCF-7)

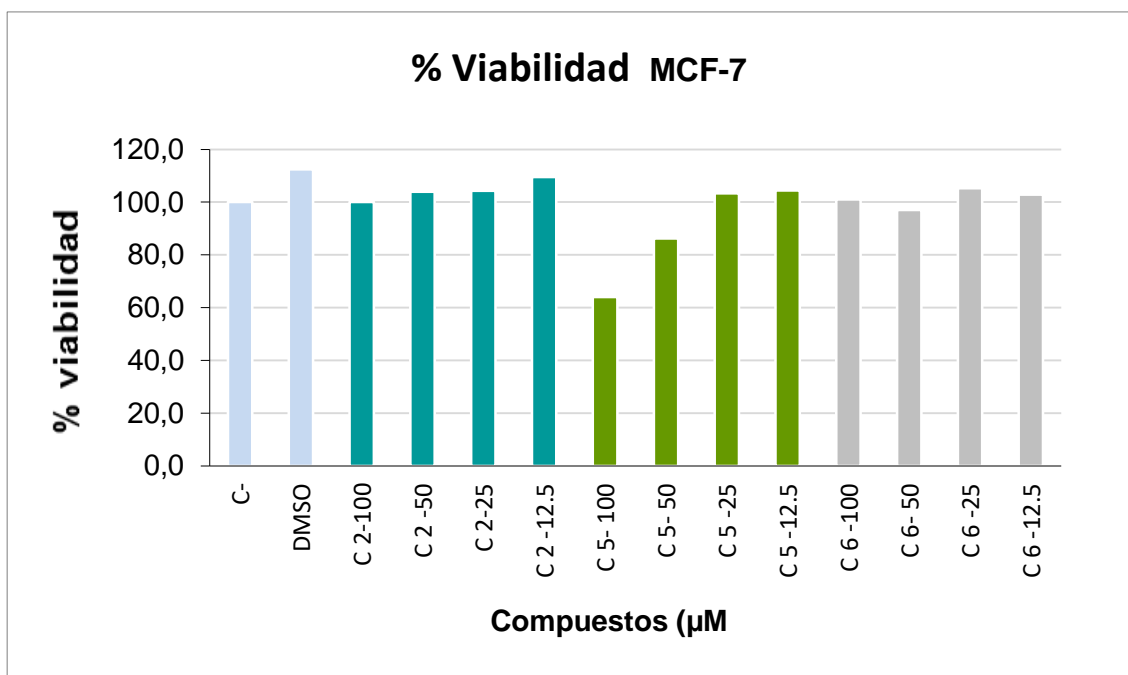


Gráfico 1. Efectos sobre la viabilidad celular de metabolitos secundarios de *Himantormia lugubris* sobre la línea celular carcinoma de mama MCF-7.

Tabla 5. IC₅₀ de metabolitos secundario de *H. lugubris* en línea celular MCF-7.

MCF-7	
Compuesto	IC ₅₀ (µM)
Atranol	> 100
5,7-Dihidroxi-6-metilftalida	> 100
Peroxiergosterol	> 100

➤ Carcinoma de próstata (PC-3)

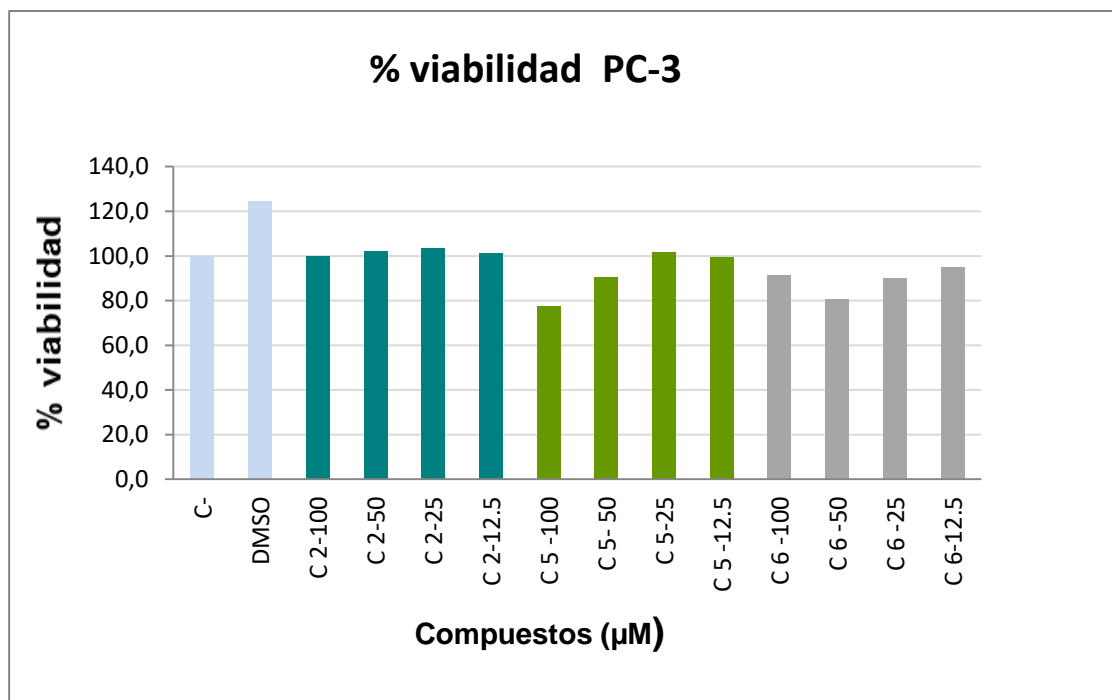


Gráfico 2. Efectos sobre la viabilidad celular de metabolitos secundarios de *Himantormia lugubris* sobre la línea celular carcinoma de próstata PC-3.

Tabla 6. IC₅₀ de metabolitos secundarios de *H. lugubris* en línea celular PC-3.

PC-3	
Compuesto	IC ₅₀ (μM)
Atranol	> 100
5,7-Dihidroxi-6-metilftalida	> 100
Peroxiergosterol	> 100

6. Discusión.

Reportes anteriores sobre la química de *H. lugubris* (Tabla 3) demuestran que no son coincidentes. En el presente trabajo se aislaron los siguientes metabolitos: atranol, 5,7 dihidroxi-6-metilftalida y peroxiergosterol, los cuales no han sido informados anteriormente para la especie.

Estudios previos coinciden en que atranorina es acumulada por *H. lugubris*; sin embargo en la muestra recolectada en enero 2014 se aisló atranol que es considerado por algunos autores como un producto de degradación del dépsido atranorina (Bernard *et al.* 2003) y, por otros, como un producto natural y no un artefacto (Caccamese *et al.* 1986).

Se ha sugerido que las tasas de acumulación de los metabolitos secundarios dependen de su síntesis y degradación, siendo la disponibilidad de luz el factor más importante en el catabolismo de los compuestos (Mateos *et al.* 1991). Dépsidos y depsidonas derivados del orcinol, pueden ser decarboxilados por la enzima orcinol-decarboxilasa producida por el micobionte (Mosbach & Ehrensvar 1986). Es posible que *H.lugubris* acumule atranorina cuya síntesis no se evidenció en la muestra de 2014 y que, en efecto, atranol sea un producto de su degradación. A modo de ejemplo, la evolución de ácido úsnico en talos de *Evernia prunastrii*, bajo condiciones críticas de inanición, sugiere que el metabolito puede ser catabolizado para suplir déficits energéticos, catabolismo asociado a

acetil-CoA que puede ser utilizado en nuevos procesos de síntesis (Vicente 1980); una deshidrogenasa cuya síntesis se inicia con el proceso de estrés nutricional, produce la degradación del ácido úsnico (Estevez *et al.* 1981). Esta hipótesis tiene particular importancia en líquenes antárticos en los cuales la actividad metabólica está severamente restringida en invierno debido a las bajas temperaturas, a los cortos días solares y a la nieve y hielo que cubren la superficie del suelo y de las rocas. La determinación de la variación temporal de la concentración de ácido úsnico en una especie antártica, resultó ser una estrategia atractiva para conocer si este proceso ocurre en una población natural. En individuos de una población de *Usnea aurantiaco-atra*, recolectados mensualmente, en un periodo de tres años, se observó que las tasas de acumulación de ácido úsnico fueron significativamente mayores en los meses de enero a mayo durante el periodo de experimentación. La variación mensual, también estacional, demostraría que el ácido úsnico está siendo degradado en los meses en que el grosor de la cubierta de hielo y nieve supera la profundidad que permite el paso de la luz. Se ha calculado que la radiación que atraviesa una capa de nieve de 30 a 40 cm es de $20\text{-}30 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, suficiente para una fotosíntesis neta positiva (Loch *et al.* 1983). Si el ácido úsnico no es degradado, las concentraciones deberían permanecer más o menos constantes en individuos de una misma población. Los análisis de las temperaturas medias y de las horas sol mensuales indicarían que el factor más importante en la degradación y síntesis del ácido úsnico es la disponibilidad de luz (Quilhot *et al.* 1991, 1992).

5,7 dihidroxi-6-metilftalida es un compuesto que ha sido aislado de *Anamylopsora pulcherrima* (Huneck & Elix 1993) y es el constituyente del esqueleto molecular de varios productos naturales. Las ftalidas sustituidas en los carbonos 5, 6, 7 forman parte de una familia natural de fitotoxinas que poseen una unidad heterocíclica (Jimenez *et al.* 2010). Este compuesto también ha sido aislado de hongos del género *Aspergillus* (Aucamp & Holzapfel 1968; Elix & Joyanthi 1987) y es considerado un potente fungicida (Jimenez *et al.* 2010).

Peroxiergosterol es un endoperóxido importante en la biosíntesis de ergosterol (Gunatilaka *et al.* 1981). Ha sido aislado de hongos, líquenes (Quilhot *et al.* 1989; Piovano *et al.* 1991), esponjas y organismos marinos (Sheikh *et al.* 1974). En líquenes se considera como un compuesto accesorio porque es acumulado por numerosas especies tanto con relaciones taxonómicas cercanas como distantes (Elix 1992). En un estudio químico de 27 especies de líquenes antárticos, 16 especies acumularon peroxi ergosterol (Quilhot & Piovano, com. pers.)

Los resultados químicos de *H. lugubris* en la muestra del 2014, diferentes a los informados previamente, podrían ser la causa de una determinación taxonómica errada; sin embargo las características morfológicas externas son tan conspicuas y coincidentes con las descripciones de Øvstedal & Lewis Smith (2001) que es difícil confundirla con otra especie. Thell *et al.* (2007) en un estudio sobre la filogenia de *Himantormia*, informan que es un género que incluye solo dos especies: *H. lugubris* y *H. deusta* (no presente en Antártica), siendo esta última

notoriamente diferente por su morfología externa y compuestos secundarios acumulados (ácidos protocetárico, fumarprotocetárico, confumarprotocetárico, succinoprotocetárico y estíctico). Una segunda alternativa es que se trate de un quimiotipo o raza química, pero es inubicable en los patrones de variación química propuestos por Elix (1992).

Se evaluó la actividad antineoplásica de los metabolitos aislados sobre las líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7 y carcinoma de próstata PC-3. Los resultados obtenidos revelaron que los compuestos carecen de potencial citotóxico de interés, con $IC_{50} > 100 \mu M$. Según el Instituto Nacional del Cáncer (INC) de Estados Unidos, un compuesto debe exhibir un $IC_{50} < 20 \mu M$ para ser considerado como citotóxico (Bezivin *et al.* 2003).

No se descarta actividad antineoplásica en otras líneas celulares o modelos biológicos para los compuestos aislados. Se ha informado que peroxiesterol, aislado de *Inonotus obliquus*, inhibe el crecimiento de líneas celulares cancerosas, la peroxidación de lípidos, los efectos de inflamación inducida en tumores en piel de rata y, además, es inactivo frente a bacterias gram negativas y gram positivas (Yasukawa *et al.* 1996). Atranol y 5,7 dihidroxi-6-metilftalida presentan en su estructura el cromóforo ortohidroxi-carbonilo, característica común a moléculas fotoprotectoras de radiación UV-A y UV-B aisladas de líquenes (Hidalgo *et al.* 1992; Quilhot *et al.* 1998).

7. CONCLUSIONES.

Mediante métodos macroquímicos se aisló del líquen endémico de Antártica *Himantormia lugubris* (Hue.) I.M. Lamb los compuestos aromáticos atranol (450,0 mg, 0,11%) y 5,7 dihidroxi-6-metilftalida (270,0 mg, 0,10%), metabolitos poco frecuentes en líquenes, y el esteroide peroxi ergosterol (200,0 mg, 0,05%).

Los metabolitos secundarios aislados en la muestra de Enero 2014 no coinciden con aquellos informados anteriormente para la especie.

No se descarta la presencia de atranorina, β -orcinolcarboxilato y de los ácidos barbatólico, úsnico, alectoriálico, hipoalectoriálico y decarboxihipoalectoriálico, los cuales probablemente no fueron detectados debido a las bajas concentraciones en las que se encontrarían en el talo liquénico durante el momento de la recolección.

Los metabolitos secundarios aislados no presentan efecto citotóxico de interés en las líneas celulares de carcinoma de mama MCF-7 y carcinoma de próstata PC-3.

8. REFERENCIAS.

ARMALEO D (1993). Why do lichens make secondary products? XV Int. Bot. Congr., Tokio-Yokohama, Abstr, pp 11.

AUCAMP PJ & HOLZAPFEL CW (1968). The constitution of nidulol (5-hydroxy-7-methoxy-6 methylphthalide), a metabolic product of *Aspergillus nidulans*. J. South African Chem. Institute, 21: 26-32.

BERNARD G, GIMÉNEZ-ARNAU E, RASTOGI S (2003). Contact allergy to oak moss: search for sensitizing molecules using combined bioassay-guide chemical fractionation, GC-MS, and structure-activity relationship analysis. *Arch. Dermatol. Res.* 295: 229-235.

BEZIVIN C, TOMASI S, DEVEHAT F & BOUSTIE J (2003). Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. *Phyton.* 10: 499–503.

CACCAMESE S, COMPAGNINI A, TOSCANO RM & CASCIO O (1986). Methyl β -orcinoilcarboxilate and atranol from the lichen *Stereocaulon vesivuanum*. *J. Nat. Prod.* 49: 1159-1160.

CHOUDHARY M, AZIZUDDIN LALIL S & ATTA-UR-RAHMAN (2005). Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen *Usnea longissimi*. *Phytochemistry.* 66: 2346-2350.

COCCHIETO M, SKERT N, NIMIS P & SAVA G (2002). A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwiss.* 89: 137-146.

CONNOLLY JD & HILL RA (1991). Dictionary of Terpenoids di- and higher terpenoides. Chapman & Hall, London.

CUELLAR M, QUILHOT W, RUBIO C, SOTO C, ESPINOZA L & CARRASCO H (2008). Phenolics, depsides and triterpenes from the Chilean lichen *Pseudocyphellaria nudata* (Zahlbr.) D.J. Galloway. J. Chil. Chem. Soc. 53:1624.

CULBERSON CF, CULBERSON WL & JOHNSON A (1977). Second Supplement to Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. Am. Bryol. Lichenol. Soc. Missouri Botanical. Garden, St. Louis.

DAVIES J, WANG, TAYLOR T, WARABI K, HUANG X & ERSEN R (2005). Uncialamycin, a new enediyne antibiotic. Organ. Lett. 7: 5233-5236.

ELIX JA & JOYANTHI VK (1987). Synthetic confirmation of the structure of the lichen benzyl-ester, alectorialic and barbatolic acids. Austr. J. Chem, 40: 1841-1850.

ELIX JA (1992). Lichen chemistry. Flora of Australia. 54: 97-101.

ELIX JA (1996). Biochemistry and secondary metabolites. En: T.H. Nash III (ed.) Lichen Biology, pp: 154-180. Cambridge University Press.

ESTÉVEZ MP, LEGAZ ME, OLMEDA L, PEREZ FJ & VICENTE C (1981). Purification and properties a new enzyme from *Evernia prunastri*, wich reduces L-usnic acid. Z.Naturforsch., Teil C, 36:35-39.

FARRAR JF (1976). The lichen as an ecosystem: observation and experiment. En: DH Brown, DL Hawksworth & RH Bailay (eds), pp: 385-406. London, Academic Press.

GALLOWAY DJ (1998). The lichens of Chile: present knowledge and future prospects. En: MP Marcelli & MRD Seaward (eds.). Lichenology in Latin America: history, current knowledge and applications, pp: 87-100. CETESB, Sao Paulo.

GUNATILAKA A, GOPICHAND Y, SCHMITZ FJ & DJERASSI C (1981). Minor and trace sterols in marine invertebrates. 26. Isolation and structure elucidation of nine new 5a,8a-epidiox sterols from four marine organisms. J. Org. Chem. 46: 3860-3866.

GUZMAN G, QUILHOT W & GALLOWAY DJ (1990). Decomposition of species of *Pseudocyphellaria* and *Sticta* in a southern Chilean forest. Lichenologist 22: 325-331.

HIDALGO ME, FERNANDEZ E, QUILHOT W & LISSI EA (1992). Solubilization and photophysical and photochemical behavior of depsides and depsidones in water and Brij-35 solutions at different pH values. J. Photochem. Photobiol. Chem. 67:245-254.

HUNECK S & FOLLMANN G (1966). Zur Chemie Chilenischer Flechten. X. Über die Inhaltsstoffe von *Himantormia lugubris* (Hue) Lamb, *Polycauliona regalis* (Wain). Hue und *Thamnolecania gerlachei* (Wain). Gyeln. Z. Naturforsch. 21b: 91-92.

HUNECK S (1973). Nature of lichen substances. En: V Ahmadjian & M Hale (eds.) The lichens, pp: 495-522. Academic Press, New York & London.

HUNECK S & ELIX JA (1993). The chemistry of the lichens *Anamylopsora pulcherrima* and *Tephromela armeniaca*. *Herzogia*. 9: 647-651.

HUNECK S & YOSHIMURA I (1996). Identification of lichen substances. Springer-Verlag Berlín, Heildelberg, New York.

HUNECK S (1999). The significance of lichen and their metabolites. *Naturwissen*. 8: 559-564.

INGÓLFSDÓTTIR K, CHUNG G, SKÚLASON V, GISSURARSON S & VILHELMSDÓTTIR M (1998). Antimycobacterial activity of lichen metabolites *in vitro*. *Eur. J. Pharm. Sci.* 6: 141–144.

JIMÉNEZ R, MALDONADO LA & SALGADO-ZAMORA H (2010). Synthesis of demethylated nidulol via an intramolecular Michael reaction. *N. Prod. Res.* 24: 1274-1281.

LAMB IM (1964). Antarctic lichens. I. The genera *Usnea*, *Ramalina*, *Himantormia*, *Alectoria*, *Cornicularia*. *British Antarc. Surv.Scient. Reports*, No 38, 1-70 +9 plates.

LAUTERWEIN M, OETHINGER M, BELSNER K, PETERS T & MARRE R (1995). *In vitro* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (1)-usnic acid, & (2)-usnic acid against aerobic and anaerobic. *Microorganisms. Antim. Agen. Chem.* 39: 2541–2543.

LAWREY JD (1986). Biological role of lichen substances. *Bryologist* 92:236.

LÖSCH R, KAPPEN L & WOLF A (1983). Productivity and temperature biology of two snowbed Bryophytes. *Polar Biol.* 1: 243-248.

LONGTON RE (1988). *Biology of polar bryophytes and lichens.* Cambridge University Press.

MATEOS JL, CONDE E, MIRANDA T & VICENTE C (1991). Regulation mechanisms of phenolic production in the lichen *Himantormia lugubris*, as deduced from analysis of metabolites accumulation. *Plant Sci.* 77: 1-9.

MERILLON JM & RAMAWAT KG (2007). Biotechnology for medicinal plants: research need. En: KG Ramawat & JM Merillon (eds.) *Biotechnology secondary metabolites plants and microbes*, pp: 1-20. Sience publishers: Enfields (NH), Jersey, Plymouth.

MOSBACH K (1973). Biosynthesis of lichen substances. En: V Ahmadjian & M Hale (eds.). *The lichens*, pp: 523-542. Academic Press, New York & London.

MOSBACH K & EHRENSVARD U (1966). Studies on lichen enzymes. Part I. Preparation and properties of a depside hydrolyzing esterase and of orsellinic acid decarboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 22:145-150.

MÜLLER K (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *App. Microb. Biotech.* 56: 9-16.

NASH III TH (1996). Photosynthesis, respiration, productivity and growth. En: TH Nash III (ed.) Lichen biology, pp: 88-121. Cambridge University Press.

OKUYAMA E, UMEYAMA K, YAMAZAKI M, KINOSHITA Y & YAMAMOTO Y (1995). Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. Plant. Med. 61: 113-15.

ØVSTEDAL DO & LEWIS SMITH RI (2001). Lichens of Antártica and South Georgia. Cambridge University Press, pp: 1-411.

PERRY N, BENN M, BRENNAN N, BURGESS E, ELLIS G, GALLOWAY DJ, LORIMER S & TANGNEY R (1999). Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. Lichenology 31: 627–636.

PIOVANO M, GARBARINO JA, CHAMY MC, ZUÑIGA V, MIRANDA C, CÉSPEDES E, FIELDLER P, QUILHOT W & ARAYA G (1991). Studies on Chilean lichens. XVI. Secondary metabolites from Antarctic lichens. Ser. Cient. INACH. 41: 79-90.

PURVIS W (2000). Lichens. Life Series. The Nat. Hist. Mus. London.

QUILHOT W, GARBARINO JA, PIOVANO M, CHAMY MC, GAMBARO V, OYARZÚN ML, VINET C, HORMAECHEA V & FIEDLER P (1989). Studies of Chilean lichens, XI. Secondary metabolites from Antarctic lichens. Ser. Cient. INACH. 39: 75-89.

QUILHOT W, PEÑA W, FLORES E, HIDALGO ME, FERNÁNDEZ E & LIEGHTON G (1991). Temporal variation of usnic acid concentration in *Usnea aurantiaco-atra* (Jaq.). Bory. Ser. Cient. INACH. 41: 99-106.

QUILHOT W, HIDALGO ME, FERNÁNDEZ E, PEÑA W & FLORES E (1992). Posible rol biológico de metabolitos secundarios en líquenes antárticos. Ser. Cient. INACH. 42: 53-59.

QUILHOT W, FERNÁNDEZ E, RUBIO C, HIDALGO ME, GODDARD M, GALLOWAY DJ (1996). Preliminary data on the accumulation of usnic acid related to ozone depletion in two Antarctic lichens. Ser. Cient. INACH. 46: 105-111.

QUILHOT W, FERNÁNDEZ E, RUBIO C, HIDALGO ME, GODDARD M (1998). Lichen secondary products and their importance in environmental studies. En: M Marcelli and R.D.H Seaward (eds.) Lichenology in Latin America, history current knowledge and application, pp: 171-179. CETESB, Sao Paulo.

QUILHOT W, RUBIO C Y FERNÁNDEZ E (2007a). Lichens Products. En: KG Ramawat & J Merillon (eds.) Biotechnology secondary metabolites plants and microbes, pp: 391-415. Science Publisher, Enfield (NH), Jersey, Plymouth.

QUILHOT W, RUBIO C, CUELLAR M (2007b). Comparative studies between the lichen flora from Chile and Antarctic. Biblioth. Lichenol. 93:479-488.

RAMAWAT KG (2007) Secondary plant products in nature. En: KG Ramawat & JM Merillon (eds.) Biotechnology Secondary Metabolites Plants and Microbes, pp: 21-57. Science publishers: Enfield (NH), Jersey, Plymouth.

ROMAGNI JG & DAYAN FE (2002). Structural diversity of lichen metabolites and their potential use. En: R Kupadhyay (ed.) Advances in microbial toxin research and its biotechnological exploitation, pp: 151-169. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.

RUBIO C, FÉRNANDEZ E, HIDALGO ME, QUILHOT W (2002). Effects of solar UV-B radiation in the accumulation of rhizocarpic acid in lichen species from alpine zones of Chile. Bol. Soc. Chil. Quím. 47:67-72.

SAMARI L (2011). Antioxidantes de los líquenes *Stereocaulon strictum* (*Stereocaulaceae*) y *Lobariella pallida* (*Lobariaceae*) y determinación de su potencial citotoxicidad. Tesis doctoral Facultad de Ciencias, Facultad de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

SHEIKH YM & DJERASSI C (1974). Steroids from sponges. Tetrahedron. 30: 4095-4103.

SILVA M, BITTNER M, HOENEISEN M, BECERRA J, CAMPOS V, GONZÁLES F, CÉSPEDES C, MARAMBIO O (1992). Química de los triterpenos. Secretaria General de la OEA, Organización Regional del Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington D.C.

THELL A, STENROOS S, FEUERER T, KÄRNEFELT I, MYLLYS L & HYVÖNEN J (2002). Phylogeny of cetrarioid lichens (*Parmeliaceae*) inferred from ITS and b-tubulin sequences, morphology, anatomy and secondary chemistry. *Mycol. Progress.* 1: 335-354.

THELL A, FEUERER T, KÄRNEFELT I, MYLLYS L & STENROOS S (2004). Monophyletic groups within the *Parmeliaceae* indentified by ITS rDNA, b-tubulin GAPDH sequences. *Mycol. Progress.* 3: 297-314.

THELL A, SØCHTING U, KÄRNEFELT I, ELIX JA & SANCHO LG (2007). Phylogeny of *Himantormia* - an Antarctic genus in the *Parmeliaceae* (lichenized ascomycetes). *Biblioth. Lichenol.* 95: 531-541.

VICENTE C, RUIZ JL & ESTÉVEZ MP (1980). Mobilization of usnic acid in *Evernia prunastri* under critical conditions of nutrient availability. *Phyton.* 39:15-20.

VICHAI V & KIRTIKARA K (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protocols.* 1: 11-12.

YASUKAWA K, AKIHISA T, KANNO H, KAMINAGA T, IZUMIDA M, SAKOH T, TAMURA T & TAKIDO M (1996). Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biol. Pharm. Bull.* 19: 573-576.

9. ANEXOS.

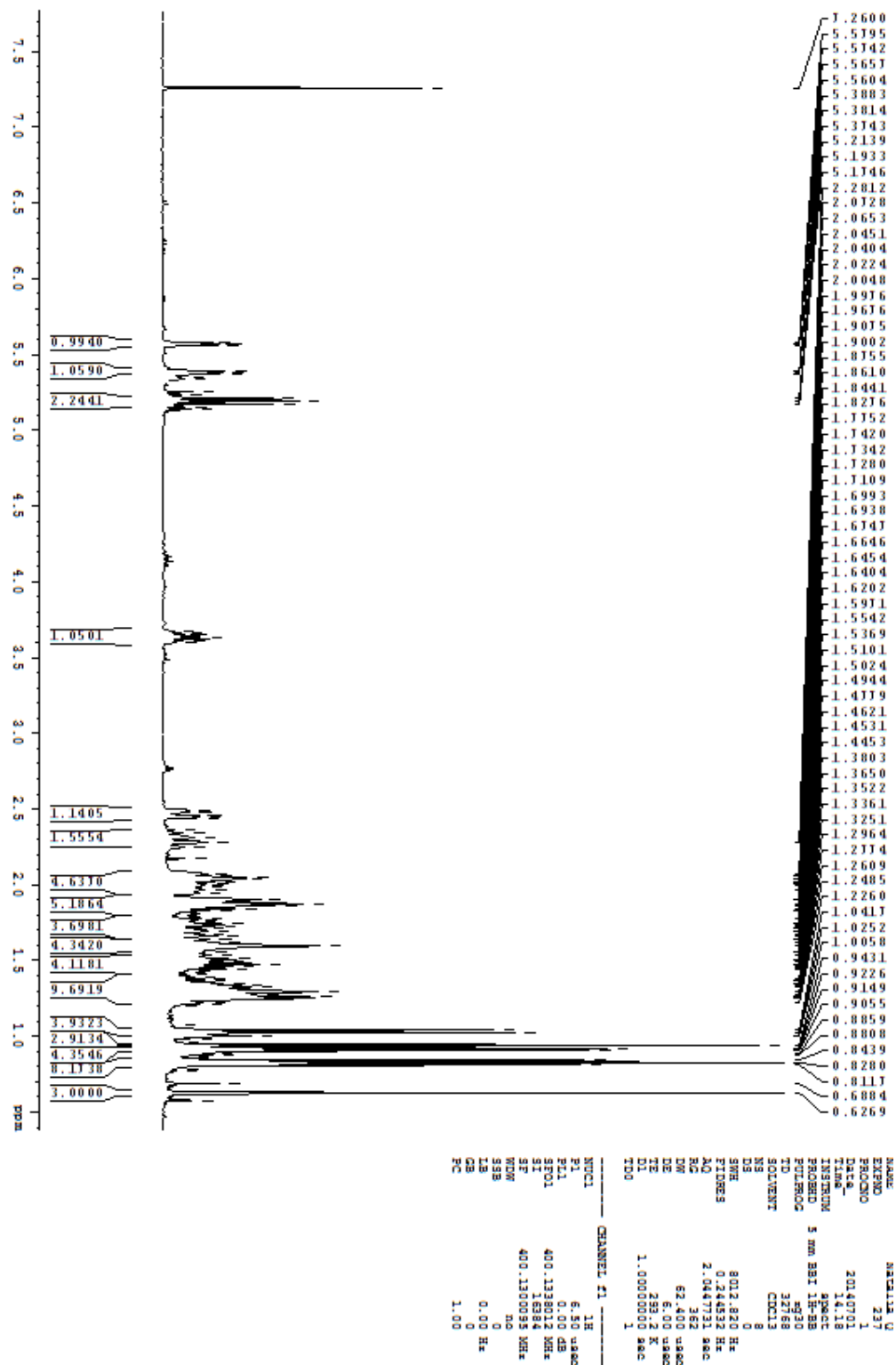


Figura 8. Espectro ^1H RMN peroxiesterol (CI-02)

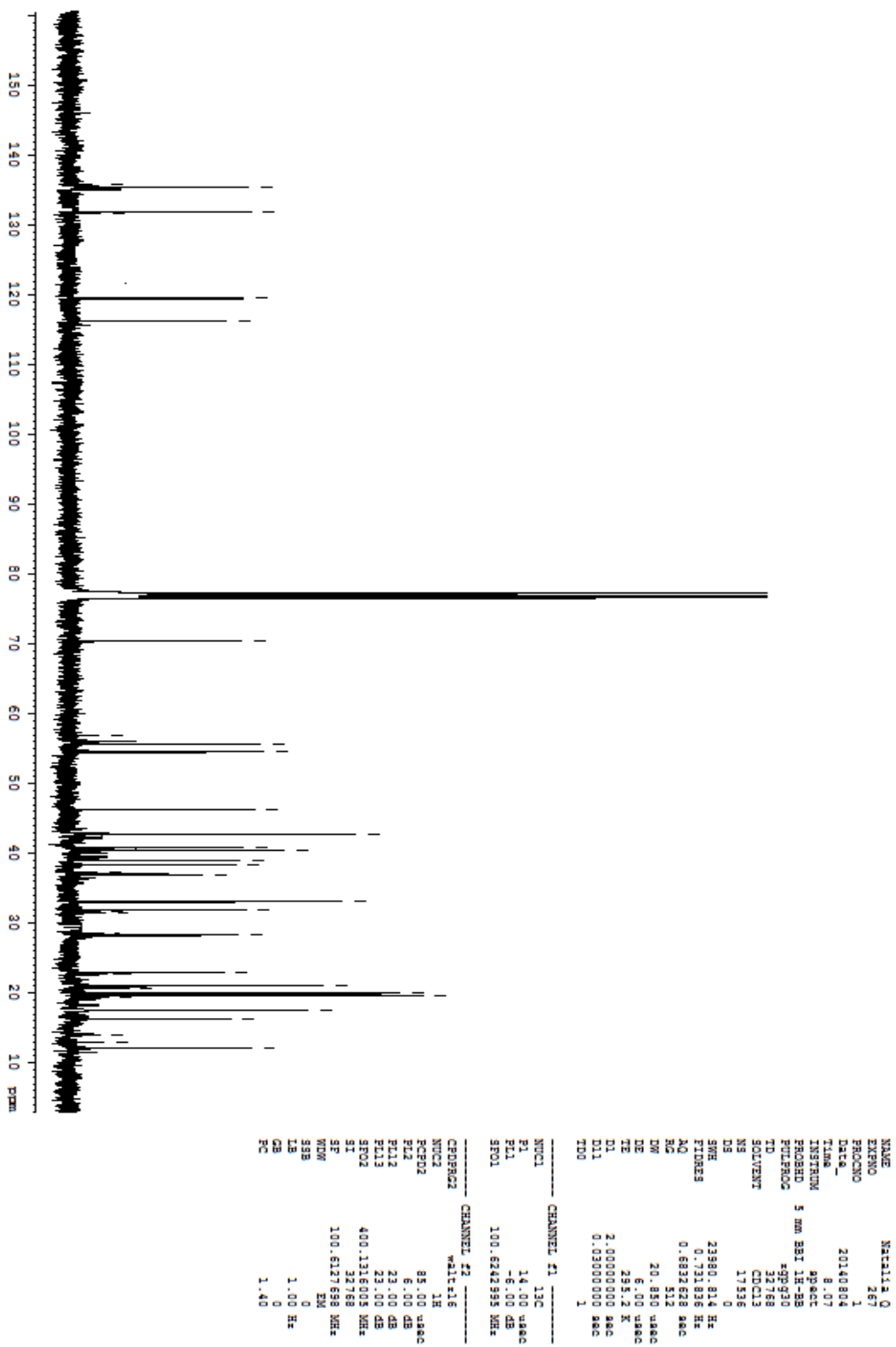


Figura 9. Espectro ^{13}C RMN peroxisterol (CI-02)

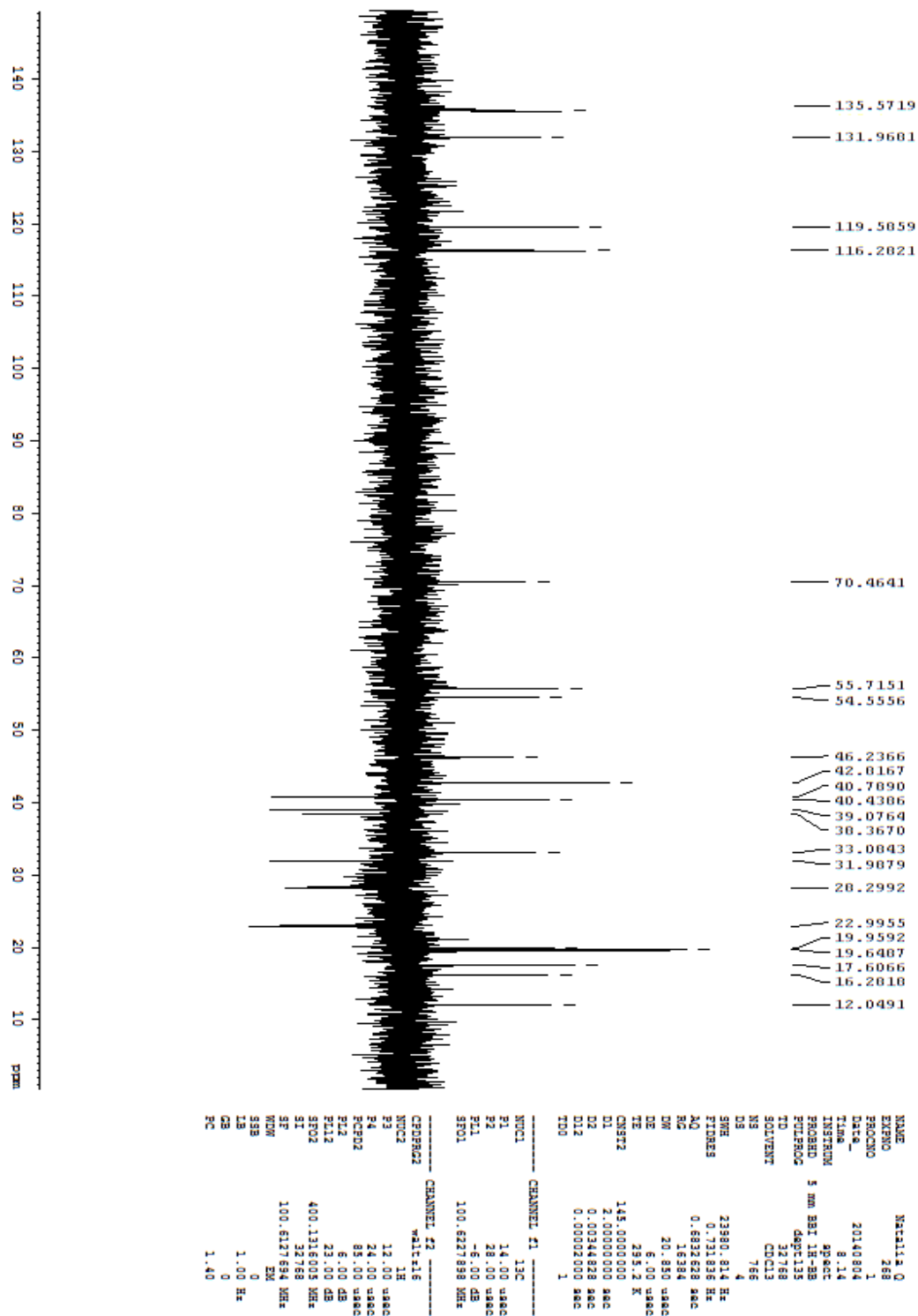


Figura 10. Espectro DEPT-135 peroxiergosterol (CI-02)

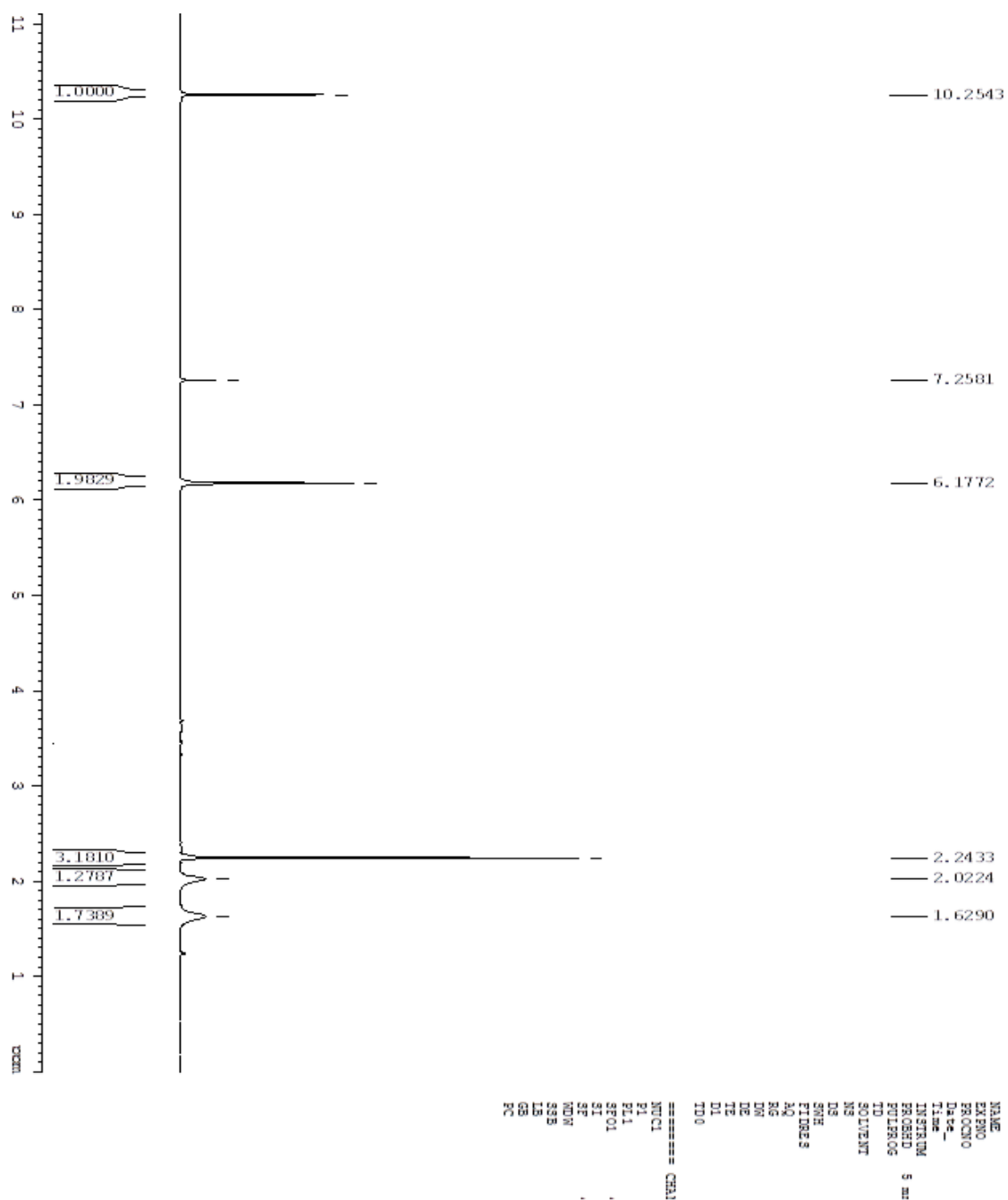


Figura 11. Espectro ¹H-RMN atranol (CI-05)

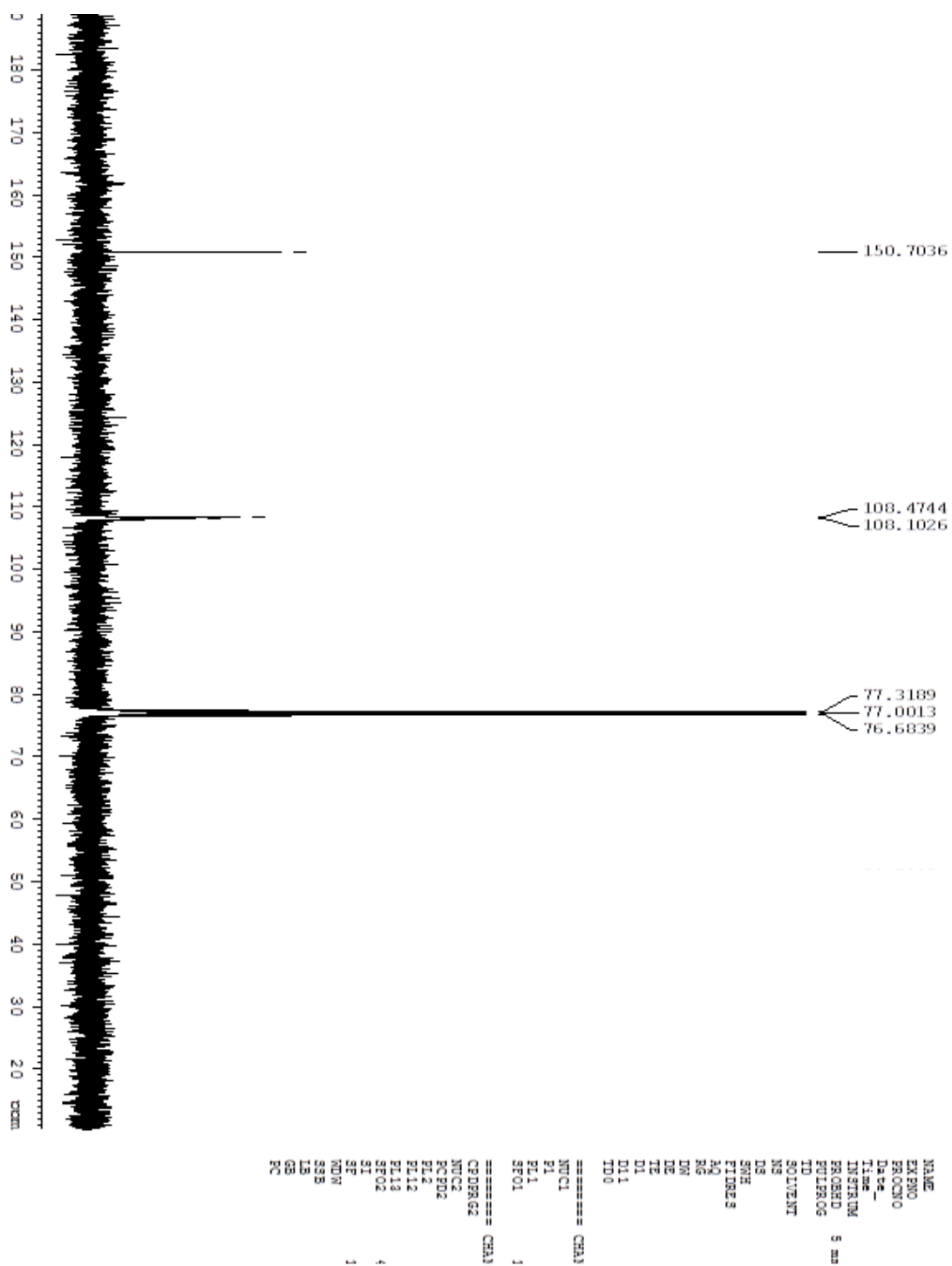


Figura 12. Espectro ^{13}C RMN atranol (CI-05)

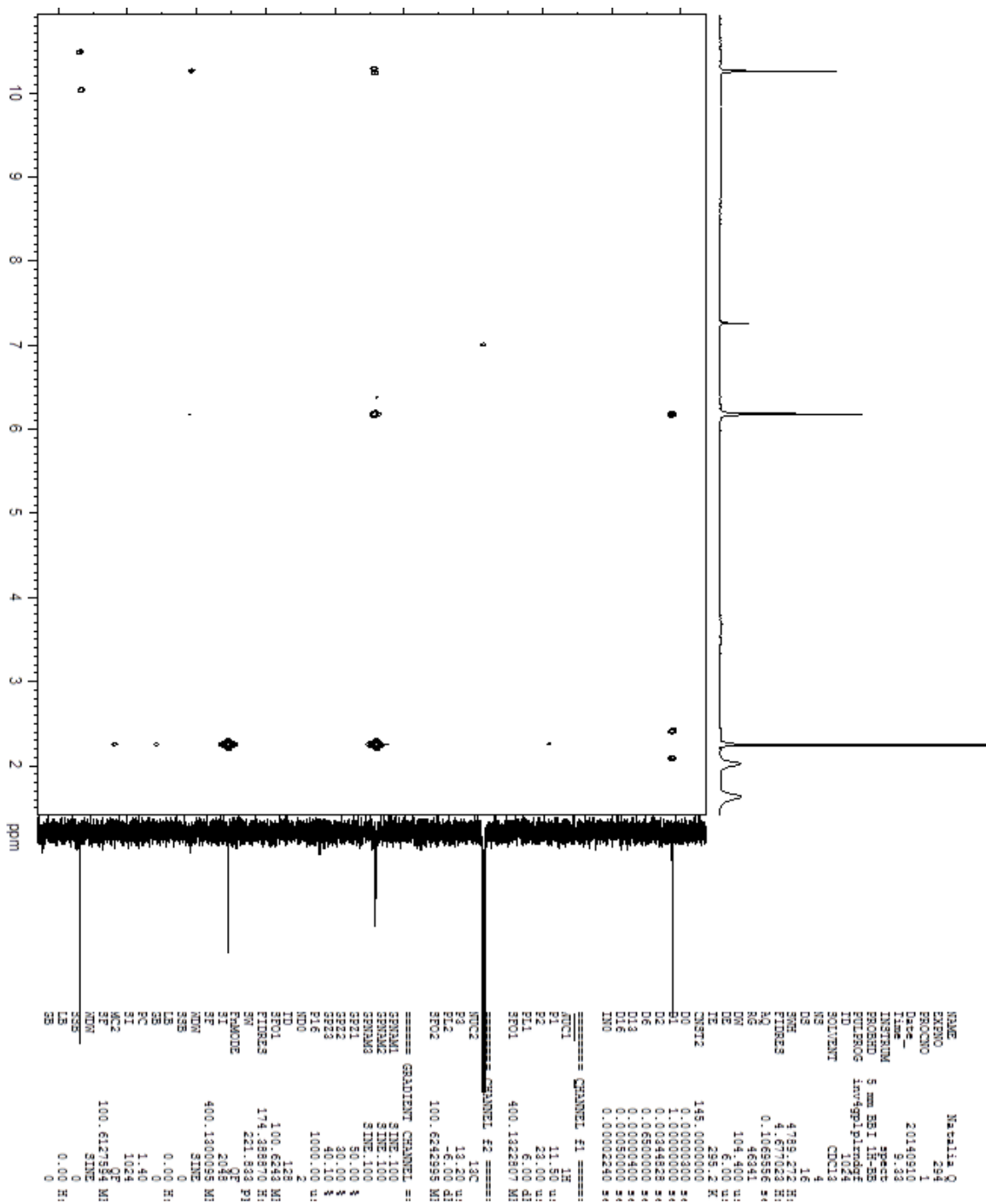


Figura 14. Espectro HMBC atranol (CI-05)

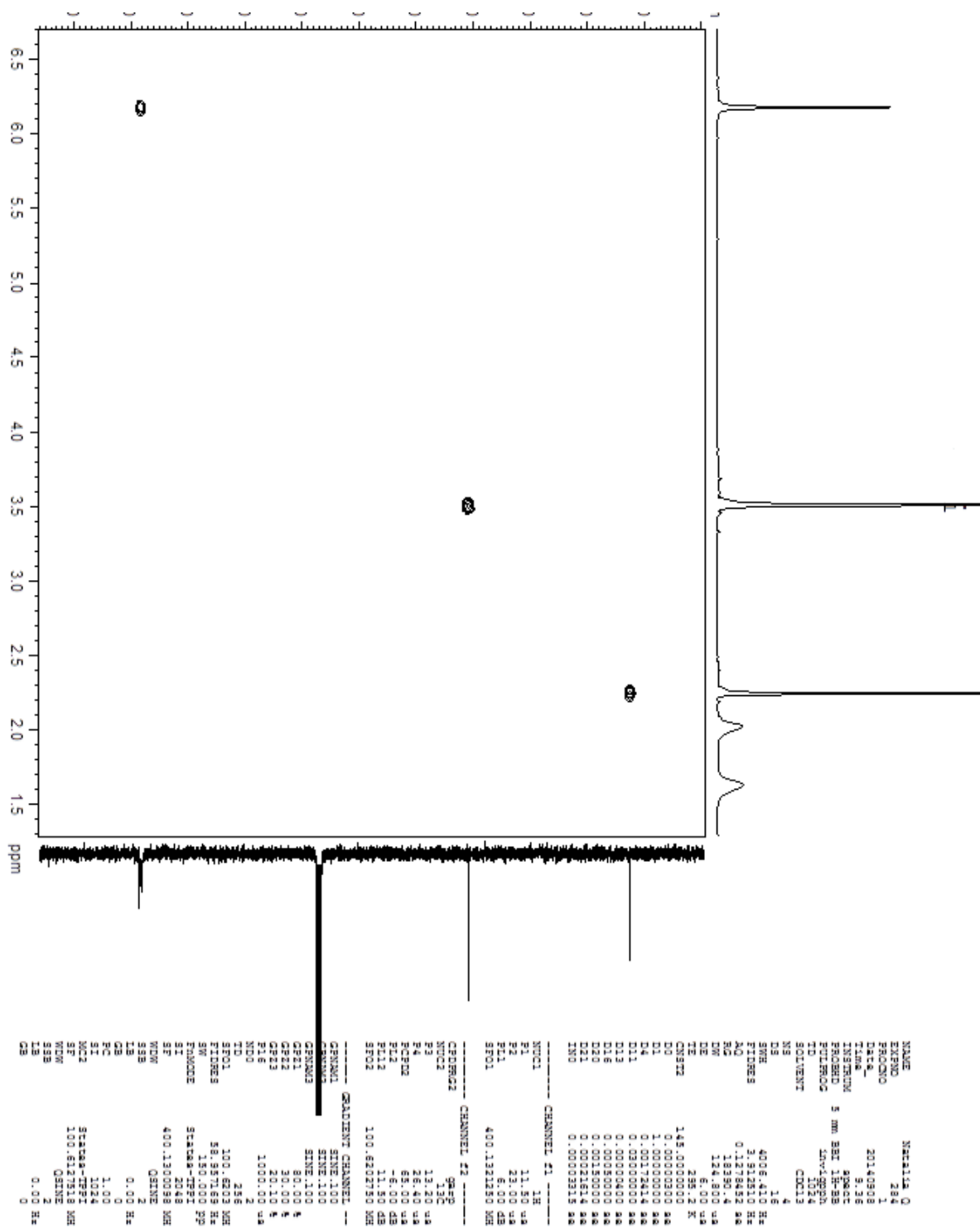


Figura 15. Espectro HSQC atranol (CI-05)

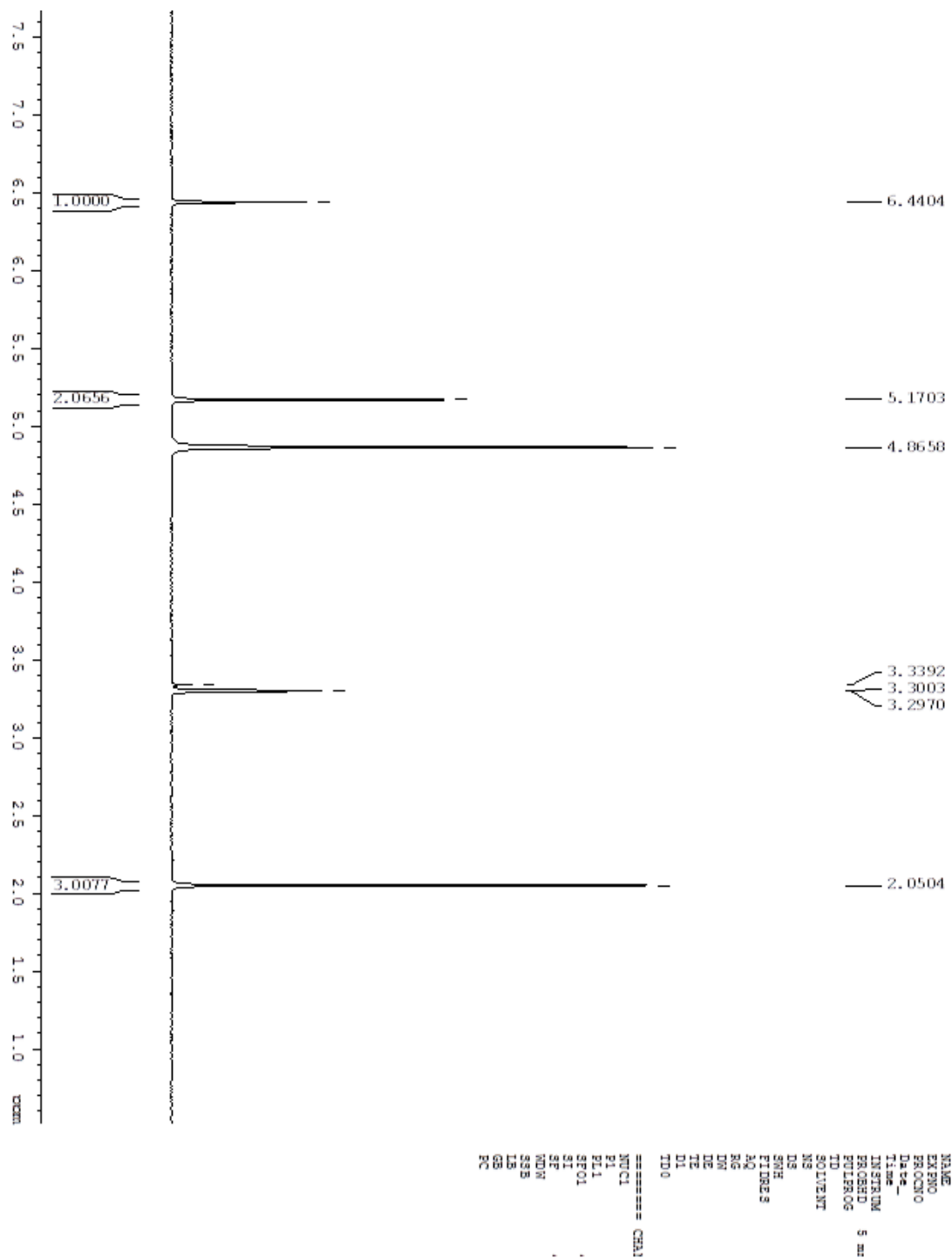


Figura 16. Espectro $^1\text{HRMN}$ 5,7-dihidroxi-6-metilftalida (CI-06)

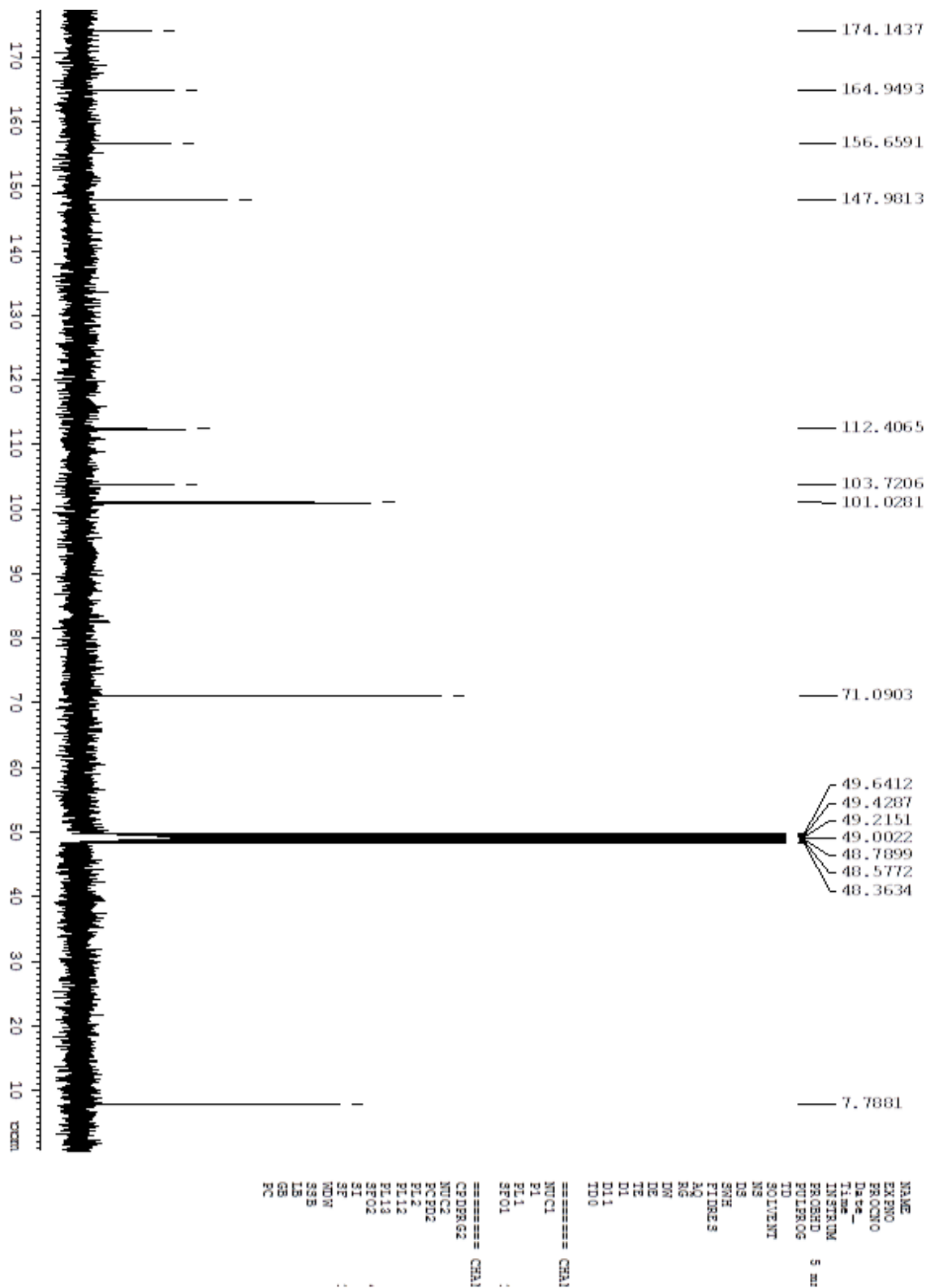


Figura 17. Espectro ^{13}C RMN 5,7-dihidroxi-6-metilftalida (CI-06)

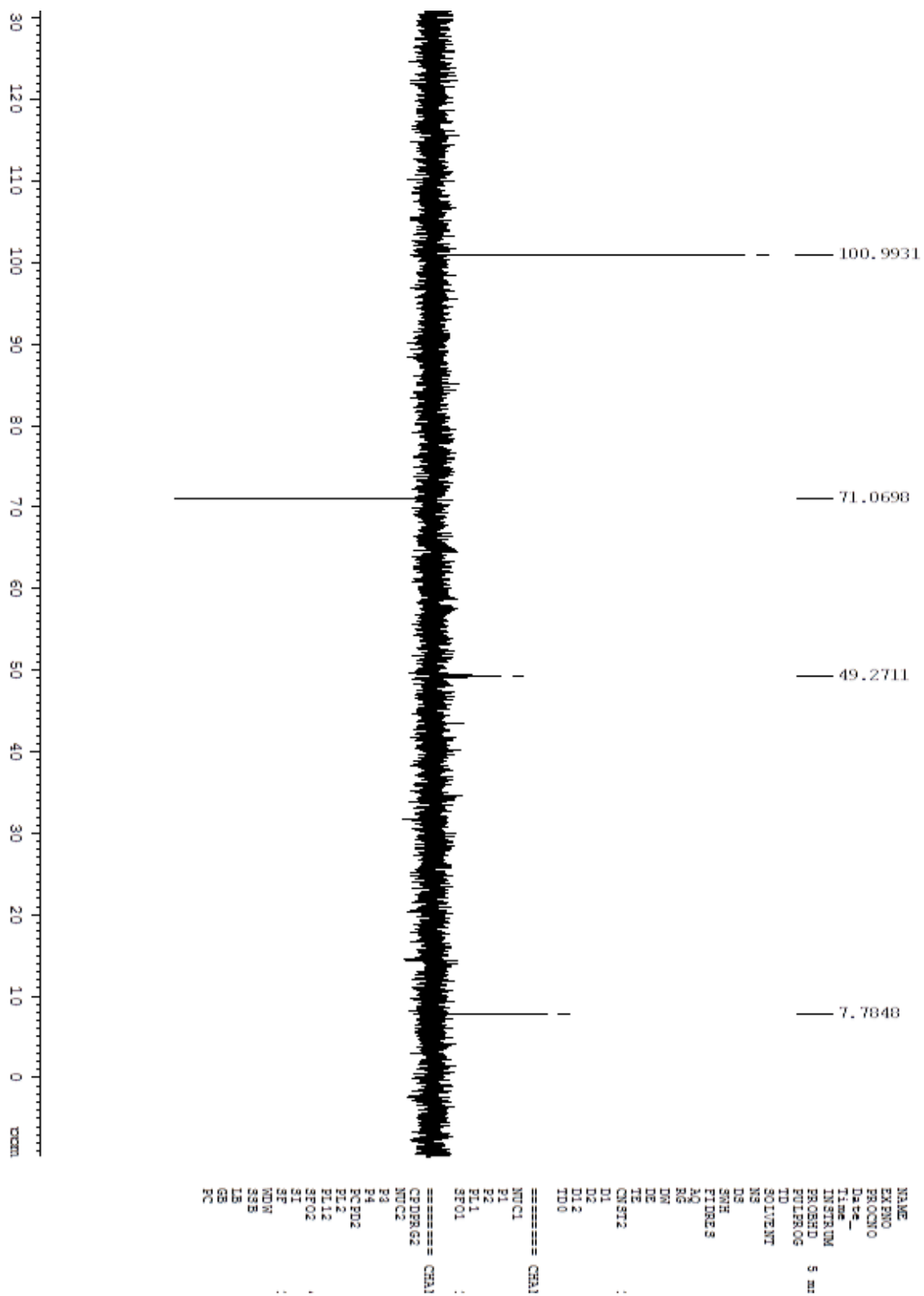


Figura 18. Espectro DEPT-135 5,7-dihidroxi-6-metilftalida (CI-06)

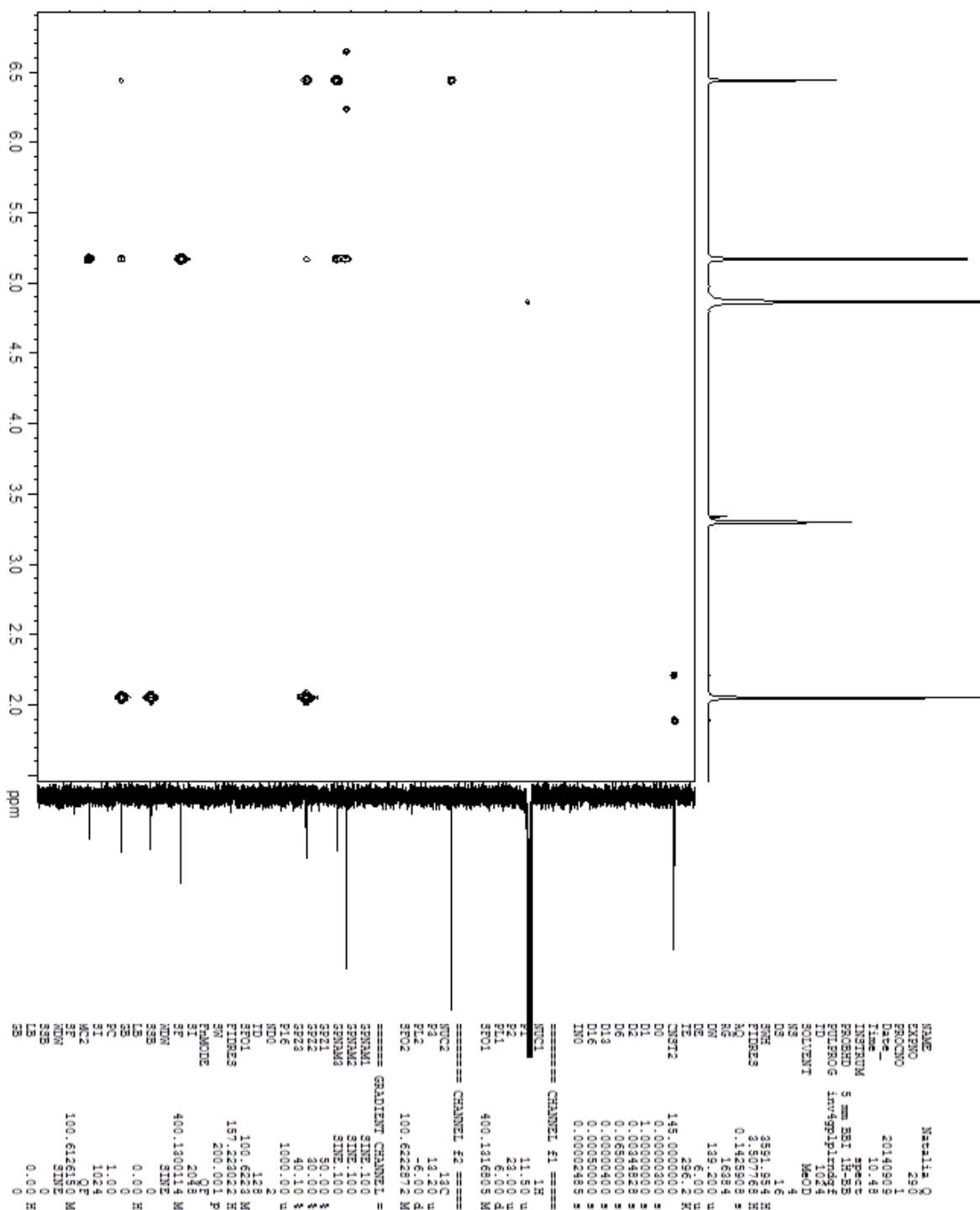


Figura 20. Espectro HMBC 5,7-dihidroxi-6-metilftalida (CI-06)