



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias Químicas
Escuela de Bioquímica y Farmacia

**Estudio fitoquímico de liquen *Thamnozia vermicularis* (Sw.) Ach. ex Schaer)
presente en la provincia del Azuay.**

Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico

Autoras:

Jessica Valeria Cabrera Romero
C.I. 0104992763
Elizabeth del Carmen Vargas Espinoza
C.I. 1104696305

Directora:

Dra. María Elena Cazar Ramírez
C.I. 0602243800

Cuenca, Ecuador

2018



RESÚMEN

En el presente trabajo se estudia al líquen *Thamnolia vermicularis*, presente en la Provincia del Azuay, como fuente de compuestos antimicrobianos y antifúngicos.

La recolección de especímenes del líquen estudiado se realizó en el Parque Nacional Cajas, sector Tres Cruces. La identificación taxonómica fue realizada con la asesoría del Blgo. Fredy Nugra (Universidad del Azuay).

La biomasa líquénica, previamente seca y pulverizada, fue utilizada para la obtención de extractos en solventes de polaridad creciente: hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, mediante extracción por Soxhlet. Se analizó el patrón de separación de los extractos obtenidos en Cromatografía en Capa Fina (CCF). Las cromatografías con mejor separación se utilizaron para el ensayo de bioautografía, orientado a evaluar el potencial antimicrobiano de los grupos de compuestos separados cromatográficamente. Para comparar los factores de retención de los compuestos presentes en los extractos de *T. vermicularis* con los reportados en metabolitos de líquenes por Culberson *et al.* (1972) se desarrollaron CCF en condiciones descritas en el trabajo de referencia.

Los ensayos de actividad antimicrobiana se desarrollaron ante las bacterias patógenas a humanos *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* y los hongos ambientales *Penicillium crysogenum* y *Aspergillus fumigatus*. Se comparó la capacidad antimicrobiana de bioautografías con el ensayo de difusión en agar con extractos totales. Se evidenció una moderada actividad antimicrobiana de extractos de *T. vermicularis*, versus inactividad de las bioautografías desarrolladas. Estos resultados sugieren que los compuestos producidos por el metabolismo del líquen en estudio deben su actividad antimicrobiana a estrategias de sinergismo, ya que la separación cromatográfica conduce a la inactividad del extracto.

Palabras clave: *Thamnolia vermicularis*, líquenes, actividad antimicrobiana, cromatografía



ABSTRACT

The present work focuses on the study of lichen *Thamnolia vermicularis*, present in Azuay Province, as a source of antimicrobial and antifungal compounds.

Species of lichen under study were collected at Cajas National Park, Tres Cruces. The taxonomic identification was carried out with the support of Blgo. Freddy Nugra (Universidad del Azuay).

Previously dried and pulverized lichen biomass was submitted to extraction, by means of Soxhlet method. Solvents of increasing polarity were used for this purpose: hexane, chloroform, ethyl acetate, and methanol. The separation pattern of the extracts obtained in Thin Layer Chromatography was analyzed. The best separation chromatographs were used for bioautography test, aimed to evaluate the antimicrobial potential of the chromatographically separated compounds. To compare the retention factors of the compounds present in the extracts of *T. vermicularis* with those reported by Culberson et al. for secondary metabolites present in lichens, thin layer chromatography was developed under conditions described in the reference work.

The antimicrobial activity tests were carried out towards the bacteria *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomona aeruginosa* and the fungi *Penicillium crysogenum* and *Aspergillus fumigatus*. The antimicrobial capacity of bioautographs was compared with the agar diffusion assay using organic extracts. A moderate antimicrobial activity of the extracts from *T. vermicularis*, was displayed, versus the inactivity of the bioautographs. These results suggest the antimicrobial activity may be owed to synergism strategies, since the chromatographic separation leads to the inactivity of the extract.

Palabras clave: *Thamnolia vermicularis*, lichens, antimicrobial activity, chromatography.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESÚMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	13
CAPÍTULO I	15
MARCO TEÓRICO	15
1.1. Líquenes: definición y morfología	15
1.2. Talo: morfología y anatomía	17
1.3. Tejidos de los Líquenes	20
1.4. Reproducción de los líquenes	21
1.5. Productos bioactivos aislados del metabolismo secundario de líquenes	21
1.5.1. Compuestos liquénicos	24
1.6. Usos y aplicaciones de los líquenes	26
1.7. <i>Thamnozia vermicularis</i> , generalidades morfológicas.	28
1.7.1. Características para identificación en terreno	28
1.7.2. Características morfológicas	29
1.7.3. Propiedades y usos de <i>Thamnozia vermicularis</i>	30
1.8. Cromatografía en Capa Fina como estrategia para el seguimiento de la producción de metabolitos secundarios de líquenes	31
1.9. Bioensayos de actividad antimicrobiana	31
1.9.1. Técnica de difusión en agar	31
1.9.2. Bioautografía	32
CAPITULO II	33
METODOLOGÍA	33
2.1. Descripción de la zona de recolección de material de estudio	33
2.2. Colección de especímenes	33
2.3. Preparación de extractos	34
2.3.1. Tratamiento de biomasa liquénica	34
2.3.2. Solventes usados para la extracción	34
2.3.3. Obtención de Extractos orgánicos por método Soxhlet	35
2.4. Cromatografía en capa fina (CCF)	36
2.4.1. Materiales para Cromatografía en Capa Fina	36



2.4.2.	Cromatografía en capa fina para desarrollo de Bioautografías	36
2.4.3.	CCF para identificación de componentes de los extractos de <i>T. vermicularis</i> por comparación de factores de retención (Rf).	38
2.5.	Ensayos biológicos “in vitro” para actividad antimicrobiana	40
2.5.1.	Microorganismos de prueba	40
2.5.2.	Preparación de medios de cultivo	40
2.5.3.	Inoculación de placas con microorganismos de prueba	41
2.5.4.	Actividad antimicrobiana de extractos totales de <i>Thamnia vermicularis</i>	41
2.5.5.	Actividad antifúngica	42
CAPITULO III		45
RESULTADOS Y DISCUSIONES		45
3.1.	Resultados	45
3.1.1.	Identificación de especímenes de <i>T. vermicularis</i>	45
3.1.2.	Rendimiento de obtención de extractos	45
3.1.3.	Análisis de Patrones Cromatográficos y comparación con valores reportados en Literatura	46
3.1.4.	Actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de <i>T. vermicularis</i>	48
3.2.	Discusiones	49
CONCLUSIONES		52
RECOMENDACIONES		53
ABREVIATURAS		54
GLOSARIO		55
BIBLIOGRAFÍA		60
ANEXOS		65



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Jessica Valeria Cabrera Romero en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Estudio fitoquímico del líquen *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. Ex Schaer) presente en la provincia del Azuay**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 04 de enero 2018

Jessica Valeria Cabrera Romero

C.I: 0104992763



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Elizabeth del Carmen Vargas Espinoza en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**Estudio fitoquímico del líquen *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. Ex Schaer) presente en la provincia del Azuay**", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 04 de enero 2018

Elizabeth del Carmen Vargas Espinoza

C.I: 1104696305



Cláusula de Propiedad Intelectual

Jessica Valeria Cabrera Romero , autora del trabajo de titulación "**Estudio fitoquímico del líquen *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. Ex Schaer** presente en la provincia del Azuay", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 04 de enero 2018

Jessica Valeria Cabrera Romero

C.I: 0104992763



Cláusula de Propiedad Intelectual

Elizabeth del Carmen Vargas Espinoza, autora del trabajo de titulación “Estudio fitoquímico del líquen *Thamnolia vermicularis* (Sw.) Ach. Ex Schaer) presente en la provincia del Azuay”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 04 de enero 2018

Elizabeth del Carmen Vargas Espinoza

C.I: 1104696305



DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia por el cariño y confianza que me brindan en todo momento, pero sobre todo por estar, cada uno a su manera, respaldándome para alcanzar mis objetivos.

A mis padres, porque ellos siempre estuvieron apoyándome, en especial a mi mami Betty quien estuvo siempre a mi lado brindándome su mano amiga dándome a cada instante una palabra de aliento para llegar a culminar mi profesión, apoyándome hasta el final, quería verme terminando mi carrera, y lo logré, pero gracias a ella

Por estas y muchas más razones siempre estaré agradecida con ella, gracias a ella hoy soy lo que soy.

A mis compañeros y amigos presentes y pasados, quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas y todas aquellas personas que durante toda mi vida universitaria estuvieron a mi lado apoyándome y lograron que este sueño se haga realidad.

Jessica



DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado principalmente a Dios, por darme la sabiduría y la fortaleza para poder culminar una etapa más de mi vida.

A mis padres Bertila y César por ser mis guías permanentemente, por haberme dado su apoyo en todo momento, por haber confiado siempre en mí y por el esfuerzo que realizaron día a día para que no me falte nada y pueda continuar con mis estudios.

A mis hermanos por su apoyo incondicional y por haberme brindado su apoyo en los momentos que más lo necesitaba. A mis sobrinos que con sus sonrisas y abrazos alegran mi vida. A mis amigas que me apoyaron en momentos difíciles para seguir hasta el final. Gracias a todos por sus consejos y apoyo.

Elizabeth Vargas



AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecemos a la facultad de Ciencias Químicas por habernos aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar nuestra carrera, así como también a los diferentes docentes que nos brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

Un agradecimiento muy especial a nuestra tutora de tesis, Dra. María Elena Cazar por su esfuerzo y dedicación.

Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para el desarrollo de nuestra tesis.

A su manera, ha sido capaz de ganarse nuestra lealtad y admiración, así como sentirnos en deuda con ella por todo lo recibido durante el periodo de tiempo que ha durado esta tesis.

Nuestro agradecimiento también va dirigido al Blgo. Fredy Nugra Salazar docente de la Universidad del Azuay, por su valioso e imprescindible asesoramiento en la obtención del liquen y transmitirnos sus conocimientos, y a todas las personas que de una u otra manera apoyaron a culminar este trabajo.

Jessica C.

Elizabeth V.



INTRODUCCIÓN

Desde el principio, el ser humano ha demostrado tener una estrecha relación con la naturaleza, y con ello, una constante curiosidad por descubrir la complejidad de sus reinos, sus interacciones y las relaciones que permiten el desarrollo de la vida. Así, hasta el día de hoy se continúan realizando estudios cada vez más especializados para conocer las propiedades de plantas, microorganismos y sus interacciones; y sus beneficios para los diferentes campos de la medicina, la industria, la ecología, entre otros.

Los líquenes constituyen asociaciones simbióticas entre algas o cianobacteria (fotobiontes) y un hongo (micobionte), donde el micobionte domina dicha asociación. Por este motivo, los líquenes se clasifican dentro del Reino Fungi (Vaillant, 2014). De ahí que, esta asociación permite que se produzcan una serie de metabolitos que podrían ser útiles para el ser humano debido a su capacidad antimicrobiana, antioxidantes, antivirales, anticancerígenas, antígenotóxicas, antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. (Raankovié, 2015)

Los extractos liquénicos reportan “propiedades antibióticas, efectivos contra el ataque de microorganismos (bacterias Gram +, Gram - y muchos hongos), lo que explica que el hombre los haya usado con efectividad como remedios naturales contra enfermedades”. (Illana, 2012)

Hasta la fecha, se han descubierto más de 800 metabolitos secundarios de líquenes, estos se han utilizado para muchas investigaciones referentes a aplicaciones fitoquímicas y farmacéuticas. (Raankovié, 2015)

Dada la variedad de pigmentos producidos por especies de líquenes, estas especies pueden ser utilizadas como fuente de colorantes. De acuerdo con Cleodaris (2016), la primera tintura de tornasol usada en química para la determinación de pH fue obtenida a partir de líquenes.

En la medicina tradicional, los líquenes han sido usados por culturas de regiones templadas y árticas, para el tratamiento de heridas, trastornos de la piel, problemas respiratorios, digestivos, obstétricos y ginecológicos. El registro de uso terapéutico de



líquenes comienza en los siglos XV y XVI y surge de las recuperaciones. (Kosanié, 2015)

Actualmente, el estudio de la biodiversidad debe enfocarse a valorar y generar conocimiento sobre especies que fomenten el desarrollo sustentable. En este contexto, las investigaciones de especies de líquenes como fuente de compuestos bioactivos generan una línea base de conocimiento enfocado en sus propiedades benéficas y potencial como especie productoras de metabolitos bioactivos.

En esta investigación se exploró el potencial del líquen *Thamnolia vermicularis*, presente en la Provincia del Azuay, como fuente de compuestos bioactivos.

Para lograr este objetivo se obtuvieron extractos orgánicos de *T. vermicularis* y se estudiaron sus perfiles cromatográficos mediante cromatografía en capa fina. Además se evaluó el potencial antimicrobiano de extractos orgánicos del líquen en estudio, ante dos hongos y dos bacterias objetivo.

Los resultados obtenidos evidenciaron el potencial de *Thamnolia vermicularis* como fuente de compuestos inhibidoras del crecimiento de microorganismos.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Líquenes: definición y morfología

Los líquenes son hongos (Reino Fungi) que viven en simbiosis con algas (Reino Protista) o cianobacteria (Reino Mónera), estos hongos son denominados micobiontes y producen sus esporas al interior de una célula especializada que se llama asco.

El micobionte es, en la mayor parte de los casos, el encargado de formar la estructura del líquen también llamada talo. El alga que entra a formar parte de los líquenes se denomina fotobionte y realiza la fotosíntesis. (Amo de Paz & Burgaz, 2009). Las diferentes capas de posiciones del talo son respuestas adaptativas de la asociación liquénica al ambiente (Vernon, 1993).

Los líquenes son organismos que no poseen movilidad propia en ninguna parte de su ciclo de vida, por lo que sus esporas se dispersan por medio del viento o la lluvia, no tienen tejidos verdaderos, sus talos están formados por “un conjunto de células originadas de una espora y que al dividirse forman una hifa (filamento de células fúngicas), el conjunto de hifas forma una masa denominada micelio” (Cabrera & Giacobone, 2007).

La taxonomía de los líquenes se ha basado tradicionalmente en sus características morfológicas y anatómicas. Es por ello que, de acuerdo con Amo de Paz y Burgaz (2009), los líquenes según la morfología del talo, se dividen en seis tipos o biotipos que constituyen diversas formas de crecimiento.

1. **Líquenes fruticulosos**, están adheridos al sustrato por un punto o pie (disco basal) y crecen de forma perpendicular a la superficie donde se asientan.
2. **Líquenes foliáceos**, el talo es una lámina que crece paralela al sustrato y es fácilmente separable con ayuda de una navaja.
3. **Líquenes gelatinosos**, son aquellos talos de color negro y aspecto foliáceo o ligeramente fruticuloso en estado deshidratado, que cuando se hidratan se hinchan notablemente y se presentan muy blandos al tacto.

4. **Líquenes crustáceos**, están fuertemente unidos al sustrato y no pueden desprenderse sin romper una parte del medio en el que crecen. Hay los que crecen en la madera (epifleódicos) y los que crecen en rocas (saxícolas).
5. **Líquenes escuamulosos**, están formados por fragmentos independientes (escuámulas) cuyo margen no está unido al sustrato.
6. **Líquenes de talo compuesto**, aquellos líquenes constituidos por dos tipos diferentes de talo: uno primario, generalmente escuamuloso y otro secundario fruticuloso (Burgaz, 2009).

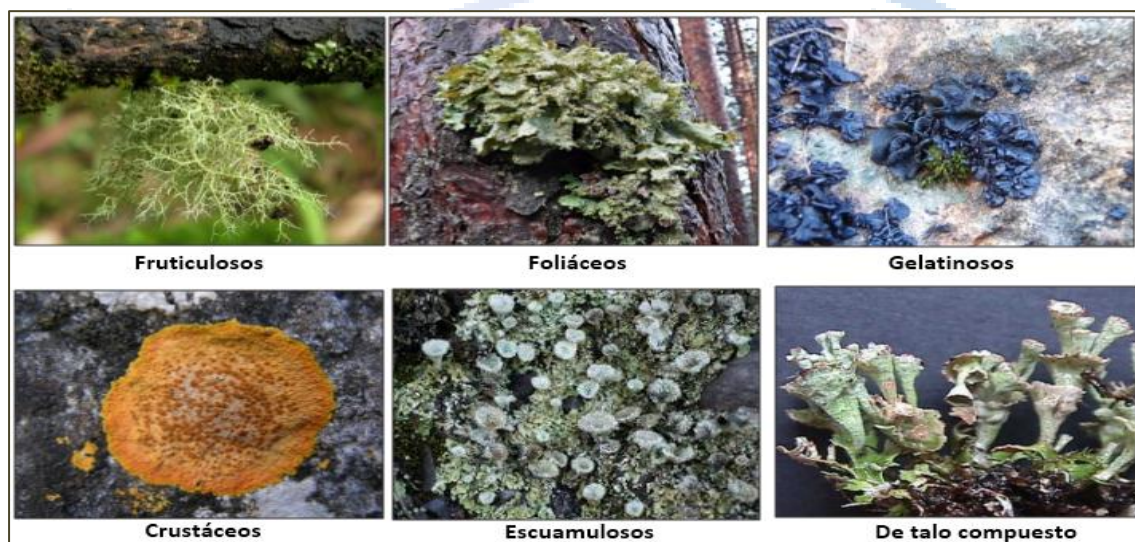


Fig. 1. Clasificación de los líquenes según la morfología del talo
Fuente: Waste Magazine, 2007

Por su parte, Cabrera y Giacobone (2007) clasifican a los líquenes en tres tipos según la morfología del hongo, considerando que los líquenes varían según la especie, colores, o tipos de sustratos donde se encuentran; así tenemos:

1. **Costrosos o crustáceos:** (que tienen forma de costra) son aquellos líquenes que poseen la zona o córtex inferior, fuertemente adherida al sustrato y en toda o la mayoría de su superficie.
2. **Folioso:** (que tiene forma de hoja) posee bordes extensos y ampliamente lobulados. Tienen una forma de hoja de papel mojada, en donde el córtex inferior está adherido solo en algunas partes del sustrato.

3. **Fruticoso o fruticuloso:** son talos ramificados erguidos o pendientes con forma de pequeños arbustillos muy largos. Su parte adherida está a unos pocos milímetros (Cabrera & Giacobone, 2007).



Fig 2. Clasificación de los líquenes según la morfología del hongo (Geocities, 2016).

En general, los líquenes son una combinación de por lo menos un hongo y una alga o cianobacteria (alga verde azulada). Hoy se conoce que en esta simbiosis se pueden involucrar más de tres organismos. La formación del cuerpo del liquen, es decir, el talo, es diferente de los organismos que le dan origen morfológico, fisiológica y bioquímicamente. Este ha sido uno de los grandes enigmas de la naturaleza (Chaparro & Aguirre, 2002).

1.2. Talo: morfología y anatomía

La anatomía del talo consiste en falsos tejidos llamados también plecténquimas, los cuales están formados de cierto tipo de células, que se derivan de células de hifas fúngicas, mediante entrelazamiento, anastomosis, ramificación o agregación de las hifas (Vaillant, 2014).

Según su hábitat y morfología los talos de los líquenes exhiben una amplia variedad morfológica que se extiende desde los tipos rudimentarios hasta los altamente diferenciados. “Como respuesta a la unión que se establece entre los simbiosites y al papel predominante que juega el componente fúngico dentro de la morfogénesis, son llamadas también formas de crecimiento o biotipos y representan adaptación al medio” (Chaparro & Aguirre, 2002).

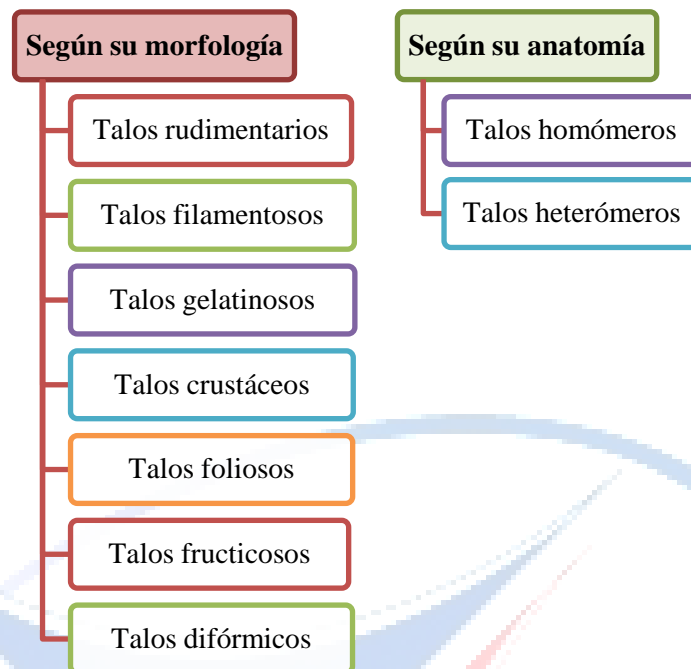


Fig 3 Clasificación de los talos según su morfología y anatomía
Fuente: (Chaparro & Aguirre, 2002)

➤ Tipos de talo según su morfología:

Talos rudimentarios (sorediados -granulosos leproides): se desarrollan sobre paredes o rocas, suelos, cortezas de árboles y musgos. Color amarillo o verde limón.

Talos filamentosos: se encuentra rodeado por el hongo a manera de red laxa o corticada; tienen apariencia de pelo.

Talos gelatinosos: se caracteriza por tener consistencia gelatinosa en estado húmedo, con un alto grado de hidratación y deshidratación alternativa. En estado seco se presenta como gránulos negros; la coloración en estado húmedo va desde verde oliva hasta gama de grises.

Talos crustáceos: se caracteriza por unión íntima con el sustrato. Teniendo en cuenta el tipo de sustrato y su relación con el mismo se destacan los líquenes endolíticos que viven en el interior de las rocas y los endofleódicos que viven dentro de la corteza de los árboles. De acuerdo con la relación que establece con el sustrato adoptan formas variadas:

- **Indeterminados:** no presentan límites definidos y se confunden con el sustrato.



- **Determinados:** poseen los bordes más claros o más oscuros.
- **Figurados:** poseen el talo radiante lobulado, los lóbulos marginales están laxamente ligados al sustrato.
- **Areolados:** se puede dar por dos vías: la primera por agrupamiento de pequeñas áreas definidas que se van desarrollando sobre el prótalo y luego se van compactando hacia las partes viejas del mismo.

Talos foliosos: formados por lóbulos aplanados, son heterómeros y ocasionalmente homómeros, con o sin corteza inferior. Poseen crecimiento marginal; crecen sobre sustratos variados y se diferencian dos tipos:

- **Laciniados:** se adhieren al sustrato en casi toda su extensión por medio de sus estructuras de fijación y permiten su separación con mayor o menor grado de dificultad. Presentan una amplia variabilidad en coloración, consistencia, forma, lobulación y tamaño
- **Umbilicados:** presentan el talo en forma de disco y se adhieren al sustrato solamente por la parte central, por una estructura a manera de ombligo.

Talos fruticosos: tiene forma de pequeños arbolitos ramificados en menor o mayor grado, en forma de hebra o correa. Son heterómeros con simetría radial, macizos o huecos (talo cilíndrico). O heterómeros con simetría dorsiventral (talo aplanado).

Talos dimórficos: están constituidos por un talo horizontal (talo primario) adherido al sustrato y otro vertical que lleva los cuerpos fructíferos (talo secundario). El talo horizontal puede ser crustáceo.

➤ Tipos de talo según su anatomía:

Homómeros: poseen talos simples o poco diferenciados. Anatómicamente el alga se encuentra irregularmente distribuida. Son capaces de absorber gran cantidad de agua y retenerla en la gelatina gonadial por lo tanto su consistencia y apariencia cambia siendo gelatinosos.

Heterómeros: tienen una anatomía estratificada y en los que el fotobionte se encuentra localizado en un nivel determinado. Pueden poseer una simetría dorsiventral (foliosos) (Chaparro & Aguirre, 2002).



1.3. Tejidos de los Líquenes

Una de las características más sobresalientes de los tejidos de los líquenes es su capacidad para diferenciar plecténquimas variados y especializados, en la respuesta a las condiciones eco - fisiológicas en las cuales se desarrollan.

Las células se dividen solamente por un solo plano formando cadenas de células hifales. En estos plecténquimas las hifas pueden estar en contacto una con otras formando agregados de hifas, firmemente cementadas, pobremente entrecruzadas o unidad por anastomosis en determinados sitios. Según el grado de contacto entre las hifas, la individualidad de la hifa puede ser evidente o no (Chaparro & Aguirre, 2002).

La estructura de desarrollo de los tejidos liquénicos depende varios factores:

- Forma de las células.
- Tipo de contacto entre ellas (puede haber adherencia mutua entre las hifas, con mayor o menor grado de gelatinización de sus paredes y anastomosis a través de poros).
- Dirección de crecimiento y orientación (con relación a la superficie o a una con otras; periclinal o anticlinal, paralela, en malla o red).
- La ramificación más común de las hifas en los tejidos liquénicos es en ángulo agudo. El mayor grado de complejidad de estos tejidos se observa en los líquenes foliosos y fructicosos (macrolíquenes) (Chaparro & Aguirre, 2002).

En la mayoría de los líquenes (líquenes heterómeros), el hongo construye la mayor parte de los tejidos estructurales y forma una serie de capas bien definidas (córtez superior, médula y córtez inferior) constituidas por las hifas del hongo.

Las células del alga verde, rodeadas por hifas, forman una capa (capa algal) por debajo del córtez superior. Otros líquenes en los que el ficobionte es una cianobacteria no tienen una organización tan estructurada y el alga está distribuida de forma más o menos homogénea por toda la sección del cuerpo vegetativo del liquen (líquenes homómeros) (Nuñez, 2010).



Los tejidos pueden formarse a partir de células hifales cortas, como también de células largas orientadas paralelamente. Este tejido tiene la función de protección y sostén.

1.4. Reproducción de los líquenes

Los líquenes presentan dos tipos de reproducción: sexual y asexual o vegetativa:

Reproducción vegetativa: Esta es la forma de reproducción más común, son granos finos, llamados soredios o isidios que son proyecciones en forma de dedo o coral. Los cuales se desprenden ya sea por acción de los insectos, agua, viento y otros; y es llevado a otros sitios donde las condiciones de temperatura, humedad, luminosidad y sustrato son idóneas para que comience a crecer otro talo liquénico (Montáñez, 2000).

Esta reproducción por soredios e isidios resulta ser la más ventajosa e importante para los líquenes, puesto que permite colonizar sitios que otros organismos no podrían hacerlo.

Reproducción sexual: En esta segunda forma de reproducción el que está a cargo es el hongo o micobionte, el cual desarrolla esporas en forma de apotecio o de peritecio: los apotecios son estructuras con forma de disco abierto y se presentan sobre el talo, mientras que los peritecios se hunden en él y liberan las esporas. Muchos líquenes logran arrastrar consigo algunas células asegurando así la formación de un nuevo liquen, por lo cual, en la reproducción sexual el hongo debe encontrar su componente fotosintético tempranamente o perecerá (Burgaz, 2009).

1.5 Productos bioactivos aislados del metabolismo secundario de líquenes

Los líquenes presentan metabolitos secundarios que se pueden encontrar en la corteza o en la médula (ver Fig.4), generalmente en una u otra y no es muy común encontrar estos compuestos en ambas partes de estos organismos.

Los compuestos que tienen color, conforman en su mayoría antraquinonas, derivados del ácido pulvínico y el ácido úsnico. Por otro lado, aquellos compuestos incoloros son encontrados comúnmente en la corteza, por ejemplo, la antranorina y liquexantona. Los metabolitos secundarios también pueden ser encontrados en otras partes del liquen tales como el apotecio o el talo. En general, en las especies liquénicas

pueden encontrarse de una a tres sustancias liquénicas resultantes de los metabolitos secundarios.

Existen líquenes como la *Pseudocyphellaria*, especie de Nueva Zelanda, en la que se han encontrado 41 diferentes dépsidos, depsidonas, derivados de ácido pulvínico y 17 triterpenos.

Actualmente, se han reportado aproximadamente 800 metabolitos secundarios aislados de los líquenes. Estos son ácidos alifáticos, meta- y para dépsidos, depsidonas, esteres bencílicos, dibenzofuranos, xantonas, antraquinonas, ácidos úsnicos, terpenos y derivados del ácido pulvínico (Diana, 2015).

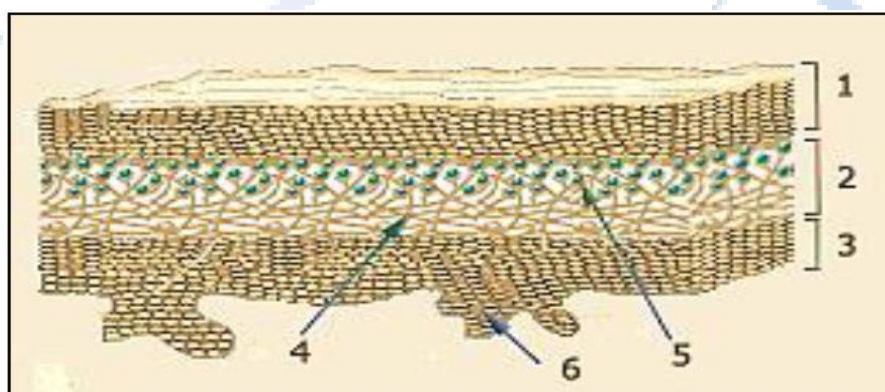


Fig 4. Partes de un líquen (corte transversal): 1) corteza superior 2) Médula 3) Corteza inferior 4) Hifas 5) Capa de algas 6) Proyecciones de sujeción. Fuente (Diana, 2015)

La mayor parte de los metabolitos secundarios de los líquenes se producen vía acetil-polimalonil. Esta vía conduce a la formación de compuestos alifáticos como los ácidos grasos de cadena larga y a sustancias aromáticas del tipo fenólico. La biosíntesis de los ácidos fenólicos (dépsido, depsidona, etc.), se produce a través de la biosíntesis del ácido orselínico que es la unidad fundamental. El proceso biosintético se inicia por una condensación de 1 mol de acetilSCoA y 1 mol de malonilSCoA. La acetoacetilSCoA, resultante puede condensar con otras moléculas de malonilSCoA en etapas sucesivas, formando un policétido de ocho carbonos. Este último puede ciclarse a través de dos procesos distintos: por condensación aldólica produciendo el ácido orselínico y por condensación tipo Claisen, produciendo floroacetofenona. Ver Fig. 5 (Castro V. , 1975).

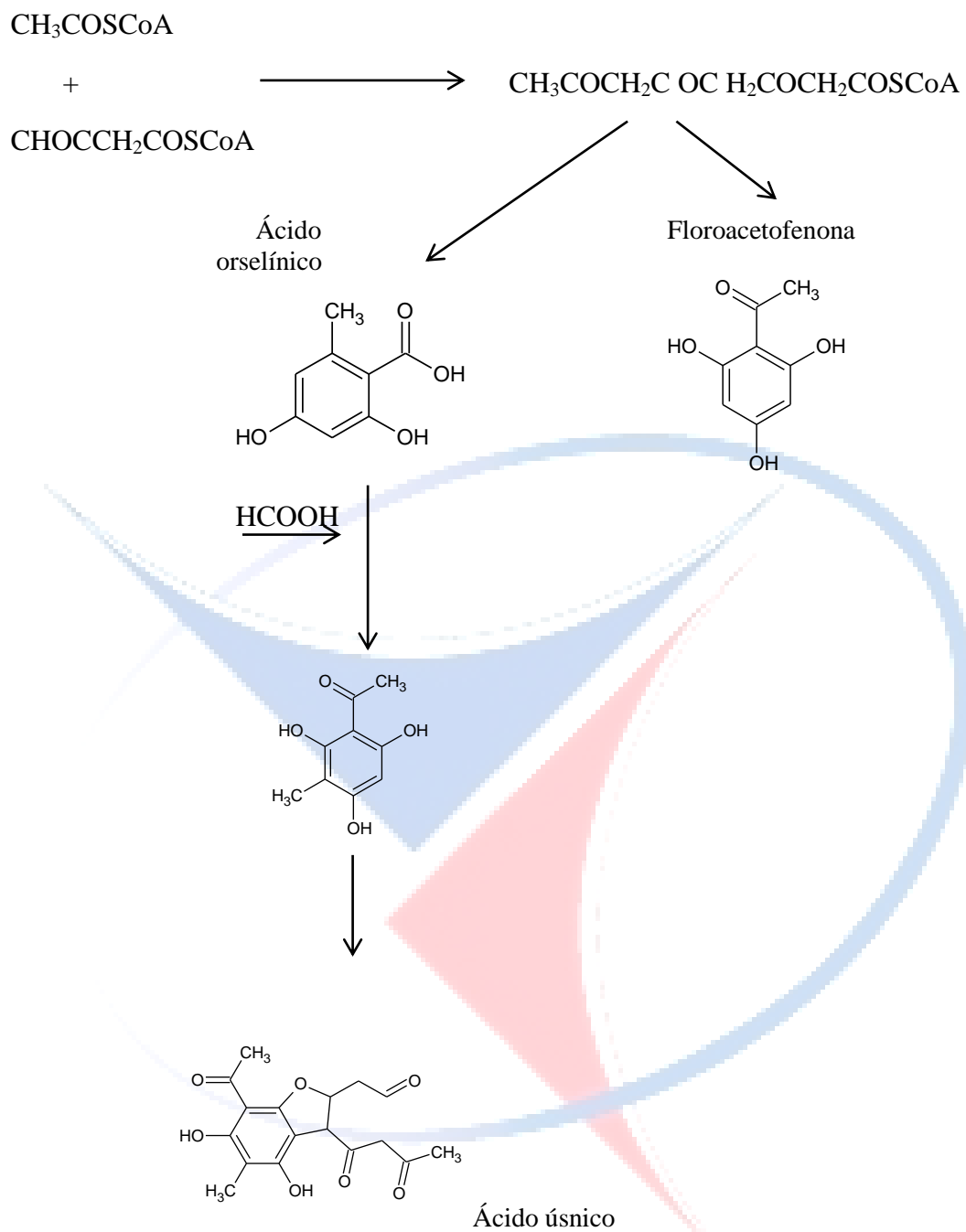


Fig. 5 Biosíntesis de derivados fenólicos (Castro V. , 1975)



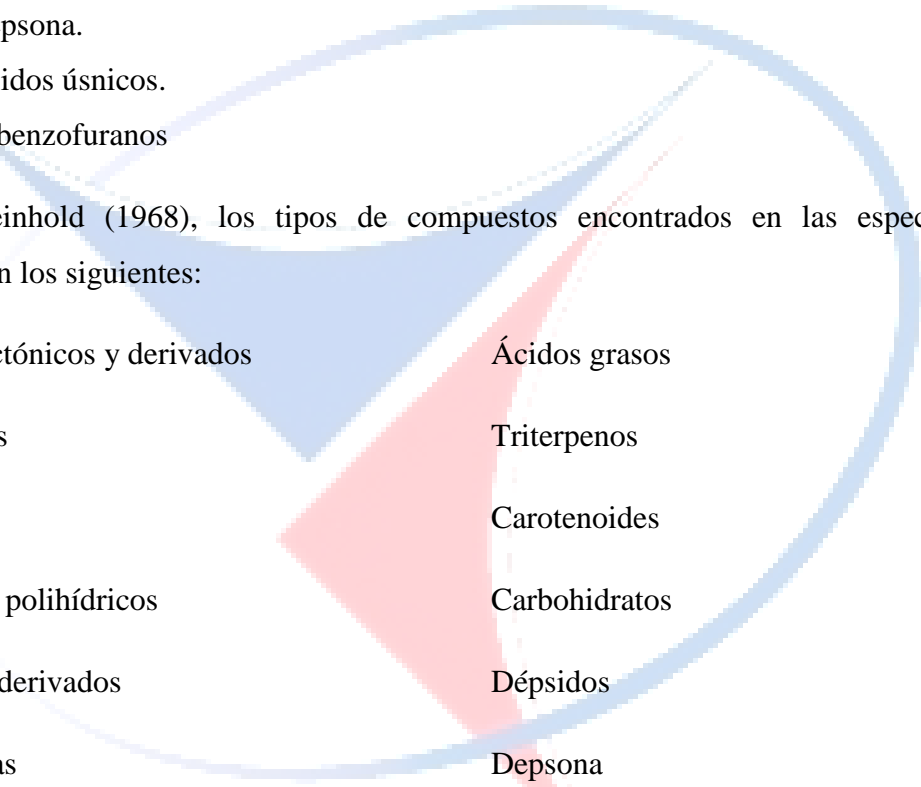
1.5.1. Compuestos liquénicos

Se aplica el término de “compuestos liquénicos” a todos los compuestos sintetizados exclusivamente por líquenes.

Los compuestos liquénicos se agrupan en los siguientes tipos, clasificados de acuerdo a su estructura, ver Figuras 6-10.

1. Dépsidos.
2. Depsidonas.
3. Depsona.
4. Ácidos úsnicos.
5. Dibenzofuranos

Según Reinhold (1968), los tipos de compuestos encontrados en las especies liquénicas son los siguientes:



Ácidos lactónicos y derivados	Ácidos grasos
Diterpenos	Triterpenos
Esteroides	Carotenoides
Alcoholes polihídricos	Carbohidratos
Orcinol y derivados	Dépsidos
Depsidonas	Depsona
Cromanona y derivados	Quinonas
Ácido vulpínico y derivados	Dibenzofurano y derivados
Compuestos que contienen S y N	Aminoácidos
Vitaminas	Enzimas



Ácido thamnólico

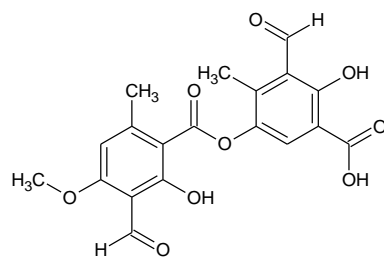


Fig 6. Estructura de dépsidos (Castro V. , 1975)

Ácido variolárico

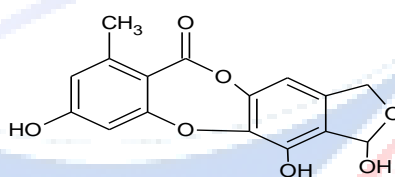


Fig 7. Estructura de las depsidonas (Castro V. , 1975)

Ácido panárico

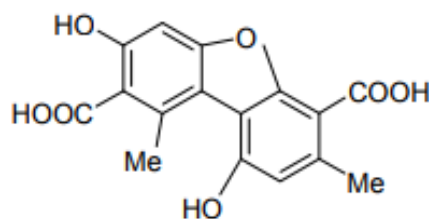


Fig 8. Estructura de las dibenzofuranos (Castro V. , 1975)

Ácido picrolíquénico

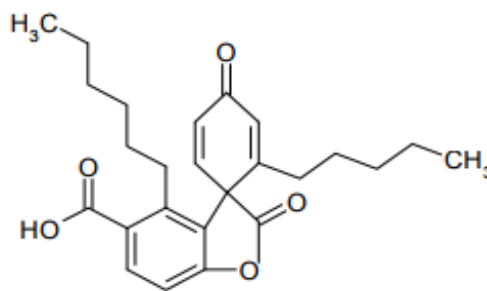


Fig 9 Estructura de la depsona (Castro V. , 1975)

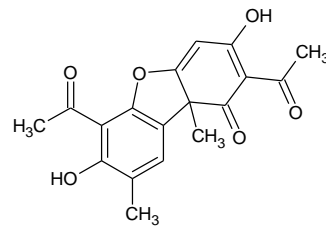


Fig. 10 estructura de los ácidos úsnicos (Castro V. , 1975)

1.6. Usos y aplicaciones de los líquenes

En el ecosistema los líquenes tienen un papel importante en el proceso de la fotosíntesis y los líquenes que presentan cianobacterias (algas verde-azuladas) son fijadores de nitrógeno, enriqueciendo los suelos, principalmente en las regiones boreales y bosques templados” (Montáñez, 2000).

Uno de los papeles más importantes que desempeñan los líquenes con relación a los seres humanos, es el de indicadores de la contaminación atmosférica y la calidad de aire debido principalmente a su susceptibilidad a la presencia de dióxido de azufre en el medio. Además del dióxido de azufre, otros compuestos (amoníaco, fluoruros, metales y metales radioactivos, hidrocarburos clorados), así como la lluvia ácida, pueden ser detectados y monitoreados utilizando los líquenes.

El uso de líquenes en la medicina se basa en el hecho de que contienen sustancias biológicamente activas, se piensa que sus funciones se deben a respuestas a factores ambientales (Yousuf, 2014).

Además, se les puede utilizar en base a sus:

- Propiedades farmacológicas
- Capacidad quelante.
- Reacciones fotoquímicas ligadas a cationes
- Capacidad pigmentante

El compuesto liquénico más estudiado es el ácido úsnico, los isómeros ópticos de este ácido muestran un amplio espectro de actividad farmacológica. El ácido úsnico actúa en el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa del metabolismo celular, son muy efectivas porque las células animales son menos permeables a este antibiótico que los microorganismos.



Son activos frente a neumococos, estreptococos y estafilococos. Además presentan actividad antibiótica frente a los diferentes tipos de *Mycobacterium*. Asimismo, se ha conseguido ampliar considerablemente el espectro de antibiosis de estos compuestos dada la obtención de nuevos derivados de los ácidos úsnicos. (Robles, Morales, & Pastor, 1992).

De igual manera, según Illana (2012), algunos líquenes se utilizan como antiinflamatorios no esteroideos, ya que carecen de los efectos secundarios adversos de las cortisonas. La actividad antitumoral de algunos polisacáridos liquénicos (homoglucanos D) ha despertado interés por los géneros *Umbilicaria*, *Lobaria*, *Usnea* y *Sticta* en la lucha contra algunos tipos de cáncer.

1.7. *Thamnolia vermicularis*, generalidades morfológicas.

Nombre científico	<i>Thamnolia vermicularis</i> var. <i>vermicularis</i> (Sw.) Schaer.
Nombre común:	Liquen gusano, espuela de cóndor
Familia:	Icmadophilaceae
Hábitat:	Zonas alto-andinas y playas ventosas. Crece sobre suelo y rocas; orillas del camino y páramo típicamente entre musgos y otras especies de líquenes
Distribución	Amplio rango de distribución sobre la línea arbórea, en zonas en altas y elevadas altitudes. Se encuentra principalmente en el ártico y montañas en el hemisferio norte, en las montañas alpinas y en regiones de fría temperatura en el hemisferio sur.

Fuente: Castro Mandujano, 2010

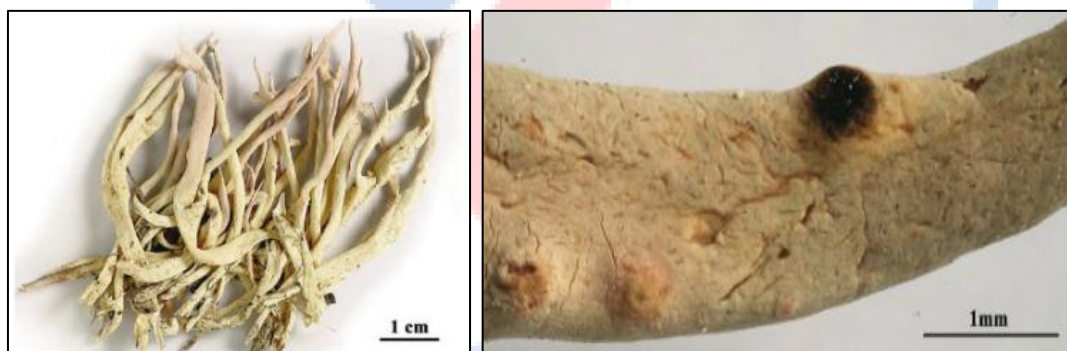


Fig. 11. *Thamnolia vermicularis* Fuente: (Elix & Sohummm, 2014)

1.7.1. Características para identificación en terreno

La especie *Thamnolia vermicularis* crece en muchos tipos de tundras, de grava desnuda, abierta y heladas a ricos matorrales húmedos y musgosos entre los sauces y brezales. “Como su nombre común lo indica, el talo del “liquen gusano” no tiene ramificaciones y es tubular con puntas agudas. Estos tubos son blancos, se arrastran sobre el suelo y carecen de ricinas que los fijen al sustrato” (Goffinet, Rozzi, Lewis, Buck, & Massardo, 2012).

1.7.2. Características morfológicas

Talo erecto o decumbente, formando ocasionalmente mechones por ramificación desde la base o a lo largo del pudiente decumbente, cilíndrico, con puntas puntiagudas, blanco o blanco crema; rara vez con ramas puntiagudas laterales cortas, de tamaño muy variable, usualmente de 1 a 2 mm de ancho pero alcanzando 8 mm de ancho y 12 cm de altura.

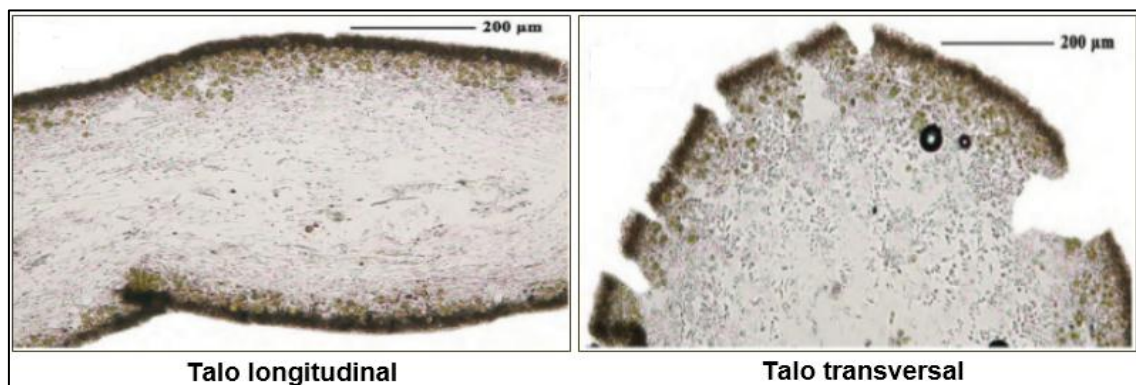


Fig. 12. Talo de *Thamnolia vermicularis* Fuente: Elix & Sohum, 2014

El líquen *Thamnolia vermicularis* presenta dos quimiotipos, esto es, individuos que producen uno o dos compuestos químicos. La presencia de estos compuestos puede revelarse utilizando una prueba de color, en la que se aplica un reactivo al talo que reacciona con el compuesto natural y genera un producto coloreado. En el caso de *T. vermiculares*, los quimiotipos se distinguen como dos variedades: variedad *vermicularis* y variedad *subuliformis*.

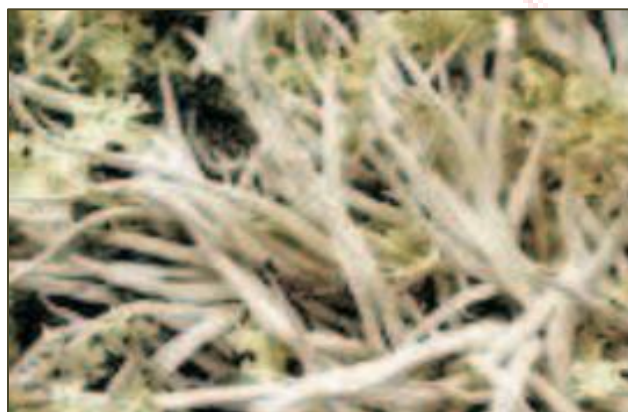


Fig 13 *T. vermicularis* subsp. *vermicularis* Fuente: Castro, 2010



1.7.3. Propiedades y usos de *Thamnolia vermicularis*

Se reportan estudios botánicos y quimiotaxonómicos de esta especie, en los que se indica que contiene: ácido thamnólico, y otros compuestos no identificados. Se debe aclarar, que este compuesto fue identificado como resultado de un análisis por cromatografía en capa delgada y por HPLC, pero no hay estudios en cuanto al aislamiento y caracterización del compuesto en esta especie (Castro, 2002).

El líquen *Thamnolia vermicularis*, de acuerdo con la recolección de estudios que hace Rankovic (2015), tiene propiedades medicinales, cuyo uso varía de acuerdo al lugar y la cultura, entre los que se conoce:

Cultura Naxi en Yunnan, China: Se utiliza para insolación, irritación ocular, tos, dolor de garganta, inflamación, presión arterial alta, fiebres, epilepsia y en casos de disminución de la energía vital. En el agua hirviendo se agrega el talo seco en la taza y la infusión se bebe después de 3-5 minutos, de acuerdo con Wang y Qian (2013), citado por Rankovic (2015).

Noroeste de Yunnan, Tibet: Una planta medicinal ampliamente reconocida, el té utilizado para tranquilizar la mente y combatir el calor, de acuerdo con Byg et al (2010), citado por Rankovic (2015).

Cultura Ayurveda en Uttarakhand y Himachal Pradesh, India: conservar la leche y otros productos lácteos. El líquen se seca y se quema, y la leche se expone al humo, de acuerdo con Sharma (1997), citado por Rankovic (2015).

Cultura Bhotia en Uttarakhand, India: Se utiliza para preservar la mantequilla de leche. Un puñado de líquen se pone en una taza ancha que contiene carbón encendido y el humo dirigido en la leche. Mata los blancos gusanos de 1-2 mm de largo que crecen en la leche, de acuerdo con Upreti y Negi (1996), citado por Rankovic (2015).

América del Sur: Se utiliza para estimular el estómago, de acuerdo con Lindley (1838), citado por Rankovic (2015).

En los Andes, de acuerdo con Macía *et al* (2005), citado por Illana (2012), con *Thamnolia vermicularis* se hace una infusión para tratar la tos, por lo que se puede



encontrar comercializada en mercados de Bolivia, bajo el nombre vulgar de “wari kunka”.

1.8. Cromatografía en Capa Fina como estrategia para el seguimiento de la producción de metabolitos secundarios de líquenes

Consiste en la separación de los componentes de una mezcla debido a la diferente velocidad de elución a través de una fase estacionaria (un sólido poroso o un líquido retenido en un soporte sólido) cuando la mezcla es transportada por una fase móvil (eluyente: puede ser líquido o gaseoso). Las técnicas cromatográficas, además de ser métodos para purificar y aislar productos, tienen utilidad cualitativa (identificación), ya que el tiempo de retención cromatográfico es característico de cada sustancia.

La cromatografía en capa fina es un método analítico de separación. Se basa en la preparación de una capa, uniforme de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. La fase estacionaria será un componente polar y la fase móvil (eluyente) será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

La constante R_f (Ratio of Front) es simplemente una manera de expresar la posición de un compuesto sobre una placa como una fracción decimal, mide la retención de un componente. Se define como:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}}$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide en centímetros, generalmente desde el centro de la mancha y se registra para cada uno de los componentes separados del extracto total (Kuklinski, 2000).

1.9. Bioensayos de actividad antimicrobiana

1.9.1. Técnica de difusión en agar

Se basa fundamentalmente en incorporar al medio de cultivo el antibiótico o el microorganismo en concentración conocida para luego de solidificado el medio se adicione la contraparte y observar inhibición de crecimiento o halos de inhibición según la técnica utilizada. Esta técnica también abarca la llamada de discos de papel, en la cual el antibiótico a ensayar viene incorporado a discos de papel absorbente en concentración



conocida, los cuales se colocan sobre la superficie de una caja de agar sembrado masivamente con el microorganismo en estudio, luego de incubar a temperatura y en tiempos adecuados se observan halos de inhibición de crecimiento (Lizcano & Vergara, 2008).

Las ventajas de los métodos de difusión son que utilizan una pequeña cantidad de la muestra a evaluar y ofrecen la facilidad de ensayar varias sustancias contra un mismo microorganismo.

Con éstas técnicas y realizando diluciones de los diferentes antimicrobianos a probar se puede determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), que se define como la menor concentración del antibiótico en $\mu\text{g/mL}$ capaz de inhibir el desarrollo “*in vitro*” del microorganismo en estudio y la Concentración Mínima Bactericida (MBC), considerándose como la menor concentración del antibiótico en $\mu\text{g/mL}$ que mata los microorganismos “*in vitro*”.

1.9.2 Bioautografía

La Bioautografía ha sido considerada como el ensayo más eficiente para la detección de componentes antimicrobiales, porque esta permite la localización de la actividad en un complejo matriz y por lo tanto permite el aislamiento de los constituyentes activos. El ensayo de bioautografía puede dividirse en tres grupos:

- Bioautografía directa: donde los microorganismos crecen directamente sobre la capa fina cromatográfica
- Bioautografía de contacto: donde los componentes antimicrobiales son transferidos de la capa cromatográfica y son inoculados en una caja de agar a través de contacto directo
- Bioautografía cubierta de agar o inmersión de bioautografía: es donde el medio de agar sembrado es aplicado encima de la fina capa cromatográfica (Lizcano & Vergara, 2008).



CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Descripción de la zona de recolección de material de estudio

Las muestras de *T. vermicularis* fueron recolectadas en el Parque Nacional el Cajas sector Tres Cruces (4166 msnm)

MAPA DEL ÁREA DE ESTUDIO

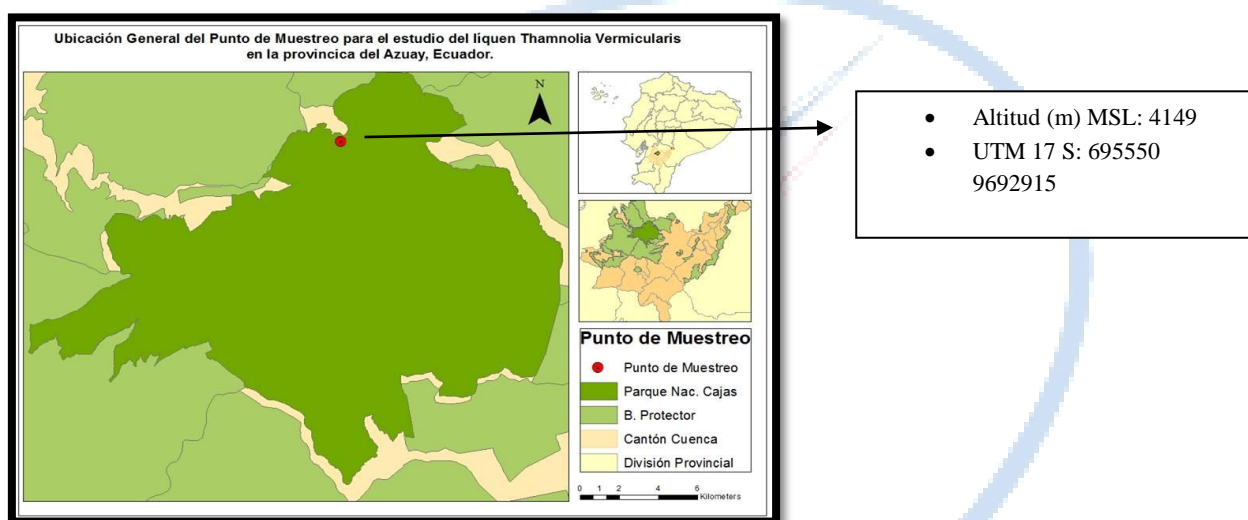


Fig 14 Ubicación del punto de muestreo

2.2. Colección de especímenes

Las muestras recolectadas fueron documentadas con los datos que se muestran a continuación:

Localidad:	Parque Nacional El Cajas - Sector Tres Cruces
Hábitat:	Sustrato sobre el suelo asociado a paja (<i>Calamagostris intermedia</i>)
Fecha de recolección:	16 de Noviembre de 2016 15 de febrero del 2017
Nombre de los colectores:	Jessica Cabrera, Elizabeth Vargas

Cuadro 1. Datos de recolección. (Realizado: Jessica-Elizabeth)



Thamnozia vermicularis fue recolectada sobre el suelo asociada a paja (*Calamagrostis intermedia*), seleccionando los líquenes aislados y no entremezclados con otras plantas. Se debe coleccionar ejemplares íntegros, evitando la contaminación. Las muestras fueron colocadas en fundas de papel debidamente etiquetadas, y su identificación de género y especie fue verificada con ayuda del Blgo. Fredy Nugra.



Fig 15. Líquen *T. vermicularis* en su hábitat

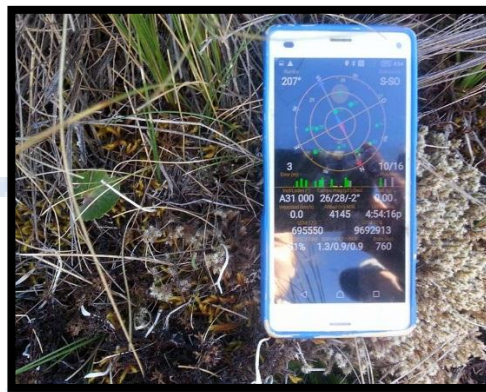


Fig 16. Uso del GPS status para su ubicación geográfica

2.3. Preparación de extractos

2.3.1. Tratamiento de biomasa líquénica

El trabajo experimental fue llevado en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas (Campus Balzay), de la Universidad de Cuenca.

Las muestras previamente separadas y eliminando posible contaminación de polvo, fueron secadas a temperatura ambiente para que no se pierda la tonalidad del talo y sufra degradación de sustancias líquénicas.

2.3.2. Solventes usados para la extracción

Para el proceso de obtención de extractos se usaron solventes de grado técnico de polaridad creciente: hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol.

Las constantes físicas de los solventes usados en la extracción se presentan en el siguiente cuadro:

Solvente y marca comercial	Peso molecular (g/mol)	Densidad	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)
Hexano (Merck)	88.11	0.65 g/cc	-95	69
Acetato de etilo (Merck)	88.11	0.9 g/cc	-84	77
Cloroformo (Merck)	119.38	1.483 g/cc	-64	61
Metanol (Loba Chemic)	32	0.79 kg/L	-97	65

Cuadro 2: Constantes físicas de los solventes usados en extracción **Fuente:** (Méndez, 2013)

2.3.3. Obtención de Extractos orgánicos por método Soxhlet

Los extractos orgánicos de *T. vermicularis* fueron obtenidos por método Soxhlet. El material líquénico previamente secado, fue pesado en una balanza técnica marca Boeco (Germany) y colocada en un cartucho de papel filtro. Este cartucho se insertó en el extractor de vidrio del aparato Soxhlet. Se colocó 250 ml de solvente en el balón fondo redondo, y sometido a calor en un manto calefactor Fisher Scientific. Se generó un suministro continuo de agua para asegurar la condensación del solvente y la eficiente extracción. Se realizaron seis ciclos para lograr la extracción exhaustiva de material líquénico. Este proceso tomó aproximadamente 3 horas (Núñez, 2008).



Fig.17: Extracción por Soxhlet



Los extractos obtenidos en este proceso fueron concentrados a sequedad con la ayuda de un evaporador rotatorio marca Heidolph.



Fig. 18: Evaporación por rotavapor

2.4. Cromatografía en capa fina (CCF)

Para lograr la separación de los componentes del extracto y aproximarse a la posible identidad de los componentes de la mezcla, se realizaron cromatografías en capa fina en diferentes sistemas de solventes.

2.4.1. Materiales para Cromatografía en Capa Fina

Fase Móvil: la fase móvil se preparó realizando diferentes proporciones de Acetato de etilo y hexano, de calidad que se describe en 2.3.2

Fase Estacionaria: placas de sílica gel de 9 cm de altura y 3 cm de ancho (gel de sílice 60 F₂₅₄) de la casa comercial Merck

2.4.2. Cromatografía en capa fina para desarrollo de Bioautografías

Para obtener la separación cromatográfica y usarla en la evaluación de actividad antimicrobiana por bioautografía, se prepararon dos fases móviles de hexano y acetato de etilo en proporciones 1:1 y 8:2. Se preparó una solución madre de los extractos en Metanol (100 mg/mL). Aproximadamente 5 μ l a 10 μ l de esta solución fueron aplicados en el origen de placas cromatográficas debidamente identificadas, permitiendo el secado por cinco minutos, antes de introducir en la cámara cromatográfica.

Se introdujo la lámina de manera vertical en la fase móvil, colocada en vasos de precipitación de 250 mL, usados como cámaras cromatográficas. Al entrar en contacto la placa con la fase móvil se impregnó la sílica gel, generando la elución de los componentes del extracto. El patrón de separación del extracto fue analizado posteriormente a su secado al aire.

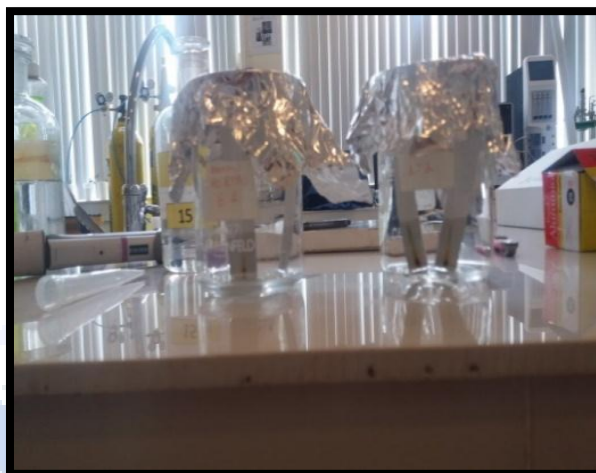


Fig 19 Desarrollo de cromatografía. Fase móvil Hexano:AcOEt (1:1; 8:2)



Fig 20. Cromatografías realizadas por duplicado.



2.4.3. CCF para identificación de componentes de los extractos de *T. vermicularis* por comparación de factores de retención (Rf).

Para desarrollar esta actividad experimental se replicaron las condiciones de desarrollo de cromatografías descritas por Culberson (1972). Se preparó una fase móvil de tolueno-Ácido Acético 20:3. El procedimiento de desarrollo de CCF fue similar a lo descrito en 2.4.2.

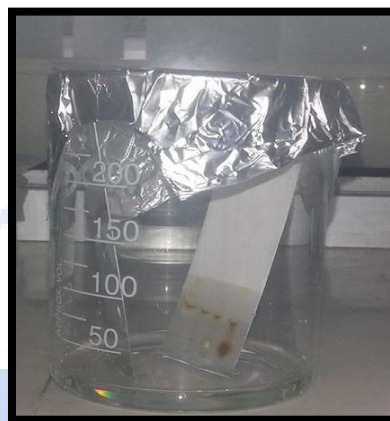


Fig 21. Desarrollo de cromatografía de los cuatro extractos.
Fase móvil Tolueno: Ácido Acético 20:3

Posterior al secado del cromatograma se analizó el patrón de separación con la ayuda de la cámara UV, a onda corta (254 nm), onda larga (354 nm) y mediante luz visible.

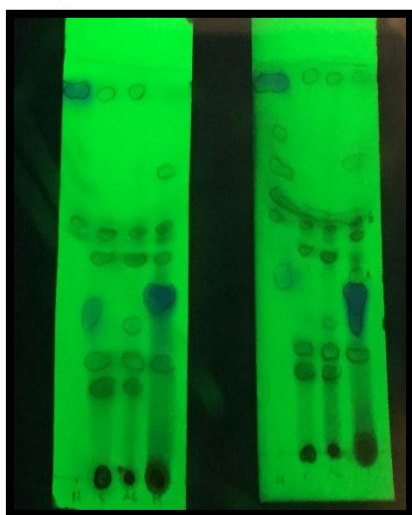


Fig 22. Cromatografías observadas en onda corta.

Fig 23. Cromatografías observadas en onda larga

Se determinó el Factor de retención (R_f), de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el componente del extracto}}{\text{Frente de solvente}} * 100$$

Este valor fue comparado con R_f obtenidos en las mismas condiciones cromatográficas que se describen y que identifican compuestos liquénicos, publicados por el trabajo de referencia de Culberson (1972).

Además, se realizó un revelado químico, utilizando H_2SO_4 al 10%. La placa fue impregnada con la solución descrita y sometida al calor ($110^\circ C$ por 3 minutos). Los resultados de este revelado se observaron en luz visible.

También se realizó un revelado en cámara de yodo, con el fin de investigar presencia de compuestos insaturados. Los resultados de este revelado se analizaron en luz visible.

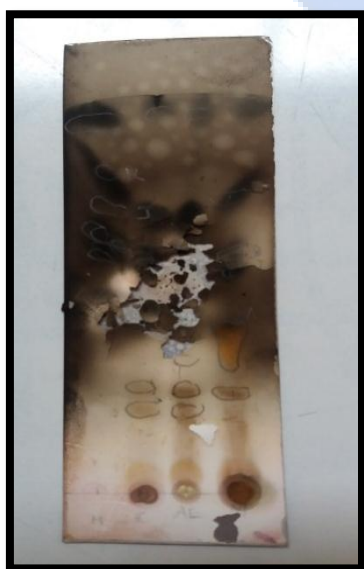


Fig 24. Revelado con H_2SO_4 al 10 % de los cuatro extractos

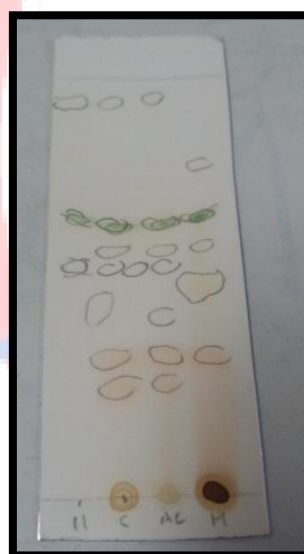


Fig 25. Revelado con Iodo de los cuatro extractos



2.5. Ensayos biológicos “in vitro” para actividad antimicrobiana

2.5.1. Microorganismos de prueba

- **Bacterias:** Se realizaron los ensayos con *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, provistos por el Instituto Nacional de Investigaciones en Salud (INSPI) sede Cuenca. Se realizó un repique de cada una de las cepas en agar nutritivo y se incubaron a 37°C por 24 horas. Se realizaron resiembras sucesivas en agar nutritivo para asegurar que los microorganismos se encontraban en fase de crecimiento exponencial en el momento del bioensayo.

- **Hongos:** Se realizaron los ensayos con *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium crysogenum*, proporcionados por el Laboratorio de Micología de la Universidad de Cuenca. Se realizó un repique de cada una de las cepas en Agar Sabouraud y se incubaron a 25 °C por 72 horas, para asegurar su viabilidad en el momento del bioensayo.

La sensibilidad de los microorganismos a los extractos liquénicos fue analizada en agar Nutritivo para las cepas de bacterias y agar Sabouraud para la cepa micótica. (Nedeljko, 2012).

2.5.2. Preparación de medios de cultivo

Para la prueba de actividad antibacteriana se formuló agar Nutritivo a partir de sus componentes para un litro de medio sólido se pesó un gramo de peptona de caseína Difco (20g de agar base Merck, 0.5 NaCl comercial). El medio fue dispersado en cajas Petri estériles (Salazar, 2012).

Para el ensayo de actividad antifúngica se formuló agar Sabouraud (Difco). Para un litro de medio de cultivo se suspendió 65g de medio en agua destilada, se esterilizó a 121°C por 45 minutos y el medio fue dispersado en cajas Petri estériles.

Puede ser suplementado con otros agentes selectivos de crecimiento (Salazar, 2012).

2.5.3. Inoculación de placas con microorganismos de prueba

Las placas cromatográficas previamente divididas en secciones numeradas de acuerdo a su Rf fueron colocadas en la superficie de una placa Petri inoculadas con los microorganismos de prueba, se incubaron a 37°C por 24 horas, posteriormente se registraron los halos obtenidos.

Las bacterias *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron inoculadas en placas con agar nutritivo mediante hisopado.

Para la inoculación de las placas de agar Sabouraud con hongos de prueba, se colocaron esporas en agua estéril, las cuales fueron colocadas mediante hisopado en la superficie de la placa.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

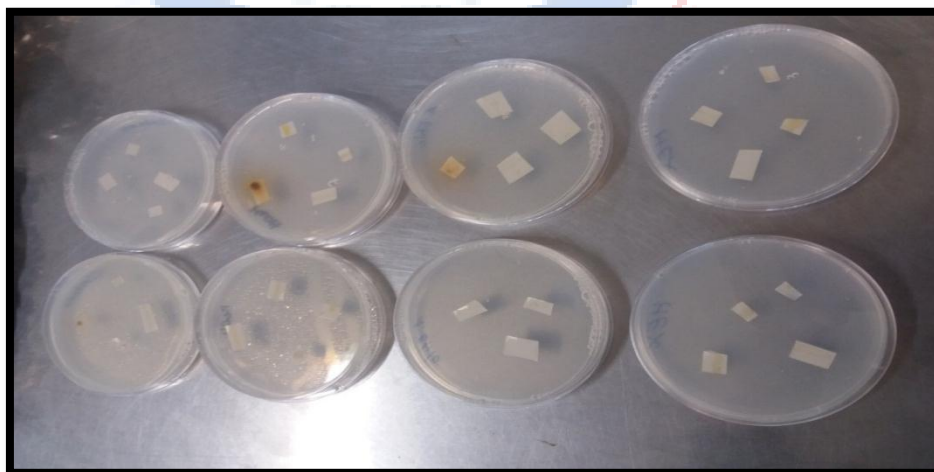


Fig 26. Placas sembradas con CCF

2.5.4. Actividad antimicrobiana de extractos totales de *Thamnia vermicularis*

➤ Siembra de bacterias

La evaluación antimicrobiana de los extractos *Thamnia vermicularis* obtenidos por extracción Soxhlet, se realizó por método de difusión en agar, el cual se describe a continuación:

En cajas de Petri con 20 ml de Agar Nutritivo, se inoculó la bacteria de prueba con un hisopo sobre la superficie del agar en tres direcciones y por el borde de la placa,

dejando secar por cinco minutos. Se diluyó el extracto seco en metanol a una concentración de 100 mg/mL. Se impregnaron en discos de papel filtro Whatman N° 5 genérico, hasta fijar 10 mg de extracto por disco, permitiendo la evaporación del solvente por quince minutos. El disco preparado según lo descrito se colocó en la superficie del agar inoculada con la bacteria prueba. El sistema se incubó a 37 °C y se realizaron las medidas de los diámetros de inhibición pasadas las 24 horas de incubación.



Fig 27. Halos de los Extractos frente a *K. pneumoniae*



Fig 28. Halos de los extractos frente *P. aeruginosa*

Se realizaron controles con antibióticos de referencia (norfloxacino 10 µg, fosfomicina 50µg, ciprofloxacino 5 µg).

Además se probó la actividad del solvente usado para resuspender el extracto. Se impregnaron 10 µl de metanol (Sigma Aldrich) en un disco de papel filtro de 8 mm de diámetro. Luego de secado por 10 minutos se colocó en la superficie de una placa Petri inoculadas con las bacterias de prueba como se describe previamente.

Para evaluar la actividad de los extractos se utilizaron los siguientes criterios:

- Halo de inhibición entre 7 – 11 mm: actividad débil
- Halo de inhibición entre 11 – 16 mm: actividad moderada
- Halo de inhibición mayor a 16 mm: actividad alta (Cazar, 2005).

2.5.5. Actividad antifúngica

Soluciones de extractos orgánicos de *T. vermicularis*, preparados según lo descrito en 2.5.3 inoculadas con los hongos de prueba fueron evaluados en su estructura antifúngica con los hongos *Penicillium* y *Aspergillus*. Para preparar las placas

inoculadas con los hongos de prueba primero se suspendió las esporas en agua destilada previamente estéril y se homogenizó hasta que las esporas estén resuspendidas. Luego con un hisopo se tomó las esporas resuspendidas y se procedió a la siembra en agar Sabouraud y se esperó cinco minutos para colocar las muestras de análisis.

Las soluciones de extractos de *T. vermicularis* fueron impregnadas en disco de papel filtro Whatman N° 5 de 8 mm de diámetro, impregnándose cada extracto en el papel filtro a una concentración de 100 mg por disco. Una vez aplicadas las muestras se secaron durante quince minutos a temperatura ambiente, los discos se colocaron en la superficie de las placas inoculadas con hongos de prueba, se incubó a 25°C por 72 horas y se realizaron las medidas de los diámetros de inhibición. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

El trabajo se realizó en condiciones de esterilidad, en cámara de flujo laminar BIOAIR, modelo Aura HZ. Debido a que el ensayo se realizó con hongos ambientales, con el fin de explorar la capacidad de los extractos de inhibir el crecimiento de especies fungales, no se utilizaron controles con antifúngicos. En el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas no se cuenta con condiciones de bioseguridad para trabajar con hongos dermatofitos para patógenos a humanos, los cuales si tienen antifúngicos de referencia. La evaluación de actividad antifúngica se realizó con los criterios aplicados para el ensayo antibacteriano (Ver 2.5.4).

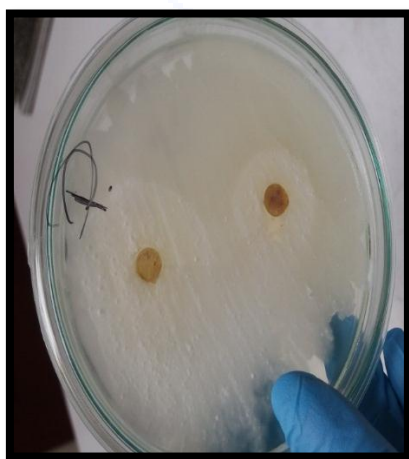


Fig 29. Halos de los extractos de Acetato de etilo y Metanol frente a *Penicillium*



Fig 30. Halos de los extractos de Acetato de etilo y Metanol frente a *Aspergillus*

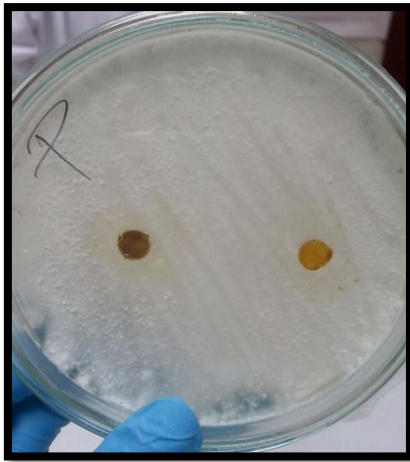


Fig 31. Halos de los extractos de cloroformo y hexano frente a *Penicillium*

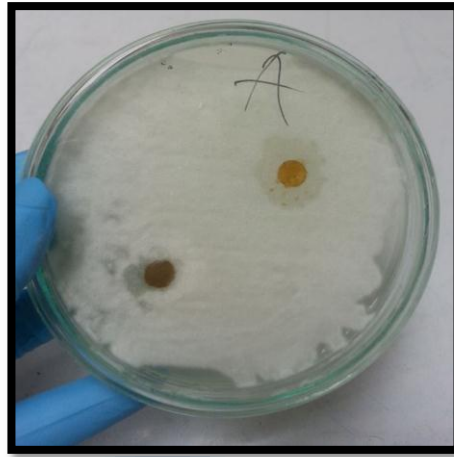


Fig 32. Halos de los extractos cloroformo y hexano frente a *Aspergillus*

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Resultados

3.1.1. Identificación de especímenes de *T. vermicularis*

A continuación, se presentan imágenes de análisis de tejidos de *T. vermicularis*, realizados con la ayuda de microscopio (40x). Las características morfológicas permitieron corroborar la identificación de la especie liquénica como *T. vermicularis*.

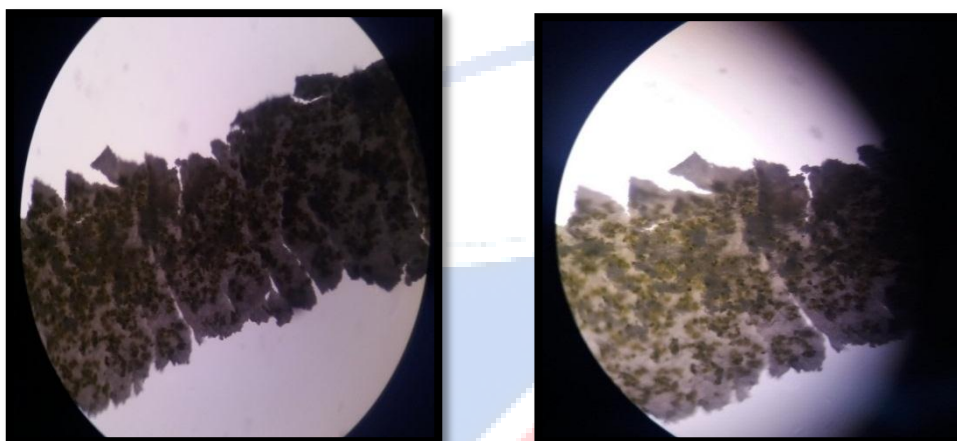


Fig 33 Estructura morfológica del liquen al microscopio (40x)

3.1.2. Rendimiento de obtención de extractos

A continuación, se presentan los resultados de eficiencia de extracción por el método Soxhlet.

Solvente	Soxhlet
Hexano	0.9 %
Cloroformo	1.15%
Acetato de Etilo	2.45%
Metanol	11.85%

Cuadro 3 Rendimiento de los extractos obtenidos por Soxhlet

Realizado: Jessica-Elizabeth



3.1.3. Análisis de Patrones Cromatográficos y comparación con valores reportados en Literatura

Los valores de Rf obtenidos en las cromatografías desarrolladas en el sistema Tolueno: Ácido Acético 20:3 fueron comparados con los valores reportados por Culberson (1972). A continuación, se presentan los compuestos que más se aproximan a los datos de Rf publicados, según el solvente utilizado.

EXTRACTO DE MeOH			
Rf luz visible	Rf onda corta (254nm)	Rf onda larga (354 nm)	Compuesto identificado por similitud de Rf
50	50	50	ZEORIN
66	-	-	DIPLOICINA
-	45	-	ACETIL PORTENTOL
-	31,25	-	ÁCIDO LUVÍDICO
-	58,75	-	-
-	75	-	-
-	96,5	-	-
-	55	-	ÁCIDO HOMOSEKKAIC

Cuadro 4 Rf de los Extractos de MeOH (ensayo realizado por duplicado)(-) Ausencia de Rf

Realizado: Jessica-Elizabeth

EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO		
Rf onda corta (254nm)	Rf onda larga (354 nm)	Compuesto identificado por similitud de Rf
31,25	-	ÁCIDO LUVÍDICO
58,75	58,75	-
96,25	-	-
28,75	-	ÁCIDO 4-O-DIMETIL PLÁNICO

Cuadro 5 Rf de los Extractos AcoEt (ensayo por duplicado) (-) Ausencia de Rf

Realizado: Jessica-Elizabeth

EXTRACTO DE HEXANO			
Rf luz visible	Rf onda corta (254nm)	Rf onda larga (354 nm)	Compuesto identificado por similitud de Rf
-	50	50	ZEORÍN
66	66	66	DIPLOICINA
58.75	58,75	-	-
75	75	75	-
93.75	93,75	93.75	-
-	76,25	-	ÁCIDO PINÁSTRICO
-	83,75	-	ÁCIDO VULPÍNICO

Cuadro 6 Rf de los Extractos de Hexano (ensayo por duplicado) (-) Ausencia de Rf

Realizado: Jessica-Elizabeth



EXTRACTO DE CLOROFORMO			
Rf luz visible	Rf onda corta (254nm)	Rf onda larga (354 nm)	Compuesto identificado por similitud de Rf
50	50	50	ZEORÍN
45	45	45	ACETIL PORTENTOL
31.25	31,25	31.25	ÁCIDO LUVÍDICO
-	58,75	58,75	-
-	75	75	-
-	96,25	96.25	-
-	55	55	-
-	28,75	28.75	ÁCIDO 4-O-DIMETIL PLÁNICO

Cuadro 7. Rf de los extractos de Cloroformo (Ensayo por duplicado) (-) Ausencia de Rf

Realizado: Jessica-Elizabeth

Los cuadros 4-7 muestran los Rf de los posibles 8 compuestos identificados en las cromatografías realizadas, de los cuales se presume corresponden a: zeorín, acetil portentol, ácido luvídico, diploicina, ácido pinástrico, ácido vulpínico, ácido homosekikaik y ácido 4-o-dimetil plánico, según los valores Rf referenciales tomados de cromatografías de extractos liquénicos. (Culberson, 1972).

Además, se analizaron los resultados del revelado químico de los cuatro extractos liquénicos, impregnados y desarrollados en una placa cromatográfica, según lo descrito en Metodología (ver 2.4.3). Los resultados se presentan a continuación:

Tipo de revelado	Color	Tipo de compuesto	Interpretación
Cámara de yodo	Marrón	Ácidos grasos, insaturaciones	Forman complejos coloreados por la adición de yodo a las insaturaciones de moléculas orgánicas
	Palo de rosa	Dibenzofuranos relacionados con el ácido panárico	
H ₂ SO ₄ /calor	Negro	Compuestos glicosilados	Generación de manchas negras por carbonización de grupos glicosilados.
	Café	Orcinol meta-dépsidos	

Cuadro 8 Resultados de identificación de grupos de compuestos de extractos de *T. vermicularis* por revelado químico (ensayo por duplicado) Realizado: Jessica-Elizabeth



3.1.4. Actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de *T. vermicularis*

Bioautografías: Los resultados obtenidos en las Bioautografías no permitieron evidenciar actividad antimicrobiana, ya que no se registraron halos de inhibición de crecimiento de los microorganismos de prueba alrededor de los fragmentos de CCF.

Ensayo antibacteriano por difusión en agar

A continuación se presentan los resultados obtenidos del ensayo de difusión en agar con los extractos obtenidos por el método Soxhlet, ante las bacterias de prueba. Los resultados se presentan como diámetro de los halos de inhibición en mm, incluyendo el disco de papel (8 mm). El control con el solvente no produjo halo de inhibición.

EXTRACTOS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
HEXANO	--	--
ACETATO DE ETILO	25mm (A)	35mm (A)
CLOROFORMO	--	--
METANOL	17 mm (A)	25 mm (A)
NORFLOXACINO	30 mm	30 mm
FOSFOMICINA	15 mm	15 mm
CIPROFLOXACINO	30 mm	--
CONTROL DE SOLVENTE (METANOL)	--	--

Cuadro 9. Diámetro de los halos de inhibición generados por los extractos en ensayo de difusión en agar, medidos en milímetros (--): Ausencia de halo de inhibición. A: alta; (ensayos por duplicado) Realizado: Jessica-Elizabeth



Ensayo antifúngico por difusión en agar

A continuación, se presentan los resultados obtenidos ante los hongos de prueba. Los resultados se presentan como diámetro de los halos de inhibición en mm, incluyendo el disco de papel (8 mm). El control con solvente no presentó halo de inhibición.

EXTRACTOS	<i>Penicillium crysogenum</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
HEXANO	--	20 mm
ACETATO DE ETILO	35 mm (A)	17 mm (A)
CLOROFORMO	21 mm (A)	--
METANOL	26 mm (A)	--
CONTROL CON SOLVENTE (METANOL)	--	--

Cuadro 10. Diámetro de los halos de inhibición generados por los extractos en ensayo de difusión en agar, medidos en milímetros. (--): Ausencia de halo de inhibición. (A) Alta. (Ensayos por duplicado) Realizado: Jessica-Elizabeth

Condiciones de bioseguridad del laboratorio de biotecnología no permiten trabajar con hongos patógenos a humanos, por lo que en nuestro trabajo se realizaron los ensayos con hongos ambientales.

3.2. Discusiones

Las propiedades antibióticas de los líquenes revisten gran interés, dado que se estima que el 50% de estas especies tienen propiedades antimicrobianas (Malhotra, 2008). El uso de *Thamnolia vermicularis* en medicina tradicional señala a esta especie como fuente de metabolitos bioactivos ante agentes infecciosos. En los Himalayas occidentales, *T. vermicularis* se utiliza como antiséptico. La medicina tradicional China indica que, infusiones acuosas de este líquen ayudan a aliviar condiciones inflamatorias del tracto respiratorio (Manojlovic, 2010). Estas evidencias indican la necesidad de estudios de la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de *Thamnolia vermicularis*.

A pesar de estos antecedentes, existen escasos reportes de actividad antibacteriana y antifúngica de *Thamnolia vermicularis* hasta el momento. Perry et al., (1999) estudiaron la actividad antimicrobiana, antiviral y citotóxica de líquenes de Nueva Zelanda. En este trabajo, el extracto alcohólico de *T. vermicularis* fue inactivo ante *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*. Shresta et al (2014), incluyeron a este líquen en una evaluación de 34 especies de Norte América, En este trabajo, el extracto acetónico y metanólico de *T. vermicularis* es inactivo ante la bacteria *Escherichia coli*, pero inhibe el crecimiento de *P. aeruginosa*, *S. aureus* coagulasa negativa y resistente a metilicina. Esta actividad se evaluó en un ensayo de microdilución.



Los resultados obtenidos en el desarrollo de ensayos antibacterianos señalan a los extractos metanólico y en acetato de etilo de *T. vermicularis* como inhibidores del crecimiento de *K. pneumonie* (17 y 25 mm, respectivamente). Los controles positivos utilizados, norfloxacino y ciprofloxacino generaron halos superiores a los de los extractos (30 mm). No obstante, el halo generado por fosfomicina es menor (15 mm). El efecto antibacteriano de los extractos liquénicos en MeOH y AcOEt ante *P. aeruginosa* es relevante. El extracto metanólico generó un halo menor al de Norfloxacino (25 mm vs. 30 mm). Este hallazgo es similar al del extracto de AcOEt (35 mm vs. 30 mm). Fosfomicina generó un halo menor al de los dos extractos activos (15 mm). Ciprofloxacino no inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa*. Estos resultados permiten señalar como promisorios a estudios posteriores de *T. vermicularis* como inhibidor de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.

La polaridad del solvente empleado en la obtención de extractos liquénicos influye en la actividad biológica evidenciada. Los extractos de Acetato de Etilo y Metanol de polaridad media y alta respectivamente presentaron actividad bacteriana, mientras que los extractos de hexano y cloroformo solventes de polaridad baja no presentaron actividad bacteriana frente a las bacterias de prueba.

En literatura se encuentran trabajos que señalan el efecto antifúngico de especies de hongos liquenizados, señalando a los líquenes como una posible alternativa en la producción de productos naturales (Suberu, 2004; Seoun, Hye, & Kwang, 2003). Cankilic *et al.*, estudiaron la actividad antifúngica del líquen *Usnea florida* y su metabolito secundario, ácido tamnólico. Este compuesto también es generado en el metabolismo de *T. vermicularis*. Los resultados reportan una baja bioactividad del ácido tamnólico ante hongos filamentosos, donde se incluye *Aspergillus fumigatus* (MIC = 400 ug/mL). (Cankilic, 2016)

En nuestro trabajo se evaluó el efecto fungicida de los metabolitos producidos por esta especie en donde se encontró que los extractos de acetato de etilo, cloroformo y metanol presentan alta actividad fungicida frente a *Penicillium crysogenum* (35 mm, 21 y 26 mm; respectivamente). Los extractos de hexano y acetato de etilo inhibieron el crecimiento de *Aspegillus fumigatus* (20 y 17 mm; respectivamente). La bioactividad de los extractos es superior a la de los metabolitos secundarios puros, como se evidencia al comparar



nuestros resultados de actividad antifúngica con los reportados para ácido tamnólico por Cankilic *et al.*, (2016).

Evaluando la actividad antimicrobiana observada en los extractos orgánicos del líquen estudiado, se evidencia que el extracto en Acetato de Etilo presenta una actividad alta ante las bacterias y los hongos de prueba. El solvente utilizado en el proceso de extracción tiene efecto en la fuerza inhibitoria del extracto. Dado que el acetato de etilo es capaz de extraer compuestos de polaridad media, genera un efecto antimicrobiano para hongos y bacterias. El extracto clorofórmico presenta actividad selectiva ante *P. crysoenum*, y el extracto hexánico inhibe el crecimiento de *A. fumigatus*. Este resultado es promisorio, dado que la selectividad antimicrobiana es un parámetro deseable para el desarrollo de un antifúngico.

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es uno de los grandes problemas que afectan a la humanidad en general. En base a los resultados obtenidos de este estudio se puede señalar a los líquenes como posible alternativa para la producción de antibióticos de origen natural.

Con las herramientas cromatográficas disponibles en nuestro estudio se logró identificar en los extractos de *T. vermicularis* compuestos glicosilados, dibenzofuranos y compuestos insaturados, los cuales ya han sido reportados previamente en este género y asociados con su bioactividad (Manojlovik *et al.*, 2010). Se requiere de posteriores estudios aplicando métodos cromatográficos de alta resolución para encontrar la composición de los extractos orgánicos del líquen en estudio. Además es deseable desarrollar ensayos biológicos que conduzcan a la obtención de dosis inhibitorias mínimas ante microorganismos de prueba, con lo cual se puede evaluar adecuadamente el potencial de *T. vermicularis* como especie bioactiva.



CONCLUSIONES

- ✓ En este estudio se obtuvieron extractos de liquen *Thamnolia vermicularis* por el método Soxhlet, los cuales se usaron para realizar las cromatografías y determinar la actividad antimicrobiana y antifúngica frente a hongos y bacterias de prueba.
- ✓ Mediante el estudio cromatográfico se puede identificar la presencia de compuestos provenientes del metabolismo secundario del liquen: dibenzofuranos, compuestos glicosilados e insaturados, los cuales influyen en la actividad biológica observada.
- ✓ Mediante este estudio preliminar se concluye que los extractos orgánicos de *Thamnolia vermicularis* exhiben actividad bactericida. Las fracciones cromatográficas sometidas a ensayo de bioautografía no generaron bioactividad. Esto sugiere un posible sinergismo de los compuestos que constituyen los extractos orgánicos.
- ✓ Los análisis cromatográficos de los extractos de *T. vermicularis* evidenciaron una composición comparable a la de los metabolitos liquénicos reportados por Culberson (1972). Este trabajo de referencia sirve como guía para la identificación de compuestos liquénicos por Cromatografía en Capa Fina.



RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con otros estudios para determinar la bioactividad de *Thamnolia vermicularis*, esperando que este proyecto sirva como base para nuevas investigaciones.
- En nuestro país existe una gran cantidad de especies liquénicas, las cuales aún no han sido estudiadas, por lo que se recomienda seguir trabajando en el estudio de caracterización de metabolitos secundarios y bioactividad de líquenes ecuatorianos.
- Los resultados de actividad antifúngica y antibacteriana indican las propiedades antibióticas de los metabolitos liquénicos de la especie *Thamnolia vermicularis*. Se requiere buscar nuevas alternativas de extracción e identificación de metabolitos secundarios mediante técnicas cromatográficas de alta resolución.



ABREVIATURAS

Msnm: Metros sobre el nivel del mar

g: gramos

°C: grados Celsius

Subsp.: Subespecie

CCF: Cromatografía en Capa Fina

Rf: Relación de frente

MeOH: Metanol

AcOEt: Acetato de Etilo

µg: Microgramos

µl: microlitros

mL: mililitros

INSPI: Instituto Nacional de Investigaciones en Salud

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

UV: Radiación ultravioleta



GLOSARIO

Anfitecio: (=margen o exípulo talino) borde que rodea al disco de algunos apotecios (lecanorino, zeorino) y que contienen células del mismo fotobionte que el talo.

Apotecio: Ascoma (ascocarpo) en forma de disco o copa. El himenio, cuando está maduro, queda expuesto al exterior en forma más o menos extensa y va rodeada por un borde (=espículo, margen) de distintos tipos (margen propio y/o talino)

Ascoma: distintos tipos de estructuras que producen ascos, ascósporas y paráfisis

Ascomicete: grupo de hongos caracterizados por formar esporas dentro de estructuras microscópicas en forma de saco, llamadas ascas.

Ascos: estructura en forma de sacos que contiene ascósporas endógenas de origen sexual, es propia de los *Ascomycetes*.

Basidiocarpo: cuerpo fructífero de los basidiomicetes que produce basidios y basidiosporas; típicamente en una forma de sombrero o repisa.

Basidiomicete: un grupo de hongos relacionados filogenéticamente que desarrollan basidios como consecuencia de la reproducción sexual.

Cianobacteria: Organismo procariota del reino de las eubacterias que son fotosintetizadoras, división *Cyanophyta*, clase *Cyanophyceae*. Conocidas como algas verde-azuladas.

Conidios: (conidiósporas) esporas de origen asexual formadas en células conidiógenas.

Córtex: es la capa más externa de los talos heterómeros (y el margen talino de los apotecios lecanorinos), de anatomía y grosor variables, constituidos por plecténquimas de distintos tipos que le confieren cierta consistencia o coherencia y protege a la capa de fotobiontes de las agresiones físico-químicas del medio atmosférico. Se puede acumular algunas sustancias entre ellas el ácido úsnico, el ácido rizocárpico, la atranorina o la parietina, relacionadas con la filtración de ciertas longitudes de la luz y protección del aparato fotosintético fotobionte. También puede ser la zona de expulsión de detritus orgánico del talo. En algunas especies es la capa que da consistencia a los talos, ejemplo: Ramalina



Crustáceos: tipo de talo de líquenes que se encuentran siempre en estrecho contacto con el sustrato, carecen de córtex inferior o de órganos de ejecución y no se pueden separar de él sin destruirlos. Se sujetan al sustrato por medio de médula o un hipotalo.

Dimórfico: talo que tiene dos formas, talos compuestos por dos partes muy diferentes: talo primario-granulosos o escumuloso y talo secundario-fruticoloso con elementos perpendiculares al sustrato.

Escumuloso: (escumiforme, escamoso) tipo de talo de líquenes laminares construido por escuámulas de formas muy viables

Epifleódicos: que el talo crece por encima de la capa externa del ritidoma de las cortezas, en ocasiones alguna zona inferior de la médula puede penetrar ligeramente.

Esporas: células generativas que producen nuevos individuos sin necesidad de fusionarse. Pueden ser de origen sexual o asexual. En los líquenes, las de origen sexual (ascósporas y basidósporas) se forman por la meiosis en los ascos o en los basidios; la asexual se llaman picnosporas o conidios y originan conidiomas.

Farináceo: finamento pulverulento, como granos de harina; se aplica a los soledios pero también al aspecto que pueden proporcionar a las superficies de la cobertura por pruina.

Ficobionte: Componente algal de una simbiosis. Se usa el término en el caso de los líquenes.

Foliáceos: tipo de talo de líquenes que tiene forma laminar y tienen una estructura más o menos compleja, con una organización dorsiventral y cara inferior diferenciada; parcialmente adherida al sustrato

Fotobionte: el bionte que fotosintetiza en las simbiosis líquénicas. Puede ser una alga verde multicelular (eucariota) o una cianobacteria (procariota)

Fruticoso: tipo de talo de líquenes en forma de ejes más o menos ramificados como pequeños arbustos.

Homómero: tipo de talo no estratificado, en que el micobionte y los fotobiontes están uniformemente distribuidos y donde los fotobiontes son cianobacterias (verde-azuladas); a veces con un córtex, o todo el talo celúlico.



Heterómero: la mayor parte de los líquenes desarrollan talos estratificados internamente, talos heterómeros. Or lo general, constan de varias capas claramente ordenadas: córtex superior, capa de fotobiontes (capa algal), médula y córtex inferior. Estas capas pueden estar constituidas por diferentes tipos de plecténquimas. El fotobionte suele estar protegido por una capa fúngica, de grosor variable, el córtex; en esta capa, de anatomía y grosor variables, se pueden acumular algunas sustancias, como el ácido úsnico, la atranorina o la parietina, relacionadas con la protección del aparato fotosintético del fotobionte. También es en esta capa donde se pueden acumular pigmentos coloreados en las paredes de las hifas. En ocasiones, células colapsadas de fotobiontes pueden entrar en este estrato (fenocórtex). Por encima del córtex puede aparecer el epicórtex, (con células colapsadas y gelatinizadas de hongo y de fotobionte), que es de forma y grosor irregular y aparece en muchos líquenes, desde los crustáceos a los fruticulosos. Algunos líquenes ofrecen un aspecto blanquecino, farináceo, debido a la aparición superficial de excreciones de oxalato cálcico que reciben el nombre de pruina

Justo por debajo del córtex, se sitúa la única capa donde predomina el fotobionte y se establecen los contactos físicos entre los simbiosomas. El grosor y la morfología pueden tener significado taxonómico. Esta capa puede estar muy diferenciada y ser continua o estar interrumpida por la médula, los fotobiontes pueden estar en glomérulos o no.

La médula es una capa fúngica que suele ocupar el mayor volumen en el talo. Está constituida generalmente por un conjunto de hifas laxamente entremezcladas (aracnoide), de aspecto algodonoso y con espacios que permiten la aireación del talo.

Las células de las hifas suelen ser alargadas, pero el grosor de la pared es variable. Es en la capa del fotobionte y en la médula donde se acumulan la mayor parte de las sustancias líquénicas, generalmente en forma de cristales incrustados en las paredes de las hifas. La médula es hidrófoba, de modo que, incluso en las épocas de lluvia, el interior del talo puede permanecer seco, permitiendo así la circulación del aire. Sólo en el caso de los podocios de la *Cladonia* el cilindro central, estereoma, conduce agua por capilaridad. Cuando el líquen necesita elevarse por encima del sustrato, p. ej., en los tipos fruticulosos, se hace necesario que la médula forme un tejido de soporte y, para ello, las células hifales engrosan la pared y se aglutinan. Este plecténquima de sostén puede situarse en el centro del talo, bien en forma condensada, como un fino cordón



elástico (*Usnea*) o en forma de cilindro hueco (*Cladonia*). También, en el caso de tipos crustáceos muy desarrollados o de algunos placodioides, este tejido especial se dispone a modo de cordones irregularmente distribuidos en la médula.

En la mayor parte de los líquenes foliáceos (*Parmelia s.a.*) se constituye, por debajo de la médula, un córtex inferior, de anatomía similar a la del córtex superior, pero donde las hifas suelen tener la pared oscurecida (melanina). Es probable que esta capa tenga un papel importante en la retención capilar de agua extratalina.

Isidios: proyecciones de la superficie del talo, revestidas de córtex e incluyendo las fotobiontes (algas o cianobacterias). Su color puede ser igual o diferente del resto del talo y su forma es muy variable, esférica. Verrugosa, claviforme, escumiforme. Se desprende fácilmente del talo cuando está seco, actuando como elementos de propagación vegetativa y posiblemente juegan un papel en el intercambio gaseoso con la atmósfera.

Laciniados: cada una de las ramificaciones aplanadas de los talos fruticulosos. Pueden ser lisas, alveoladas, canaliculadas o angulosas.

Macrolíquén: líquen fácilmente observable por tener un tamaño grande; suelen ser biotipos foliáceos, placodioides o escamulosos.

Micelio: talo de los hongos formado por hijas ramificadas, plectenquimático.

Micobionte: Cada uno de los hongos simbioses que participan en la formación de talos líquénicos.

Periclinal: paralelo a la superficie o a una circunferencia, curvado alrededor del eje.

Peritecio: ascoma más o menos globoso, en forma de ampolla, con un cuello largo y estrecho

Plecténquimas: falsos tejidos fúngicos muy diversos y especializados. Son formados por el micobionte, mediante entrelazamiento anastomosis, ramificación, gelatinización de las paredes celulares y, en ocasiones, agregación de las hifas, pero siempre realizados de forma postgénita, es decir, no hay zonas meristemáticas, sólo actividad de células apicales. Las formas y tamaños de las células de las hifas son muy variadas, originando, como consecuencia, plecténquimas muy diversos en cuanto a forma y consistencia.



Se reconocen los siguientes tipos: *paraplecténquimas* (están formados por hifas de células isodiamétricas, estrechamente adheridas entre sí, muy gelatinizadas o no, y donde no es posible reconocer hifas individualizadas, esto es lo que les da un aspecto parenquimático); *prosoplecténquimas* (los formados por hifas de células alargadas con pared muy gelatinizada y fusionadas de forma paralela, las secciones longitudinal y transversal son muy distintas y originan estructuras de soporte muy firmes); los tipos *aracnoides* (se componen de hifas laxamente entremezcladas, diferenciables), están en la médula y tienen funciones específicas; los plecténquimas *en empalizada* (están formados de cortas hifas con células cilíndricas, paralelas entre sí, poco aglutinadas y con la pared propia distinguible), que emergen perpendicularmente a la superficie desde la capa de fotobionte facilitando el intercambio de agua y gases.

Saxícolas: que vive sobre las rocas o las piedras.

Soralios: área delimitada en que se forman soredios.

Soredios: formados por algunos fotobiontes entremezclados y rodeados con filamentos miceliares y tienen pequeñas granulaciones de 25–100 micrómetros. Aparecen agrupados en la superficie del talo dentro áreas llamados soralios, típicamente con aspecto granuloso o pulverulento, pero siempre sin córtex. Los soredios son liberados por interrupciones de la superficie del líquen y sirven para la propagación vegetativa.

Taxonomía: Ciencia que se ocupa de distribuir los seres vivos en diversas unidades de clasificación (especie, género, familia, etc.); estrechamente ligada a la sistemática. Disciplina que busca agrupar los organismos sobre la base de similitudes y diferencias, que, según se cree, son expresiones de parentesco filogenético actual; en la actividad taxonómica se busca proveer a cada taxón de un nombre y de una descripción a través de una nomenclatura muy elaborada y específica, ya que cuanto más se conoce el vocabulario descriptivo de los caracteres, más fácil se tornan los procesos de clasificación.

Umbilicados: talo en forma de láminas o escuámulas, sin lóbulos, se adhieren al sustrato por una pequeña superficie central que en la cara superior se revela como una pequeña depresión o concavidad, el ombligo. Permite una cierta separación entre el sustrato y el líquen donde se retiene más tiempo la humedad.



BIBLIOGRAFÍA

- Amo de Paz, G., & Burgaz, A. R. (2009). *Líquenes epifítico del Hayedo de Montejo de la Sierra (Madrid)*. Madrid: Computense.
- Barreno, E., & Pérez, S. (2003). *Biología de los Líquenes*. Asturias: KRK Ediciones.
- Beyer, C. (2009). *Thamnolia vermicularis*. California: Boletín de la California.
- Brânntôn, I. O. (2012). *Vida, historia y migración de las parientes de líquen; Thamnolia vermicularis*. Suecia: Universidad de Uppala.
- Bustanza, F., & Caballero, A. (1948). Contribución al estudio de los antibióticos procedentes de líquenes. En *Anales del Jardín Botánico de Madrid* (págs. 511-548). España.
- Cabrera, S., & Giacobone, G. (2007). *Calidad del aire en la ciudad de Buenos Aires: Monitoreo de líquenes como bioindicadores de contaminación*. Buenos Aires: Agencia de Protección Ambiental. Ministerio de Ambiente y Espacio.
- Castro, O. (2002). *Estudio Fitoquímico del Líquen Thamnolia vermicularis subsp. Vermicularis s. Str.* Lima: Universidad Nacional de Ingeniería.
- Castro, O. (2010). *Contribución al estudio fitoquímico del líquen Thamnolia Vermicularis*. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, Departamento de Ciencias.
- Castro, V. (1975). *Fisiología de las Sustancias líquénicas*. Madrid: Alhambra.
- Cazar, M. S.-H. (2005). Antimicrobial butyrolactone derivatives from the Ecuadorian Soil Fungus *Aspergillus thorn Terreus* Var. *Terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1067 - 1075.
- Chaparro, M., & Aguirre, J. (2002). *Hongos Liquenizados*. Bogotá: El Malpesante S.A.
- Chaves, J. L., Lúching, R., Spiman, H., & Umaña, L. (2009). www.inbio.ac.cr. Recuperado el 15 de Enero de 2017, de www.inbio.ca.cr: <http://www.inbio.ac.cr/papers/liquenes/reproduccion.html>
- Cleodaris, R. M. (3 de Marzo de 2016). *Blogspot*. Recuperado el 3 de Marzo de 2016, de Blogspot: <http://cleobiologiavegetal.blogspot.com/>
- Consortio Herbario de Líquenes de Norteamérica. (2016). *Thamnolia Vermicularis*. Obtenido de <http://lichenportal.org/portal/taxa/index.php?taxon=120896>
- Coutiño, B., & Montáñez, A. L. (2000). *Los Líquenes*. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México.



- Cubas, P., Nuñez, J., Crespo, A., & Divakar, P. (2010). *www*.
.aulados.net. Recuperado el 15 de Enero de 2017, de www.aulados.net: s://www.aulados.net/GEMM/Documentos/San_Quintin_Innova/Liquenes_que_s on_uso.pdf
- Culberson, C. (1972). *Improved conditions and new for the identification of lichen product by standardized thin layer Chromatographic Method*. Estados Unidos: Duke University.
- Diana, M. (2015). *Estudio químico del liquen Flavopunctelia flaventior (stirt) hale. (tesis de pregrado)*. Lima-Perú.
- Echeverry, J., & Londoño, L. (9 de febrero de 2011). *Liquenes como bioindicadores del aire*. Obtenido de wordpress: <https://ilbca.wordpress.com/utilidad-de-los-liquenes/>
- Elix, F., & Sohum, J. (2014). *Images from Lichenes Australasici Exsiccati and of other characteristic Australasian Lichens*. Aranda: Editorial BoD.
- Esquivel, D. y. (2015). Estudio de la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos liquénicos obtenidos de Lobaria subdissecta y Parmotrema latissimum. *Revista Uniciencia*, 39-45.
- Frank Bungartz, A. Y. (2013). Guía rápida de líquenes de las Islas Galápagos. *Fundación Charles Darwin*, 18,19.
- Giacobone, G. G., & Cabrera, S. E. (2009). *Líquenes como Bioindicadores de calidad de aire*. Buenos Aires: Ministerio de Ambiente y Espacio.
- Goffinet, B., Rozzi, R., Lewis, L., Buck, W., & Massardo, F. (2012). *Los bosques en miniatura del Cabo de Hornos*. Magallanes: Ediciones Universidad de Magallanes. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?isbn=1574414488>
- Hawksworth, D., Iturriaga, T., & Crespo, A. (2005). Líquenes como bioindicadores inmediatos de contaminación y cambios medio ambientales en los trópicos. *Revista Iberoamericana Micología*, 71-82.
- Illana, E. (2012). Líquenes usados en medicina tradicional. *Universidad de Alcalá*(36), 163-174.
- Javier Echeverry, L. L. (9 de febrero de 2011). *Liquenes como bioindicadores del aire*. Obtenido de wordpress: <https://ilbca.wordpress.com/utilidad-de-los-liquenes/>
- Kosanié, B. R. (2015). Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. 2.
- Kuklinski, C. (1999). *Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Ediciones Omega S.A.



- Kuklinski, C. (2000). *Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega.
- Lizcano, A., & Vergara, J. (2008). *Evaluación de la actividad microbiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana Pilosa, Hesperomeles ferruginea y Passiflora manicata frente a organismos patógenos y fitopatógenos. Tesis de Grado*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Malhotra, S. S. (2008). Lichens - Role in Traditional Medicine and Drug Discovery. *The Internet Journal of Alternative Medicine*, 38 - 42.
- Mandujano, O. N. (2010). Contribución al estudio fitoquímico del líquen *Thamnolia vermicularis* subsp. *vermicularis* s.str. *SciELO*, 322-328 389-398.
- Manojlovic, N. V. (2010). HPLC analysis and cytotoxic potential of extracts from the lichen, *Thamnolia vermicularis* var. *subuliformis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 817 - 823.
- Méndez, A. (13 de Diciembre de 2010). *La Guía Química*. Recuperado el 13 de Diciembre de 2010, de La Guía Química: quimica.laguia2000.com/quimica-organica/metanol
- Méndez, A. (13 de Octubre de 2013). *La Guía Química*. Recuperado el 13 de Octubre de 2013, de La Guía Química: <http://quimica.laguia2000.com/compuestos-quimicos/cloroformo>
- MUÑOZ, O., MONTES, M., & WILKOMIRSKY, T. (2004). *Plantas Medicinales de uso en Chile. Química y Farmacología*. Santiago de Chile: Universitaria S.A.
- Murray, P. e. (2009). *Microbiología médica*. Barcelona-España: Elsevier.
- Neli Kika Honda, K. G. (2016). Screening of Lichen Extracts Using Tyrosinase Inhibition and Toxicity Against *Artemia salina*. *Orbital: The electronic Journal of Chemistry*, 184.
- NINO, C. M., & CASTRO MANDUJANO, O. N. (2002). *Estudio Fitoquímico del Líquen Thamnolia vermicularis subsp. Vermicularis s. Str.* LIMA: UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA PROFESIONAL DE QUIMICA.
- Núñez, C. (Agosto de 2008). Recuperado el Julio de 2017, de <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-extraccinconequiposoxhlet.pdf>
- Oscar E. Rodríguez A., W. A. (2015). Actividad antimicrobiana de líquenes de la cuenca alta del río Bogotá. *Artículo original producto de la investigación*, 65-72.
- Oscar E. Rodríguez A., W. A. (2015). Artículo original producto de la investigación. *Actividad antimicrobiana de líquenes de la cuenca alta del río Bogotá*, 65-72.



- Picazo, J. J. (2000). *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad de los antimicrobianos*. España.
- Pronto, O. ..., Haesook, J. ..., Kwang, L., & Young, J. y. (2006). Antifungal activity of lichen-forming fungi isolated from korean and chinese lichen species against plant pathogenic fungi. *Scielo*, 381-385.
- Raankovié, M. K. (2015). Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. 2.
- Raisman, D. S., & Gonzalez, D. M. (2013). *www.biologia.edu.ar*. (U. N. Nordeste, Editor) Recuperado el 16 de enero de 2017, de [www.biologia.edu.ar: http://www.biologia.edu.ar/basicos/sobre_estos_hipertextos.htm](http://www.biologia.edu.ar/basicos/sobre_estos_hipertextos.htm)
- Rankovic, B. (2015). *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive properties and pharmaceutical potential*. (J. Cabrera, Trad.) Servia: Springer.
- Rehino, L. D., & A., P. (1968). *Progress in Phytochemistry*. Pergamon.
- Rivera Ortiz, E. I. (2008). *Estudio de Líquenes como indicadores de los niveles de contaminación en el Pueblo de Guayama Puerto Rico*. Gurabo: Universidad del Turabo.
- Robles, J., Morales, P., & Pastor, A. (1992). Líquenes y sustancias líquénicas. *Revista de Química*, 65-76.
- Rubén Lijteroff, L. L. (2009). Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en la ciudad de San Luis, Argentina. *Revista internacional de contaminación ambiental*.
- Salazar, M. (2012). *Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología general*. México: CBS.
- Seoun, J., Hye, J., & Kwang, M. y. (2003). Isolation, cultivation and antifungal activity of lichen-forming fungus *Heterodermia* sp. *Scielo*, 75-78.
- Shrestha, G., Raphael, J., & Leavitt, S. (2014). *In vitro evaluation of the antibacterial activity of extracts from 34 species of North American lichens*. Brooklyn, NY: Board.
- Suberu, H. (2004). Preliminary studies of inhibitions in *Aspergillus flavus* with extracts of two lichens and Bentex-T fungicide. *Scielo*, 468-472.
- Vaillant Flores, D. I. (2014). FITOSANIDAD: Los líquenes, una alternativa para el control de fitopatógenos. *Red de revistas Científicas de América Latina*, 51-57; 54-56; 18, 52.
- Valencia, M. C., & Ceballos, J. A. (2012). *Hongos liquenizados*. Colombia- Bogotá : El Malpensante S.A.



Vernon, A. (1993). *The lichenes symbiosis Jhon Wiles & Sores*. España.

Yousuf, S. e. (2014). *Química y propiedades biológicas del liquen*. Jeddah, Arabia Saudita: Elsevier.





ANEXOS

Cálculos de rendimiento

○ **Metanol** % R = $\frac{2,37}{20} \times 100 = 11,85$

20 gramos de
biomasa

○ **Cloroformo** % R = $\frac{0,23}{20} \times 100 = 1,15$

○ **Acetato de Etilo** % R = $\frac{0,49}{20} \times 100 = 2,45$

○ **Hexano** % R = $\frac{0,18}{20} \times 100 = 0,9$

Cálculos de los medios de cultivo

- ✓ Medio de cultivo para bacterias

Agar Nutritivo

20g agar base

1g peptona

0.5g NaCl

1L

Agar base

20g 1000ml

X 200ml

X= 4g



Peptona

1g 1000ml

X 200ml X= 0.2g

NaCl

0.5g 1000ml

X 200ml X= 0.1g

Medio de cultivo para hongos

Agar Sabouraud

65g 1000ml

X 200ml X=13g

Equipos usados para los ensayos

- Balanza analítica



Marca: BOECO Germany

Ubicación: Laboratorio de biotecnología de la Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Campus Balzay

➤ Rotavapor



Marca: HEIDOLPH

Tipo: LABOROTA 4000 EFFICIENT

N° de serie: 030923122

Procedencia: Austro químicos

Ubicación: Laboratorio de biotecnología de la Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Campus Balzay

➤ Equipo Soxhlet



Ubicación: Laboratorio de biotecnología de la Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Campus Balzay

➤ Autoclave



Ubicación: Laboratorio de biotecnología de la Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Campus Balzay

➤ Triturador para la biomasa



Marca: HOLSTEIN HOUSEWARES

Ubicación: Laboratorio de biotecnología de la Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Campus Balzay



Ensayos realizados por duplicados

K. pneumonie

Extractos y antibióticos	R1	R2	Promedio
Hexano	0 mm	0 mm	0 mm
Acetato de etilo	24 mm	26 mm	25 mm
Cloroformo	0 mm	0 mm	0 mm
Metanol	17 mm	17 mm	17 mm
Norfloxacino	30 mm	30 mm	30 mm
Fosfomicina	15 mm	15 mm	15 mm
Ciprofloxacino	30 mm	30 mm	30 mm
Control de solvente (metanol)	0 mm	0 mm	0 mm

P. aeruginosa

Extractos y antibióticos	R1	R2	Promedio
Hexano	0 mm	0 mm	0 mm
Acetato de etilo	35 mm	34 mm	35 mm
Cloroformo	0 mm	0 mm	0 mm
Metanol	25 mm	23 mm	24 mm
Norfloxacino	30 mm	30 mm	30 mm
Fosfomicina	15 mm	15 mm	15 mm
Ciprofloxacino	0 mm	0 mm	0 mm
Control de solvente (metanol)	0 mm	0 mm	0 mm



P. crysogenum

Extractos	R1	R2	Promedio
Hexano	0 mm	0 mm	0 mm
Acetato de etilo	35 mm	34 mm	35 mm
Cloroformo	21 mm	20 mm	21 mm
Metanol	26 mm	24 mm	25 mm
Control con solvente (metanol)	0 mm	0 mm	0 mm

A. Fumigatus

Extractos	R1	R2	Promedio
Hexano	20 mm	22 mm	21 mm
Acetato de etilo	17 mm	17 mm	17 mm
Cloroformo	0 mm	0 mm	0 mm
Metanol	0 mm	0 mm	0 mm
Control con solvente (metanol)	0 mm	0 mm	0 mm







CHROM. 6178

IMPROVED CONDITIONS AND NEW DATA FOR THE IDENTIFICATION OF LICHEN PRODUCTS BY A STANDARDIZED THIN-LAYER CHROMATOGRAPHIC METHOD

CHICITA F. CULBERSON

Duke University, Durham, N.C. 27706 (U.S.A.)

(Received April 24th, 1972)

SUMMARY

A standardized method for the identification of compounds by thin-layer chromatography uses three solvent systems and R_F classes coded on punched cards. This method, applied to the study of secondary products of lichen-forming fungi, has been improved and expanded to include easily prepared hydrolysis and O-methylation products. The data reported allow the confirmation of many substances previously difficult to identify and the proposal of structures for certain types of new compounds extracted from fragments of herbarium specimens. New data are given for 220 compounds and derivatives chromatographed in three standard solvent systems.

INTRODUCTION

The standardized method for the identification of lichen products described in 1970¹ has been used successfully for routine analyses of lichen fragments for taxonomic and phytochemical studies²⁻⁷. For this method, unknown substances are chromatographed under controlled conditions in three standard solvent systems. The resultant spots are assigned to one of eight R_F classes, which are determined on each chromatogram by the R_F values of a control mixture of two common lichen products, atranorin and norstictic acid. Each compound will have a set of three R_F classes determined by its chromatographic behavior in the three standard solvent systems. The R_F classes are reproducible under considerably varying conditions and over a reasonably large range of actual R_F values. A deck of punched cards, keyed by R_F classes and containing a card for every compound that is potentially identifiable, is sorted to give all known substances that could possibly correspond to the unknown. The cards for the compounds have additional data that allow the initial possibilities to be narrowed. Although this method was developed for the identification of lichen products, the use of R_F classes, standard solvent systems and punched cards could be applied to any chromatographic problem involving the identification of a large and ever-increasing number of compounds.

Many of the lichen compounds are esters of phenolic acids and are easily hydrolyzed with concentrated sulfuric acid. This reaction has been used extensively for proofs of the structures of depsides and tridepsides and was adapted to a micro-

J. Chromatogr., 72 (1972) 113-125



scale, paper chromatographic procedure by WACHTMEISTER⁸. Acidic hydrolysis permits the identification of a number of compounds that are difficult to distinguish. As the hydrolysis products chromatograph very well in the standard solvent systems used to identify the unhydrolyzed compounds, it is possible to assign R_F classes to these compounds and to incorporate punched cards for them directly into the original deck prepared for the unhydrolyzed lichen products. In the same way, cards can be included for O-methylated compounds, which are easily obtained on a small scale by using diazomethane. Finally, acidic hydrolysis of these O-methyl derivatives can provide further evidence of the identity of compounds as well as establish the order of linkage of phenolic acid units in simple depsides.

This paper describes improved conditions for the chromatography of crude lichen extracts and reviews useful methods for preparing hydrolysis products and O-methylated derivatives. Chromatographic data and R_F classes are given for 149 lichen products, 37 hydrolysis products of depsides, 24 O-methylated derivatives and 10 miscellaneous derivatives of non-depside lichen compounds determined by thin-layer chromatography (TLC) in the three standard solvent systems.

MATERIALS AND METHODS

Sources of compounds

Pure lichen substances were used whenever they were available. Otherwise, standards consisted of micro-extracts of herbarium specimens. Hydrolysis and O-methylation reactions were studied only for compounds that were available in a reasonably pure state and for some simple mixtures for which the results could be easily interpreted.

Chromatographic materials and solvent systems

Chromatograms are developed in standard Brinkman tanks to a height of 10 cm on Merck pre-coated Silica Gel F₂₅₄ TLC plates (layer thickness 0.25 mm) that are stored in a desiccator over CaCl₂-NaOH but not activated. The plates are cut to a size of 20 × 12.5 cm, and the starting line is 2 cm from the bottom (20 cm) edge of the plate. With 230 ml of solvent in the tank, the distance from the solvent surface to the origin line is 1 cm.

The compositions of the standard solvent systems have been modified so as to give a greater spread of R_F values. The new solvent systems are: (A) benzene-dioxane-acetic acid (180:45:5, 230 ml); (B) hexane-diethyl ether-formic acid (130:80:20, 230 ml); and toluene-acetic acid (200:30, 230 ml). The organic solvents were purified as previously described¹ but, within reasonable limits, the purity of the solvents does not affect the R_F classes observed for the compounds. The solvent systems were used repeatedly until the R_F values of the atranorin and norstictic acid controls drifted appreciably beyond the ranges observed on the chromatograms used for the original determinations of the R_F classes and of other data stored on punched cards.

In the present study, the tank containing solvent A had a filter-paper liner extending 8.5 cm above the level of the solvent, and plates were run with the SiO₂ layer facing the filter-paper. For solvents B and C, no paper was used, and the chromatographic layer faced the center of the tank. No more than one plate was run in

J. Chromatogr., 72 (1972) 113-125



a tank at the same time. The development time was 45–55 min in all three solvent systems. All tanks were insulated from temperature fluctuations, which are the principal cause of uneven solvent fronts and fluctuating R_F values along the width of the plates. As the control mixture was chromatographed at three positions on every plate¹, it was easily determined that, under the present conditions, R_F values usually varied by less than two $R_F \times 100$ units along the width of any plate.

The chromatograms were viewed in short and long wave length UV light, sprayed with 10% H_2SO_4 and heated to 110° for 15–30 min to make the spots of aromatic and alicyclic compounds visible. Spots of fatty acids were located by wetting the plates in water and observing opaque spots as the plates dried on the black surface of a slide-warming table.

The control mixture of atranorin and norstictic acid is obtained by extracting a fragment of *Parmelia perforata* (Jacq.) Ach., *P. acetabulum* (Noeck.) Duby, or any other species that contains these compounds and is readily available. This acetone extract can be concentrated and conserved in a capped vial. Approximately equal amounts of the solution are applied to the control spots on each plate. The observable decomposition of the compounds in the solution is too slow to cause problems.

Microhydrolysis of pure compounds and of lichen extracts

Samples (0.1–0.3 mg) of pure compounds or crude lichen extracts are dissolved in concentrated H_2SO_4 (3–6 drops) in a shell vial, and the solution is cooled in a freezer for 15–30 min. Crushed ice is added to the vial and the hydrolysis products are extracted with diethyl ether. Three successive ethereal extracts are drawn off with a pipette and evaporated on a microscope slide. The residue is chromatographed in the three standard solvent systems, using controls of atranorin and norstictic acid to establish the R_F classes of the spots that separate. The unhydrolyzed compound or crude residue is run besides the hydrolyzed material to allow the identification of unhydrolyzed material, but usually hydrolysis is complete if care is taken to dissolve completely all the solid in the concentrated H_2SO_4 before the solution is placed in the freezer. 4-Hydroxy-2-methoxybenzoic acid derivatives are easily decarboxylated and this property may complicate the results. Decarboxylation reactions are minimized by using crushed ice rather than water to dilute the H_2SO_4 solutions before extraction with diethyl ether. The decarboxylation products chromatograph well, however, and punched cards can be included for them in the deck.

Chromatograms of hydrolyzed crude extracts must be interpreted with caution. When the compound of interest is mixed with a significant amount of other hydrolyzable phenolic materials, the substances should first be separated by preparative-layer or high-speed column chromatography⁹. When methyl esters of lichen depsides are hydrolyzed, complete hydrolysis of the depside ester linkage is usually accompanied by partial hydrolysis of the methyl ester linkage. To avoid confusion, the original depside, its methyl ester and the hydrolysis products of the free depside and of the depside methyl ester are chromatographed on the same plates.

O-Methylation of pure compounds and of lichen extracts

Compounds and crude residues (2–10 mg) were dissolved in diethyl ether (0.5–1 ml) in a small vial and treated by a drop-by-drop addition of an ethereal solution of diazomethane until a faint yellow color barely persisted. For simple



orcinol-type depsides, the free carboxylic acid is methylated immediately at room temperature or at 0°, a free 4-hydroxyl group is methylated in about 10 min at room temperature, and free 2- or 2'-hydroxyl groups are methylated only after prolonged treatment at room temperature. In the present study, only methylations of free carboxylic acids and free 4-hydroxyl groups were attempted on crude residues.

At the end of the reaction period, the ethereal solution was evaporated on a microscope slide and the residue was chromatographed. Owing to the extreme toxicity of diazomethane, all of these operations must be carried out in an efficient hood. Ethereal solutions that retain a yellow color or those that contain pigments that mask the color of the diazomethane are treated with a drop of acetic acid just before evaporation of the solvent. Compounds that are only slightly soluble in diethyl ether can be methylated in acetone-diethyl ether solutions.

RESULTS AND DISCUSSION

For the solvent systems used in the present study, increasing the concentration of solvent vapor in the atmosphere of the tank by lining the inside walls with filter-paper leads to decreased resolution and increased tailing of the spots, although the reproducibility of R_F values is increased. As the standardized method uses R_F classes determined on each plate by a control mixture, accurate reproducibility of actual R_F values is not required. For this reason, full advantage can be taken of the improved resolution obtained with lower solvent vapor concentrations. The conditions suggested in the present study allow several pairs of compounds to be distinguished that previously could not be separated by TLC.

Table I summarizes the results obtained under the improved conditions by TLC of many of the most common lichen products of known chemical structure and of a number of "unknown" substances that are easily detectable. The compounds are arranged in the table by R_F classes in the three solvent systems in the order A, then B, then C. Chromatographically similar compounds frequently occur close together in the list, but substances with corresponding R_F classes in solvents B and C and different R_F classes in solvent A are not grouped together in the table. In practice, it is frequently necessary to sort by R_F classes in only two solvent systems because spots may overlap or be indistinguishable in the third solvent. Compounds with the same R_F classes in solvents B and C can be sorted out at once with a deck of punched cards but not so readily with tables of R_F data.

All R_F values are quoted with the corresponding measurements to the norstictic acid and atranorin lines determined by the method previously described¹. The ranges of R_F values observed for these two control substances is least in solvents A and C. Solvent B must be renewed frequently to maintain the $R_F \times 100$ value of norstictic acid within the range 26-34. Freshly prepared solvent gives higher $R_F \times 100$ values for norstictic acid for one or two chromatograms and then stabilizes at a value near 30. When the $R_F \times 100$ value of norstictic acid falls below 26, the solution is replaced. Similarly, the $R_F \times 100$ values of norstictic acid in solvents A and C are maintained in the ranges 37-44 and 27-34, respectively. These rather large fluctuations in R_F values are not a problem because the R_F classes of the substances being identified rarely change. Compounds that run close to the border between two classes and that

J. Chromatogr., 72 (1972) 113-125



TABLE I
TLC DATA FOR 149 LICHEN PRODUCTS CHROMATOGRAPHED IN THREE SOLVENT SYSTEMS

<i>R_F</i> class			Compound	example, <i>R_F</i> × 100 values (<i>R_F</i> of N/ <i>R_F</i> of N, <i>R_F</i> of A ^a)		
A	B	C		A	B	C
1	1	1	Rhodocladonic acid	0	0	0
1	1	1	Consalazinic acid	2/39, 72	1/20, 70	0/27, 77
1	3	2	Fumarprotocetraric acid	1/41, 73	25/28, 75	7/29, 77
1-2	3	1	Unknown Q with hypoprotocetraric acid	3/42, 75	10/32, 77	2/31, 78
1-2	3	2	Protocetraric acid	3/40, 74	19/30, 77	4/28, 78
1-2	3	2	Sublimbatic acid	4/42, 72	23/34, 80	10/30, 79
1-2	3	2-3	Thamnolic acid	3/42, 76	23/32, 79	13/28, 79
1-2	3	3	Hypothamnolic acid	4/40, 75	25/30, 77	18/28, 79
1-2	4	1-2	Caperatic acid	4/41, 78	27/29, 76	6/34, 81
1-2	5	1-3	Unknown red pigment ^b	19/42, 73	38/28, 79	19/27, 78
2	1	1-2	Constictic acid	7/42, 77	3/34, 79	3/28, 80
2	1-2	1	Erythrin	6/41, 76	8/32, 79	1/30, 77
2	1-2	1-2	Unknown in <i>Ochrolechia</i> spp.	8/42, 73	4/27, 78	2/27, 78
2	2	1-2	Porphyritic acid	9/41, 75	11/30, 75	6/30, 78
2	2	1-2	Unknown PQ-4 ^c	15/43, 76	7/32, 77	4/29, 77
2	2	2	Unknown ^d	11/42, 73	5/28, 78	9/27, 78
2	2	2	Salazinic acid	10/39, 72	7/30, 74	4/28, 77
2	2	2	Connorstictic acid	11/39, 72	11/30, 74	2/28, 77
2	2	2	Variolaric acid	18/42, 76	13/30, 77	8/28, 80
2	2-3	2	Unknown S-2 with stictic acid	14/40, 73	14/26, 76	10/29, 79
2	3	3	Decarboxythamnolic acid	5/42, 76	25/33, 79	18/28, 79
2	3	3	Squamatic acid	10/42, 76	25/30, 74	25/29, 78
2	3-4	2	Unknown ^e	0/42, 70	27/30, 77	0/28, 80
2	3-4	2	Pannaric acid	8/42, 77	28/30, 74	9/28, 79
2	4	2	Endocrocin	8/40, 76	33/32, 79	8/29, 77
2	4	2	Echinocarpic acid	11/41, 77	33/32, 79	11/29, 78
2	4	2	Siphulin	14/42, 77	27/27, 77	4/29, 78
2	5	2	Pulvinic acid	4/42, 77	36/27, 76	7/29, 80
2	5	2	Barbatolic acid	7/43, 75	48/33, 77	19/31, 77
2	5	2	Conpsoromic acid	15/41, 75	36/30, 77	12/28, 80
2	5	2-3	Unknown with hypoprotocetraric acid ^f	10/41, 75	30/30, 77	14/27, 79
2	5	3	Physodalic acid	10/43, 77	31/27, 76	19/29, 80
2	5	3-4	Unknown with echinocarpic acid	18/41, 77	38/32, 79	27/29, 78
2	5	4	Haemathamnolic acid	15/40, 74	35/29, 77	27/28, 79
2-3	3-4	2-3	Unknown with protocetraric acid	19/42, 74	32/34, 82	14/28, 78
2-3	3-4	3	Unknown PQ-2 ^g	22/42, 75	25/27, 76	18/28, 78
2-3	4-5	2-3	Unknown dibenzofuran (?) ^h	22/42, 72	37/34, 80	18/30, 79
2-3	5	2-3	Diploschistesic acid	21/43, 75	39/32, 80	13/28, 79
1-3	1-2	3	Haemoventosin	33/42, 73	2/27, 78	17/27, 79
3	2-3	3	Galbinic acid	29/41, 75	12/29, 77	16/28, 79
3	2	3	Lopraric acid	27/40, 74	11/30, 77	21/28, 78
3	2	3	Stictic acid	32/42, 77	9/27, 77	18/28, 78
3	3	2	Arthoniac acid	31/37, 73	15/28, 76	13/29, 79
3	3	2	Unknown PQ-2 ^o	34/43, 76	27/32, 77	8/29, 77
3	3-4	5	Unknown in <i>Lecanactis</i> spp.	21/42, 76	32/33, 79	41/28, 79
3	4-5	2-3	Alectoronic acid	33/43, 75	34/33, 76	17/31, 77
3	5	3	Unknown PQ-3 ^o	25/44, 76	42/32, 77	20/29, 77
3	5	3	Physodic acid	25/42, 74	35/27, 76	18/29, 79
3	5	3	Gyrophoric acid	24/40, 74	42/30, 77	24/28, 79
3	5	3	Hypoprotocetraric acid	25/40, 75	43/29, 77	22/28, 79
3	5	3	Unknown PQ-1 ^o	29/42, 73	32/27, 76	24/28, 78
3	5	3	Lecanoric acid	28/40, 75	44/30, 79	22/28, 79
3	5	3	Olivetoric acid	34/40, 76	37/28, 76	22/28, 78
3	5	4	Norobtusatic acid	27/40, 76	50/28, 76	30/28, 79

(Continued on p. 118)



TABLE I (continued)

<i>R_F</i> class			Compound	Example, <i>R_F</i> × 100 values (<i>R_F</i> of X/ <i>R_F</i> of N, <i>R_F</i> of A ⁰)		
A	B	C		A	B	C
3	5	4-5	Lividic acid	32/40, 74	33/29, 77	31/28, 78
3	5	5	Rangiformic acid	20/41, 78	38/29, 76	23/28, 80
3	5	5	Lobaric acid	30/40, 75	46/29, 76	38/29, 80
3	5	5	Picrolichenic acid	38/43, 77	39/27, 76	36/29, 79
3	5	5	Protolicheterinic acid	35/40, 75	47/29, 70	37/28, 81
3	5	5	Psoromic acid	36/41, 73	41/27, 75	41/29, 76
3	5	5	4-O-Methylphysodic acid	37/41, 74	43/28, 76	40/27, 76
3	5-6	4	Alctorialic acid	39/43, 74	48/29, 75	30/28, 77
3	5-6	5	4-O-Methylgyrophoric acid	32/40, 75	56/28, 76	46/29, 80
5	6	5	Virensic acid	26/42, 76	57/30, 77	38/28, 80
3	6	5	Obtusatic acid	35/40, 76	64/29, 76	48/28, 78
3-4	3	3	Strepsilin	41/42, 78	21/27, 77	24/28, 78
3-4	5	5	Baeomycesic acid	39/42, 76	40/32, 79	42/28, 79
3-4	6	4-5	Anziaic acid	40/42, 76	59/29, 74	33/28, 76
3	4	5	Evernic acid	38/41, 76	61/32, 79	43/29, 77
3-4	6	5	Granyanic acid	38/40, 75	62/30, 77	44/28, 79
1-4	1-4	1-4	Polyporic acid	43/41, 73	28/27, 75	27/29, 76
4	2	2	Chromone (?) with lepranic acid	39/40, 74	4/29, 77	12/28, 79
4	4	4	Norstictic acid	—	—	—
4	4	4	4-O-Demethylplanaic acid	12/11, 74	32/31, 76	27/27, 76
4	5	4-5	Paludosic acid	39/41, 73	35/27, 75	33/30, 76
4	5	5	Glomelliferic acid	41/41, 73	43/28, 76	42/28, 77
4	5	5	α-Collatolic acid	40/41, 73	32/28, 75	35/28, 77
4	5	5	Miriquidic acid	41/42, 76	48/28, 76	45/29, 78
4	6	5	4-O-Demethylbarbatic acid	39/41, 77	60/32, 79	30/29, 78
4	6	5	Roccollic acid	42/41, 75	60/29, 77	48/28, 80
4	6	5	Colensoinic acid	40/41, 73	73/34, 79	42/28, 80
4	6	5-6	Sekkianic acid	45/42, 78	57/27, 77	51/28, 79
4	6	5-6	Diffractaic acid	44/42, 76	64/32, 80	51/28, 78
4	6	5-6	Barbatic acid	44/42, 77	69/27, 75	52/29, 78
4	6-7	5-6	Divaricatic acid	39/30, 73	75/32, 80	51/29, 78
4	6-7	5-6	Didymic acid	44/42, 75	77/32, 80	52/28, 78
4-5	3-4	5	Schizopeltic acid	42/37, 75	27/30, 74	51/32, 79
4-5	5	3	Rhodophyscin	44/42, 77	32/27, 76	23/29, 76
4-5	5	5	Microphyllinic acid	43/40, 76	35/28, 76	42/28, 79
4-5	6	5-6	Homosekikaic acid	47/42, 72	69/33, 79	50/29, 77
4-5	6-7	5-6	Imbricatic acid	43/42, 76	75/29, 77	48/27, 80
4-5	6-7	5-6	Stenosporic acid	45/42, 77	73/27, 77	54/29, 78
4-5	7-8	5-6	Perlatolic acid	44/43, 73	74/29, 73	52/28, 76
1-5	1-3	1-4	Entothein	47/43, 75	16/29, 76	25/29, 76
5	2-3	3	Yellow-green pigment SV-1 ¹	48/43, 75	30/32, 76	21/30, 76
5	4	4-5	Unknown PQ-1 ²	50/43, 76	33/32, 77	32/29, 77
5	5	3	Unknown in <i>Sticta</i> spp.	47/42, 72	43/33, 79	24/30, 79
5	5	3	Nerlobaridone	50/40, 76	36/28, 76	21/29, 79
5	5	5	2'-O-Methylanziaic acid	46/42, 73	40/28, 73	34/29, 76
5	5	5	Planatic acid	52/43, 73	38/28, 77	50/29, 79
5	5	5	Confluentic acid	54/43, 74	32/28, 76	48/29, 79
5	5	5	Zeorin	55/41, 76	42/30, 77	43/28, 80
5	5-6	5	Cryptochlorophanic acid	40/42, 77	40/34, 79	37/28, 80
5	5-6	5-6	2'-O-Methylperlatolic acid	55/43, 74	50/28, 73	52/28, 76
5	6	5	Licheterinic acid	41/41, 75	63/29, 77	43/28, 80
5	6	5	Thiophanic acid	55/41, 73	56/30, 80	52/29, 79
5	6	5	Merochlorophanic acid	55/40, 75	56/28, 76	61/29, 80
5	6	5	Ergosterol	50/40, 70	60/32, 79	49/29, 77
5	6	5	Emodin	57/40, 77	61/32, 80	39/28, 77

(Continued on p. 119)



IDENTIFICATION OF LICHEN PRODUCTS BY TLC

119

TABLE I (continued)

<i>R_F</i> class			Compound	Example, <i>R_F</i> × 100 values (<i>R_F</i> of X/ <i>R_F</i> of N, <i>R_F</i> of A ^a)		
A	B	C		A	B	C
5	6	5-6	2-O-Methylperlatolic acid	48/44. 75	60/28. 76	52/29. 79
5	6	5-6	Ursolic acid	50/42. 77	50/27. 77	52/29. 78
5	7	5-6	Sphaerophorin	48/42. 76	76/30. 77	54/29. 76
5-6	5	5	Unknown triterpenol	58/43. 75	34/29. 76	42/29. 76
5-6	5	5	Losodin	38/40. 76	40/28. 76	33/28. 79
5-6	5	5-6	Pseudoplacodiolic acid	60/41. 75	52/34. 80	56/29. 78
5-6	6	5	Evans's substance H	54/40. 75	61/29. 76	48/28. 81
6	3	5	Acetylportentol	65/42. 76	29/34. 79	45/29. 80
6	5	5	Methyl gyrophorate	60/40. 75	44/28. 76	43/29. 80
6	5	5	Triterpene in <i>Physcia</i> spp.	64/42. 72	43/33. 80	44/30. 70
6	5	6	Gangaleoidin	64/40. 74	43/29. 77	54/28. 79
6	5	6	Rhizocarpic acid	73/43. 76	41/29. 76	66/29. 78
6	6	5	Ethyl orsellinate	62/41. 71	66/28. 79	44/29. 77
6	6	6	4-O-Methylerythrochlorophaeic acid	60/40. 75	61/28. 76	66/29. 80
6	6	5	Unknown triterpene (?) ^k	67/42. 72	53/33. 79	46/30. 78
6	6	6	Placodiolic acid	67/42. 76	63/26. 77	67/27. 80
6	6	6	Thiophanic acid	65/40. 73	68/30. 80	65/29. 77
6	6	6	Sorobiculin	60/42. 78	55/27. 77	52/28. 70
6	6	6	Methyl 3,5-dichlorolecanorate	67/40. 75	62/28. 76	66/29. 80
6	6	6	Usnic acid	70/42. 76	70/26. 77	71/27. 79
6	6-7	6	Diploicin	64/41. 76	79/32. 80	66/28. 78
6-7	5	6	Nephroarctin	69/42. 73	53/28. 79	66/27. 78
6-7	5-6	6	Epanorin	74/40. 76	52/32. 79	66/29. 77
6-7	7	6	Vicanicin	73/42. 75	75/30. 77	70/28. 80
6-7	7-8	6-7	Fragilin	73/41. 76	82/32. 79	72/29. 77
7	6	7	Pinastric acid	72/41. 73	57/28. 76	76/27. 76
7	6	7	Pannarin	73/41. 73	68/27. 75	76/27. 76
7	6	7	Leprapinic acid	74/40. 75	59/29. 77	81/28. 79
7	6	7	Lichexanthone	74/40. 74	72/29. 77	78/28. 78
7	6	7	Tenuiorin	77/42. 77	58/27. 77	76/28. 79
7	6	7-8	Parietin	74/41. 73	72/28. 76	77/27. 76
7	6	7-8	Unknown with pannarin ^l	72/38. 73	69/33. 78	75/28. 77
7	6	8	Vulpinic acid	76/42. 77	66/27. 77	82/29. 78
7	7	7	Atranorin			
7	7	7	Chloroatranorin	76/42. 77	79/34. 79	80/27. 80
7	7-8	8	Calycin	79/42. 77	81/34. 79	88/27. 80
7	8	8	Pink pigment in <i>Asahinea</i> spp.	70/41. 76	84/33. 79	80/30. 78
7	8	8	Pink pigment ^m	73/42. 72	86/34. 80	87/29. 78
7-8	6	6-7	Unknown CS-1 ⁿ	77/41. 75	51/20. 77	76/28. 80
8	8	8	Pulvinic dilactone	77/41. 74	82/28. 75	89/27. 76

^a The two numbers following the oblique (/) are measurements in millimeters to the norstictic acid line (*R_F* of N) and the atranorin line (*R_F* of A) (ref. 2).

^b In *Melanotheca cruenta* (Mont.) Müll. Arg.

^c In *Parmelia quintaria* Hale.

^d In *Parmelia chalybeiformis* (R. Stein. & Zahlbr.) Gyeln.

^e In *Alectoria virens* Tayl.

^f In *Parmelia weberi* Hale.

^g In *Pertusaria panyrga* (Ach.) Mass.

^h In *Lepraria* spp.

ⁱ A common accessory pigment in lichens.

^j In *Dirinaria aegialita* (Ach.) B. Moore.

^k In *Pyxine caesiopruinosa* (Nyl.) Imsh.

^l In *Loecanora* spp.

^m In *Solenopsis candicans* (Dicks.) J. Stein.

ⁿ In *Cladonia subcariosa* Nyl.



might consequently change in R_F class are keyed on the punched cards for both possibilities.

Comparison of R_F values that are quoted with respect to the corresponding values of norstictic acid and atranorin can be made with considerable confidence. The R_F values of norstictic acid are more important for comparisons of low- R_F compounds and the behavior of atranorin is more important for comparisons of high- R_F compounds, but both controls are always quoted because this gives a better picture of the total character of the chromatograms involved.

TABLE II

TLC DATA FOR 37 HYDROLYSIS PRODUCTS OF NATURALLY OCCURRING DEPSIDES AND THEIR O-METHYLATED DERIVATIVES

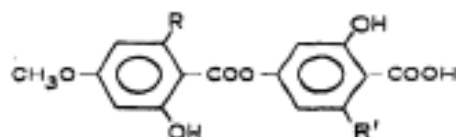
R_F class	substitution						Example, $R_F \times 100$ values (R_F of X R_F of N, R_F of A ^a)					
	A	B	C	1	2	3	4	5	6	A	B	C
1-2	2	2	COOH	HO	COOH	CH ₃ O	H	CH ₃		3/43.75	11/29.75	7/29.
2-3	4-5	3	COOH	HO	HO	CH ₃ O	H	C ₂ H ₅		26/38.73	32/30.75	22/29.
2-3	6	5	COOH	HO	Cl	HO	Cl	CH ₃		20/42.73	60/27.76	31/29.
3	3	2	COOH	CH ₃ O	H	HO	H	CH ₂ COC ₂ H ₅	H ₁₁	24/44.76	21/28.76	7/29.
3	3	2-3	COOH	CH ₃ O	H	HO	H	CH ₃		27/40.75	22/29.77	13/27.
3	4	3	COOH	CH ₃ O	H	HO	H	C ₂ H ₅		33/40.74	29/29.77	20/28.
3	5	3	COOH	HO	HO	HO	H	C ₂ H ₅	H ₁₁	32/40.76	49/34.77	23/29.
3-4	5	3-4	COOH	CH ₃ O	H	HO	H	C ₂ H ₅	H ₁₁	40/42.73	31/28.77	27/29.
3-4	5	3-4	COOH	HO	H	HO	H	CH ₃		40/43.74	49/30.77	28/29.
4	4-5	5	COOH	CH ₃ O	H	CH ₃ O	H	CH ₃		41/40.75	32/29.77	44/29.
4	5	3	H	HO	H	HO	H	CH ₃		42/41.76	37/28.76	17/28.
4	5	5	COOH	CH ₃ O	CH ₃	CH ₃ O	H	CH ₃		45/41.75	48/30.78	50/29.
4	6	4	COOH	HO	H	HO	H	C ₂ H ₅		41/40.76	58/33.77	32/29.
4-5	6-7	5-6	COOH	HO	H	CH ₃ O	H	CH ₂ CH ₂ COC ₂ H ₅		45/42.74	74/27.76	53/29.
5	4-5	4	COOCH ₃	CH ₃ O	H	HO	H	CH ₃		48/40.75	31/29.77	28/29.
5	5	5	COOH	CH ₃ O	H	CH ₃ O	H	C ₂ H ₅		47/40.74	41/29.77	50/29.
5	5	5	COOCH ₃	HO	HO	HO	H	C ₂ H ₅		51/42.75	48/29.76	35/29.
5	5	5	COOCH ₃	HO	CH ₃ O	HO	H	C ₂ H ₅		56/42.75	37/29.76	45/29.
5	5	5	COOCH ₃	CH ₃ O	H	HO	H	C ₂ H ₅		55/40.74	40/30.75	35/29.
5	5	5-6	COOH	CH ₃ O	H	CH ₃ O	H	C ₂ H ₅	H ₁₁	51/40.75	46/29.77	53/29.
5	6	4-5	COOH	HO	H	HO	H	C ₂ H ₅	H ₁₁	45/42.74	58/27.76	35/29.
5	6	5	COOH	HO	CH ₃	HO	H	CH ₃		45/42.73	60/30.74	42/29.
5	6	5	COOH	HO	H	HO	H	C ₂ H ₅		44/39.75	68/33.77	38/29.
5	6	6	COOH	HO	H	CH ₃ O	H	CH ₃		48/43.74	70/33.77	50/29.
5	7	6	COOH	HO	CH ₃	CH ₃ O	H	CH ₃		52/42.73	75/29.75	60/29.
5	7	6	COOH	HO	H	CH ₃ O	H	C ₂ H ₅		50/30.75	75/30.75	60/29.
5-6	5	5	COOCH ₃	CH ₃ O	H	HO	H	C ₂ H ₅	H ₁₁	56/40.75	43/29.77	36/27.
5-6	5-6	5	COOH	HO	H	HO	H	CH ₂ COC ₂ H ₅	H ₁₁	59/41.77	54/28.76	39/30.
5-6	7-8	6	COOH	HO	H	CH ₃ O	H	C ₂ H ₅	H ₁₁	56/42.74	78/27.76	60/29.
6	5	3	COOCH ₃	CH ₃ O	HO	CH ₃ O	H	C ₂ H ₅		62/43.75	38/29.76	46/29.
6	6	5	COOCH ₃	HO	H	HO	H	CH ₃		58/30.73	60/29.76	45/28.
6	6	5	COOCH ₃	HO	H	HO	H	C ₂ H ₅		61/41.75	65/27.75	45/29.
6	6	5	COOCH ₃	HO	CH ₃	HO	H	CH ₃		64/41.75	70/30.78	52/27.
6	6	5-6	H	CH ₃ O	H	HO	H	C ₂ H ₅	H ₁₁	65/42.74	70/27.76	53/29.
6	6	6	COOCH ₃	HO	H	HO	H	C ₂ H ₅	H ₁₁	64/42.73	69/27.76	48/28.
6	6-7	5	COOCH ₃	HO	H	HO	H	C ₂ H ₅		67/42.75	76/27.78	48/28.
7-8	6-7	7-8	COOH	HO	H	CH ₃ O	H	CH ₂ COC ₂ H ₅	H ₁₁	77/40.76	71/34.72	78/28.

^a See footnote to Table I.

J. Chromatogr., 72 (1972) 113-125



Table II gives data for the hydrolysis products of many of the commonest lichen depsides. These data are useful for identifying a number of substances that give very close R_F values. The best example is the series of compounds divaricatic acid (I), imbricatic acid (II), stenosporic acid (III), sphaerophorin (IV) and perlatolic acid (V). The R_F values of these compounds increase slightly as the total length of the side-chains on the rings increases, but the R_F values of compounds having the same total number of carbon atoms in the side-chains (*i.e.*, imbricatic acid and stenosporic acid) are virtually identical under the conditions used here. When these compounds



- (I) $R = R' = C_3H_7$ (IV) $R = CH_3; R' = C_7H_{15}$
 (II) $R = C_5H_{11}; R' = C_3H_7$ (V) $R = R' = C_5H_{11}$
 (III) $R = C_3H_7; R' = C_5H_{11}$

are hydrolyzed, however, the products are readily distinguishable. For the analysis of crude extracts, it is possible to detect mixtures of such compounds if the proportions of the components are reasonably similar. Naturally occurring mixtures of

TABLE III

TLC DATA FOR 24 O-METHYLATED DERIVATIVES OF LICHEN PRODUCTS

R_F class			Compound	Example, $R_F \times 100$ values (R_F of X/ R_F of N, R_F of A ^a)		
A	B	C		A	B	C
5	5	5	Methyl hypoprotocetrarate	57/42, 75	48/33, 78	41/30, 70
5-6	5-6	5	Methyl lecanorate	61/43, 75	49/30, 75	42/29, 77
6	4	6	Methyl schizopeltate	68/40, 73	33/32, 79	56/28, 77
6	4-5	6	Methyl 2,2'-di-O-methylvernate	71/42, 76	33/31, 80	56/28, 79
6	5	5	Methyl physodate	60/30, 72	38/27, 77	38/27, 77
6	5	5	Methyl lividate	62/39, 72	33/27, 77	48/27, 77
6	5	5	Dimethyl cuperitate	71/43, 75	40/30, 75	49/29, 77
6	6	5-6	Methyl 4-O-demethylbarbatate	68/44, 76	65/29, 77	53/28, 77
6	6	6	Methyl norobtusate	65/41, 75	57/29, 77	52/29, 78
7	5	6	Methyl 2',4-di-O-methylhypoprotocetrarate	73/42, 75	47/27, 77	64/30, 79
7	5	6	Methyl 4-O-methylphysodate	72/39, 72	47/26, 76	64/27, 77
7	5	6	Methyl 2,2',4-tri-O-methyldivaricatarate	76/42, 76	43/31, 80	64/29, 79
7	6	6-7	Methyl diffractaiate	76/41, 75	70/30, 78	77/27, 79
7	6	7	Methyl sekikaiate	76/43, 75	65/29, 76	76/30, 78
7	6	7	Methyl evernate	73/40, 73	72/32, 79	76/28, 77
7	6	7	Methyl 2-O-methylperlatolate	75/39, 73	74/32, 79	76/28, 78
7	7	8	Methyl divaricatarate	77/43, 76	77/30, 76	80/30, 78
7	8	8	Methyl imbricatarate	77/42, 76	80/26, 76	84/27, 80
7-8	5	6	Methyl planaiate	78/42, 76	50/29, 77	68/28, 78
7-8	6	7	Methyl 2'-O-methylperlatolate	79/40, 73	74/32, 79	75/28, 77
7-8	7-8	8	Methyl barbatate	78/44, 76	80/29, 77	84/29, 77
7-8	8	8	Methyl stenosporic acid	77/43, 75	80/30, 76	83/30, 78
7-8	8	8	Methyl sphaerophorate	78/42, 76	81/27, 77	85/27, 80
8	8	8	Methyl perlatolate	79/43, 76	82/30, 76	85/30, 78

^a See footnote to Table I.



TABLE IV
TLC DATA FOR MISCELLANEOUS DERIVATIVES OBTAINED BY CATALYTIC REDUCTION, DECARBOXYLATION OR HYDROLYSIS OF SOME REPRESENTATIVE
NON-DEPSIDE LICHEN PRODUCTS

R _F class	Compound	Example, R _F × 100 values (R _F of X/R _F of N. R _F of A*)			Parent compound type
		A	B	C	
1 3	Hydrolyzed caperatic acid (= norcaperatic acid)	0/42, 72	26/33, 79	1/30, 79	Fatty acid ester
2	Hydrolyzed hypotruncetratic acid	15/40, 76	33/30, 77	14/34, 82	Depsidone
3 3	Hydrolyzed lividic acid	27/40, 76	27/30, 78	22/30, 81	Depsidone
3 3	Hydrolyzed schizopeltic acid (= di-O-methylpannamic acid)	22/43, 75	18/29, 75	32/29, 77	Dibenzofuran ester
3 4	Reduced psoromic acid (= hypopsoromic acid)	25/47, 74	32/34, 82	17/28, 79	Depsidone aldehyde
3 4-5	Decarboxylated porphyritic acid (= porphyritin)	37/42, 72	35/34, 80	21/30, 79	Dibenzofuran carboxylic acid
3 5	Hydrolyzed physodic acid	23/41, 76	37/34, 77	10/30, 76	Depsidone
3 5	Hydrolyzed lobatic acid	28/40, 76	35/29, 78	27/30, 81	Depsidone
3 5	Hydrolyzed grayanic acid	30/40, 76	43/29, 78	33/30, 81	Depsidone
3-4	Hydrolyzed colensoinic acid	38/40, 76	57/30, 78	36/30, 81	Depsidone

* See footnote to Table I.



stenosporic acid with perlatolic acid, imbricatic acid with perlatolic acid, sekikaic acid with homosekikaic acid, and cryptochlorophaeic acid with paludosic acid have been detected by microhydrolysis.

Table III gives chromatographic data for a number of O-methyl derivatives of lichen compounds. The R_F values tend to be high in the standard solvent systems, which are better suited to the more polar parent substances. Many of these O-methyl derivatives chromatograph well and with lower R_F values in solvent systems of toluene or hexane-diethyl ether (9:1), where the organic acid (acetic or formic) used in the three standard solvent systems to prevent tailing of phenolic acid lichen products is omitted. In addition to the substances listed in Table III, methyl gyrophorate and methyl 4-O-methylgyrophorate, which are obtainable from gyrophoric acid by reaction with diazomethane, are known to occur naturally in lichens and are included in Table I.

Table IV lists data for some derivatives of non-depside lichen products. Acidic hydrolysis of orcinol-type depsidones gives a single compound of lower R_F value, but starting material is commonly observed in the product. β -Orcinol depsidones are more difficult to hydrolyze and only highly reduced derivatives, such as hypoprotocetraric acid, gave satisfactory results. The aldehydic depsidones protocetraric acid, norstictic acid and salazinic acid were converted to slightly soluble pigments. Other reactions (Table IV) that are easily adapted for micro-scale analysis of extracts include (1) basic hydrolysis¹⁰ of methyl esters, e.g., schizopeltic and caperatic acids; (2) catalytic reduction¹¹, e.g., psoromic acid to hypopsoromic acid and protocetraric acid derivatives to hypoprotocetraric acid (Table I); and (3) decarboxylation¹², e.g., porphyritic acid to porphyrilin.

The method of making the spots visible by spraying the plates with 10% H_2SO_4 and heating them at 110° for 15–30 min is the most general and satisfactory method for routine tests on lichen extracts. Other reagents are useful for particular applications. For example, the sensitivity of this H_2SO_4 spray for the detection of phenolic substances and their O-methyl derivatives is very good, but not so good as the diazonium sprays. These reagents may be useful when (1) trace amounts of phenolic substances must be detected, (2) overlapping or streaking non-phenolic products interfere with the interpretation of phenolic compounds on the chromatogram, or (3) sensitive detection is required for certain aromatic compounds that give pale colors with H_2SO_4 .

The colors developed with H_2SO_4 are correlated with the chemical structure of the compounds, and these colors can be helpful in making identifications. Table V summarizes the colors produced for some common types of compounds with specific examples from Table I.

The general method described here could be used for any series of compounds detectable by TLC in more than one solvent system. Naturally, not all compounds to be identified will give ideally round spots and good R_F values in all solvent systems used in such a standardized system, but the method does not require consistently ideal behavior. In fact, some identifications are aided by the knowledge of which of the solvents are "good" for a particular compound. Also, it is not necessary that the control substances for determining R_F classes in the different solvent systems be the same. Any compounds with suitably different R_F values are satisfactory, and if colored substances were chosen for the controls, the plates could be developed until



TABLE V

SPOT COLORS FOR PROMINENT COMPOUND TYPES ON PLATES SPRAYED WITH 10% H₂SO₄ AND HEATED TO 110° FOR 15-30 min

Color	<i>F</i> ₂₅₄	Compound type	Examples from Table I
Colorless, faint brown or gray	—	Fatty acids	Caperatic acid Lichesterinic acid Protolichesterinic acid Rangiformic acid Roccellic acid
Brown, pink or yellow-brown	—	Allicyclics	Acetylportentol Ursolic acid Zeorin
Deep yellow (± gray rim)	+	Orcinol <i>para</i> -depsides and tri-depsides with reduced side-chains or a 2-keto side-chain on one ring	Anziaic acid Confluent acid Divaricatic acid Erythrin Evernic acid Giomelliteric acid Gyrophoric acid
Pale green or pale yellow-green	+	Orcinol depsidones with 1-keto or 2-keto A-ring side-chain and reduced B-ring side-chain ^a	Lobaric acid 4-O-Methylphysodic acid Loxodin Norlobaridone Physodic acid
Pale pink	+	Orcinol <i>para</i> -depsides and depsidones with 2-keto side-chains on both rings	Alectoronic acid Arthoniaic acid α-Collatolic acid Microphyllinic acid
Reddish	+	Orcinol depsidones with reduced side-chains	Colensoinic acid Grayanic acid
Brown, brown-purple or purple	+	Orcinol <i>meta</i> -depsides ^b	Cryptochlorophaetic acid Homosekikaic acid Merochlorophaetic acid Paludolic acid Scrobiculin Sekikaic acid
Yellow or lemon yellow (± gray rim)	+	β-Orcinol <i>para</i> -depsides	Atranorin Baomycesic acid Chloroatranorin 4-O-Demethylbarbatic acid Diffractaic acid Squamatic acid
Uniform dark gray or black	+	β-Orcinol depsidones related to protocetraric acid ^c	Fumarprotocetraric acid Physodalic acid Protocetraric acid
Bright yellow, orange or red	+	β-Orcinol depsidones related to norstictic acid ^d	Constictic acid Norstictic acid Salazinic acid Stictic acid
Blue or blue-gray	+	Dibenzofurans related to pannaric acid	Pannaric acid Porphyritic acid Schizopeltic acid

^a The depsone picrolichenic acid gives a similar color.^b Similar colors are produced by the benzyl ester alectorialic acid, the β-orkinol *meta*-depside thamnoic acid and the β-orkinol depsidone psoromic acid.^c Similar colors are produced by the chlorinated depsidone pannarin and the β-orkinol depsidone virensic acid.^d Several compounds of unknown structure, *e.g.*: connorstictic, consalazinic, echinocarpic and galbinic acids, give similar colors and are probably related chemically to norstictic acid.*J. Chromatogr.*, 72 (1972) 113-125.



the control spots reached a pre-determined height on the plate rather than running the solvent front to a standard height.

ACKNOWLEDGEMENTS

I thank Drs. K. AGORAMURTHY, M. E. HALE, JR., S. H. HARPER, S. HUNECK, W. S. G. MAASS and C. A. WACHTMEISTER and Mr. M. J. DIBBEN for kindly supplying gifts of pure lichen substances or specimens of lichens known to contain compounds that were otherwise unavailable.

This investigation was supported by Grant GB-25346 from the National Science Foundation.

REFERENCES

- 1 C. F. CULBERSON AND H. KRISTINSSON, *J. Chromatogr.*, 46 (1970) 85.
- 2 C. F. CULBERSON, *Bryologist*, 75 (1972) 43.
- 3 C. F. CULBERSON AND W. J. CULBERSON, *Mycologia*, 63 (1971) 422.
- 4 M. J. DIBBEN, *Lichenologist*, 5 (1971) 1.
- 5 T. L. ESSLINGER, *Bryologist*, 74 (1971) 364.
- 6 S. A. FISCUS, *Bryologist*, in press.
- 7 A. REHM, *Bryologist*, 74 (1971) 199.
- 8 C. A. WACHTMEISTER, *Bot. Not.*, 109 (1956) 313.
- 9 C. F. CULBERSON, *Bryologist*, 75 (1972) 54.
- 10 S. HUNECK, K. SCHREIBER, G. SNATZKE AND P. TRŠKA, *Z. Naturforsch.*, 25b (1970) 265.
- 11 C. F. CULBERSON, *Phytochemistry*, 4 (1965) 951.
- 12 C. H. FOX, W. S. G. MAASS AND I. M. LAMB, *J. Jap. Bot.*, 44 (1969) 361.

J. Chromatogr., 72 (1972) 113-125