

Evaluación de la actividad antifúngica de extractos liquénicos e identificación de sus metabolitos.

(Evaluation of the fungicide activity from lichens extracts and identification their metabolites)

Daymara I Vaillant F¹, Carlos R Romeu C¹,
Marlene Gómez P², Rebeca Ramírez O¹.

¹Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).
110 #214 / 5^{ta} B y 5^{ta} F, Miramar, Playa. La Habana, Cuba
Código Postal 11600. Tel: 202-2517-19 ext 149. dvaillant@inisav.cu

²Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo.
Edificio R, Ciudad Universitaria. Francisco J. Mújica S/NCOL.
Felicitas del Río. Código Postal 58030 Morelia,
Michoacán, México. Tel: 44 33 16 74 12. marlenegomezperalta@gmail.com

RECIBIDO: 25 de Agosto de 2014
APROBADO: 06 de Octubre de 2014

LOS AUTORES DECLARAN NO TENER CONFLICTO DE INTERESES

Palabras claves: Actividad fungicida, líquenes, sustancias liquénicas.

Key words: Fungicide activity, lichens, lichens substances.

RESUMEN

Los líquenes son los hongos que establecen una relación simbiótica con un alga o cianobacteria. En esta simbiosis se producen por parte del hongo, una serie de metabolitos secundarios conocidos como sustancias liquénicas; las cuales presentan una marcada actividad antibiótica. En Cuba no se tienen antecedentes sobre estudios de metabolitos liquénicos por lo que se propone; evaluar el efecto fungicida de extractos liquénicos producidos por especies cubanas así como identificar sus metabolitos. Se emplearon líquenes de diferentes zonas del país (*Parmotrema dilatatum*, *P. tinctorum*, *P. praesorediosum*, *P. cristiferum*, *Ramalina americana*, *Cladonia ceratophylla* y *Cladonia portentosa* spp. pacífica), a los cuales se les extrajo con acetona, las sustancias liquénicas almacenadas en el talo. Los extractos fueron probados contra los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora nicotianae*; por el método de envenenamiento del medio de cultivo agar papa

dextrosa a concentraciones de: 0,01%; 0,03% y 0,07%. Se utilizó un control negativo de dimetilsulfóxido al 0,07% y se determinaron los porcentajes de inhibición, cuyos resultados fueron analizados estadísticamente. Los metabolitos secundarios presentes en los extractos se identificaron por cromatografía de capa fina (TLC). Exceptuando el extracto liquénico de *P. cristiferum*, todos los demás mostraron más de un 50% de inhibición del crecimiento de ambos hongos a la concentración de 0,07%, mientras que a las restantes concentraciones los valores fueron variados con diferencias significativas con respecto al control. Se lograron identificar tres metabolitos liquénicos: metil 2'-O- metilmicrofilinato, 4-O-Demetilmicrofilinico y el ácido ramaniloico.

ABSTRACT

Lichens are fungi that establish a symbiotic relationship with an alga or cyanobacterium. This symbiosis produced by the fungus, a series of

secondary metabolites known as lichen substances; which show a strong antibiotic activity. In Cuba there is no background on the studies above lichen metabolites so it is proposed; evaluate the fungicidal activity of lichen extracts produced by Cuban species and to identify metabolites. Lichens from different areas of the country (*Parmotrema dilatatum*, *P. tinctorum*, *P. praesorediosum*, *P. cristiferum*, *Ramalina americana*, *Cladonia ceratophylla* and *Cladonia portentosa* spp. *pacifica*), to which it extracted with acetone, the lichen substances stored in tallus. The extracts were tested against the fungal pathogens *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora nicotianae*; poisoning by the method of culture medium potato dextrose agar at concentrations of 0.01%; 0.03% and 0.07%. A negative control to 0.07% dimethylsulfoxide was used and the percentage of inhibition, the results were analyzed statistically determined. Secondary metabolites present in the extracts were identified by thin layer chromatography (TLC). Except *P. cristiferum* lichen extract, all others showed more than 50% growth inhibition of both fungi at concentration of 0.07%, while the remaining concentrations were varied values with significant differences from the control. Was made to identify three lichen metabolites metilmicrofilinato 2' methyl-O, 4-O-Demetilmicrofilinico and ramaniloico acid.

INTRODUCCION

Con el descubrimiento de las propiedades antibióticas de los metabolitos producidos por líquenes, muchos científicos comprobaron el efecto de estos sobre un número considerable de organismos patógenos, tanto para el hombre como para las plantas y animales. Desde la década de los años 40 diversos investigadores realizaron pruebas de actividad antibacteriana del ácido úsnico, sustancia producida fundamentalmente por especies del género *Usnea* (Ortega, 2004).

Los líquenes son excepcionales por la alta concentración de metabolitos que pueden almacenar en el talo, por lo que se pueden conservar por largos períodos de tiempo sin sufrir invasiones de bacterias y hongos, manifestándose así la actividad antimicrobiana de estas sustancias (Toledo *et al.*, 2004). Estudios recientes demostraron que muchos de estos metabolitos tienen efecto sobre hongos fitopatógenos

que afectan cultivos de gran importancia económica (Wei *et al.*, 2008). Cuba presenta una gran diversidad de especies de líquenes; se informan un estimado de 800 especies de líquenes, y se teoriza que existan más (Minter *et al.*, 2001). Sin embargo, no se tienen reportes de estudios sobre la actividad antibiótica de sustancias liquénicas, ni de identificación de sus metabolitos. Teniéndose en cuenta las afirmaciones anteriores, se propone: evaluar la actividad antifúngica de los extractos producidos por siete especies de líquenes, colectadas en diferentes zonas de Cuba sobre los hongos fitopatógenos *R. solani* Kün y *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan; además de identificar sus principales metabolitos.

MATERIALES Y METODOS

Colecta de líquenes

Las colectas de los especímenes se realizaron en el año 2009 en tres regiones del país: La Habana, Cienfuegos y Holguín. Se seleccionaron líquenes con crecimiento cortícola y terrícola; además que se tuvo en cuenta la estimación cualitativa de la abundancia de la población liquénica para evitar depredar la zona. Las especies colectadas fueron identificadas mediante el uso de claves dicotómicas establecidas por: Brodo, 2001 y Nash *et al.* (2001; 2004; 2007). Los especímenes se muestran en la tabla 1.

Prueba de la actividad fungicida de los extractos liquénicos

Las muestras del talo liquénico de cada especímenes se lavaron con abundante agua corriente y se colocaron en la estufa a secar a 35°C durante 48 horas. Luego se trituraron hasta pulverizar y se pesaron 1 g de cada polvo. Esta porción se cubrió con 10 ml de acetona y se dejó reposar durante 48 horas, hasta que el solvente extrajo la mayor cantidad de sustancias posibles; luego se filtró al vacío con papel de filtro y se desechó la biomasa. El sobrenadante se colocó en balones que fueron pesados vacíos previamente y se concentró con un roto-evaporador rotatorio. Posteriormente por diferencia de los pesos de los balones; se determinó la cantidad de extracto obtenido y se disolvió en dimetilsulfoxido (DMSO) al 10% para lograr los extractos al 5%. Para los ensayos de antibiosis se prepararon concentra-

Tabla1. Especies de líquenes colectadas.

Especies	Localidad	Fecha	Hábitat	Tipo de crecimiento
<i>Parmotrema dilatatum</i> (Vain.) Hale	Jardín Botánico Cienfuegos	26/02/09	Cortícola	Foliáceo
<i>Parmotrema tinctorum</i> (Despr. ex Nyl.) Hale	Jardín Botánico Cienfuegos	26/02/09	Cortícola	Foliáceo
<i>Parmotrema praesorediosum</i> (Nyl.) Hale	Jardín Botánico Nacional (La Habana)	8/03/09	Cortícola	Foliáceo
<i>Parmotrema cristiferum</i> (Taylor) Hale	Jardín Botánico Nacional (La habana)	8/03/09	Cortícola	Foliáceo
<i>Ramalina americana</i> Hale	Cayo Mujeres (Holguín)	18/03/09	Cortícola	Fruticoso
<i>Cladonia ceratophylla</i> (Sw.) Spreng.	Cayo Mujeres (Holguín)	18/03/09	Terrícola	Fruticoso
<i>Cladonia portentosa</i> ssp. <i>pacifica</i> (Ahti) Ahti	Pinares de Mayarí (Holguín)	22/03/09	Terrícola	Fruticoso

ciones de 0,07%, 0,03% y 0,01% de cada extracto en PDA fundido (Tabla 2).

Tabla 2. Preparación de las concentraciones.

Concentración	Cantidad de extracto	Cantidad de PDA fundido para 50 ml
0,07%	0,07 ml	49,3ml
0,03%	0,03 ml	49,7ml
0,01%	0,01 ml	49,9 ml

El PDA fundido suplementado con cada uno de los extractos líquénicos, se aplicó en placas de 5 cm de diámetro y se colocaron en el centro ponchetes de 1 cm de diámetro de los hongos fitopatógenos *Phytophthora nicotianae* y *Rhizoctonia solani* aislados de cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L). En el ensayo se emplearon dos controles; uno con el blanco

DMSO al 5% que se aplicó al medio de cultivo a la mayor concentración estudiada. Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días y pasado este tiempo se midieron los diámetros de las colonias tratadas y las testigos para calcular el porcentaje de inhibición empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(DCC - DCT)}{DCC} \times 100$$

Donde:

DCC: diámetro de la colonia control

DCT: diámetro de la colonia tratada

Los datos de los experimentos se procesaron mediante análisis de varianza de clasificación simple (ANOVA) utilizando el programa Analest. Las medias se docimaron utilizando la Prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Determinación de la dosis inhibitoria media (DI50)

Se determinaron además las dosis inhibitorias

medias de los porcentajes de inhibición de cada uno de los extractos liquénicos utilizando el programa ED50plus v1.0 (Vargas, 2000).

Identificación de las sustancias liquénicas

La identificación de los metabolitos liquénicos se realizó por cromatografía de capa fina (TLC), siguiendo la metodología descrita por Gómez, 1997. Se emplearon cuatro placas de silicagel (60 F254) de 0,2 mm de grosor y de 20x 20 cm de tamaño; las cuales fueron tratadas en cuatro fases móviles (FM), teniéndose en cuenta los valores de índice de retención (Rf) de las sustancias liquénicas para cada sistema de solvente mencionado en el programa wintabolites.

Las FM fueron las siguientes:

FM-A: tolueno/dioxano/ácido acético (36:9:1, 46 ml).

FM-B: hexano/dietiléter/ ácido fórmico (26: 16:4, 46 ml).

FM-C: tolueno/ácido acético (40:6, 46 ml).

FM-E: Hexano/ acetato de etilo (30: 16, 46 ml).

Una vez concluida la cromatografía, se calcularon los respectivos índices de retención de las sustancias

liquénicas que se detectaron en las placas mediante la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{a}{b} \times 100$$

a: Distancia que recorrió cada sustancia midiendo del punto de aplicación hasta el centro de la mancha.

b: Distancia que recorrió el solvente, midiendo a partir del punto de aplicación.

Para la identificación de los metabolitos presentes en cada uno de los extractos se utilizó el programa wintabolites (1994).

RESULTADOS

Prueba de la actividad fungicida de los extractos liquénicos

Los datos de la actividad fungicida de los extractos liquénicos fueron tabulados para cada hongo. La tabla 3 muestra los porcentajes de inhibición de cada uno de los extractos para *P. nicotianae*.

Tabla 3. Porcentajes de inhibición de cada extractos para *P. nicotianae*.

<i>Extractos liquénicos</i>	% de inh al 0,07%	% de inh al 0,03%	% de inh al 0,01%
<i>Parmotrema dilatatum</i>	73,3e	72,6e	56,1g
<i>Parmotrema tinctorum</i>	59,5c	53c	45f
<i>Parmotrema praesorediosum</i>	100g	63,1d	38,5e
<i>Parmotrema cristiferum</i>	43,1b	40b	33,9c
<i>Ramalina americana</i>	68,9de	31,1b	15,6b
<i>Cladonia ceratophylla</i>	80,9f	65,11d	22,2c
<i>Cladonia portentosa</i> spp. pacífica	64,4cd	60cd	31d
Control (con DMSO)	0a	0a	0a
Control (sin DMSO)	0a	0a	0a

El extracto obtenido de *P. praesorediosum* al 0,07% logró inhibir en un 100% el crecimiento de *P. nicotianae*. Por otra parte; *P. dilatatum*, *P. tinctorum*, *R. americana*, *C. ceratophylla* y *C. portentosa* mostraron más de un 50% de inhibición a esta misma concentración (fig 1). Los metabolitos producidos por *P. cristiferum* fueron los de más baja actividad. *R. americana* no tuvo diferencias significativas con *P. dilatatum* y *C. portentosa* y esta última a su vez, no mostró diferencias significativas con *P. tinctorum*. Todos los extractos mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo.

Los resultados alcanzados al 0,03%, exceptuando los de *R. americana* y *P. cristiferum*, estuvieron por encima del 50% de inhibición; sin diferencias significativas entre las especies *Parmotrema praesorediosum*, *Cladonia ceratophylla* y *Cladonia portentosa*. Otros productos que no mostraron diferencias significativas entre sí fueron los obtenidos de *C. portentosa* y *P. tinctorum*.

A la menor concentración solo los extractos producidos por *P. dilatatum* y *P. americana* inhibieron más de un 50% el crecimiento micelial de *P. nicotianae*, los restantes extractos estuvieron por debajo del 50%, pero con diferencias significativas con respecto al control. Los metabolitos producidos por *P. cristiferum* y *C. ceratophylla* no tuvieron diferencias significativas entre sí. De manera general los extractos liquénicos obtenidos de *P. americana* y *P. praesorediosum* fueron los que mostraron mejor actividad fungicida frente *P. nicotianae*.

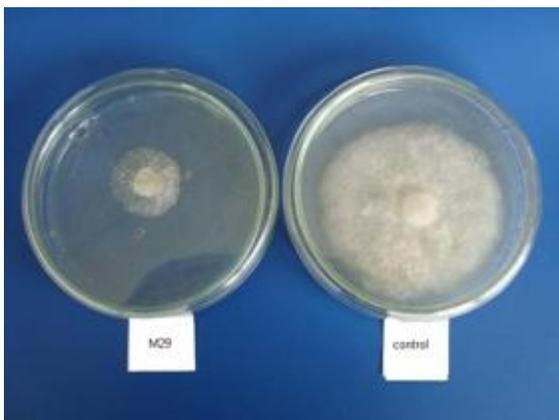


Figura 1. Efecto inhibitorio de las sustancias liquénicas producidas por *Parmotrema tinctorum* al 0,07%

La tabla 4 por su parte muestra los porcentajes de inhibición para *R. solani*.

En general los extractos liquénicos mostraron menor actividad fungicida frente a *R. solani* que frente a *P. nicotianae*. Sin embargo al 0,07% los resultados fueron similares; *P. dilatatum*, *P. praesorediosum*, *R. americana* y *C. portentosa* mostraron valores de inhibición de más de un 50% (fig 2). El extracto de *P. tinctorum* no mostró ninguna actividad sobre *R. solani*; los restantes extractos a pesar que tuvieron valores por debajo del 50% mostraron diferencias significativas con el control negativo.

Al 0,03% solo los metabolitos producidos por *P. dilatatum* lograron valores de inhibición por encima del 50%; mientras que los obtenidos de *P. praesorediosum*, *P. cristiferum*, *C. ceratophylla* y *C. portentosa* tuvieron baja actividad fungicida con diferencias significativas con respecto al control. En el caso específico de los extractos de *C. ceratophylla* y *C. portentosa* estos no presentaron diferencias significativas entre sí. Llama la atención la actividad inhibitoria del extracto de *R. americana* quien a la mayor concentración mostró un valor satisfactorio a las restantes concentraciones no mostró ninguna actividad.

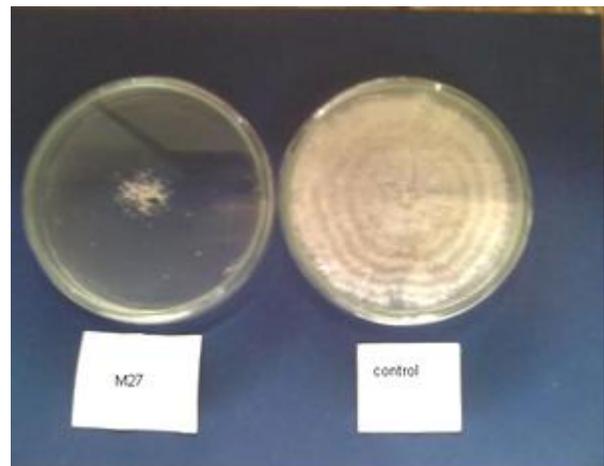


Fig. 2. Efecto inhibitorio de las sustancias liquénicas producidas por *Parmotrema dilatatum* al 0,07%.

En la menor concentración solo los extractos obtenidos de las especies *Parmotrema dilatatum* y *Parmotrema praesorediosum* lograron inhibir el

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de cada uno de los extractos sobre *R. solani*.

Extractos liquénicos	% de inh al 0,07%	% de inh al 0,03%	% de inh al 0,01%
<i>Parmotrema dilatatum</i>	81,8g	70,7e	42,2d
<i>Parmotrema tinctorum</i>	0a	0a	0a
<i>Parmotrema praesorediosum</i>	54,4d	40,7d	22c
<i>Parmotrema cristiferum</i>	28,1b	26,7b	0a
<i>Ramalina americana</i>	78,7f	0a	0a
<i>Cladonia ceratophylla</i>	42,2c	31,1bc	0a
<i>Cladonia portentosa</i> spp. pacifica	64,4e	33c	0a
Control (con DMSO)	0a	0a	0a
Control (sin DMSO)	0a	0a	0a

Tabla 5. DI_{50} de los extractos liquénicos para cada hongo.

Especies	<i>P. nicotianae</i>	<i>R. solani</i>
<i>Parmotrema dilatatum</i>	0,012 ± 0,003	0,0137 ± 0,0003
<i>Parmotrema tinctorum</i>	0,012 ± 0,003	Dosis >0,07%
<i>Parmotrema praesorediosum</i>	0,0176 ± 0,0022	0,041 ± 0,007
<i>Parmotrema cristiferum</i>	Dosis >0,07%	Dosis >0,07%
<i>Ramalina americana</i>	0,024 ± 0,002	0,0423 ± 0,0045
<i>Cladonia ceratophylla</i>	0,0226 ± 0,0006	Dosis >0,07%
<i>Cladonia portentosa</i> spp. pacifica	0,013 ± 0,003	0,041 ± 0,006

Tabla 6. Sustancias liquénicas identificadas en los extractos por TLC (página siguiente).

Especies de líquenes	Sustancias líquénicas	Clase	Sustancias relacionadas
<i>Parmotrema dilatatum</i>	Metil 2'-O-metilmicrofilinato	Dépsidos	Ácido 2'-O-metilmicrofilinico
<i>Parmotrema tinctorum</i>	Ácido 4-O-dimetilmicrofilinico	Dépsidos	Ácido anziaico, ácido microfilinico, ácido olivetorico
	Metil 2'-O-metilmicrofilinato	Dépsidos	Acido 2'-O-metilmicrofilinico
<i>Parmotrema praesorediosum</i>	Ácido 4-O-dimetilmicrofilinico	Dépsidos	Ácido Anziaico, ácido microfilinico, ácido olivetorico
	Metil 2'-O-metilmicrofilinato	Dépsidos	Ácido 2'-O-metilmicrofilinico
<i>Parmotrema cristiferum</i>	Metil 2'-O-metilmicrofilinato	Dépsidos	Ácido 2'-O-metilmicrofilinico
<i>Ramalina americana</i>	Ácido Ramalinolico	Dépsidos	Ácido 4'-O-dimetilsekikaico, ácido 4'-O-Metilnorhomosekikaico, Ácido 4'-O-Metilnorsekikaico, Ácido Homosekikaico, ácido Sekikaico
	Metil 2'-O-metilmicrofilinato	Dépsidos	Ácido 2'-O-metilmicrofilinico
<i>Cladonia ceratophylla</i>	No se pudo determinar	_____	_____
<i>Cladonia portentosa</i> spp. <i>Pacífica</i>	No se pudo determinar	_____	_____
	Metil 2'-O-metilmicrofilinato	Dépsidos	Ácido 2'-O-metilmicrofilinico

crecimiento de *R. solani* con valores por debajo de la media, pero con diferencias significativas respecto al control. El resto de los extractos no tuvieron ningún efecto antifúngico.

Determinación de la dosis inhibitoria media (DI₅₀)

Las dosis inhibitorias medias de los productos estudiados fueron determinadas y estuvieron en un rango de 0,012 a 0,042% (tabla 5).

La dosis inhibitoria media es aquella dosis de un determinado producto que es capaz de inhibir la mitad del crecimiento de la colonia un período dado. La DI₅₀ más eficaz para *P. nicotiane* fue la obtenida de *P. dilatatum* y *P. tinctorum* y para *R. solani* resultó la de *P. dilatatum* con igual valor al de *P. nicotianae*.

Identificación de las sustancias liquénicas

Las sustancias liquénicas identificadas en cada uno de los extractos se muestran en la tabla 6.

De las sustancias reveladas por TLC hubo un compuesto que, exceptuando *C. ceratophylla*, fue común para todas las especies; dicho metabolito fue el metil 2'-O- metilmicrofilinato perteneciente a las clase de los dépsidos (figura 3). Está compuesto fue positiva a la luz ultravioleta y tomó una coloración naranja cuando se aplicó ácido sulfúrico y fue detectada en las cuatro fases móviles empleadas en la cromatografía.



Figura 3. Resultado de TLC con solvente E.

Los líquenes *P. tinctorum* y *P. praesorediosum* mostraron los mismos compuestos liquénicos; el ácido 4-O-Demetilmicrofilinico un dépsido que presenta una coloración amarilla intensa cuando se aplica el ácido sulfúrico y cuya mancha fue detectada a la luz UV. En *R. americana* se identificó el ácido ramaniloico, sustancia perteneciente a la clase de los dépsidos que reacciona con ácido sulfúrico tomando una coloración entre amarillo o naranja claro. Esta sustancia se relaciona con otros compuestos liquénicos como el ácido sekikaiko. Las especies *C. ceratophylla* y *C. portentosa* revelaron una sustancia la cual no su pudo identificar por TLC. Este compuesto da una coloración carmelita pálido con ácido sulfúrico y es positivo con luz ultravioleta.

DISCUSIÓN

La actividad fungicida de metabolitos liquénicos fue reportada por investigadores como: Gullece *et al.* (2006) y Halama y Haluwin (2004) (citado por: Wei *et al.*, 2008). También otros estudios con extractos liquénicos, como los efectuado por Suberu (2004), demostraron la capacidad de inhibir el crecimiento y la esporulación de *Aspergillus flavus* de los extractos de *Hypogymnia physodes* y *Ramalina farinacea* a concentraciones mayores a las utilizadas en este ensayo. Seoun *et al.* (2003) (citado por: Toledo *et al.*, 2004) obtuvieron sustancias liquénicas de *Heterodermia* sp con una metodología similar a la empleada en este trabajo, mostrando valores significativos en un número determinado de hongos fitopatógenos entre los que se destacan *Bipolaris coicis*, *Colletotricum orbiculare* y *Fusarium graminearum*. Shai *et al.* (2001) utilizaron el extracto acuoso de *Heterodermia leucomela* obteniendo efecto de un 100% de inhibición a dosis de 60 y 80 $\mu\text{l ml}^{-1}$ sobre los hongos fitopatógenos *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata*, *Fusarium oxysporum* y sobre especies del género *Trichophyton*. Por otra parte la especie *Lecanora argentata* obtuvo un 68% de inhibición de *Colletotricum acutatum* agente causal de la antracnosis del pepino, similar resultado mostró *Cetrelia japonica* (61,4%), *Ramalina conduplicans* (59,5%) y *Umbilicaria esculenta* (59,5%), (Wei *et al.*, 2008), todo esto ha dosis mayores a las de este estudio.

Otros géneros que muestran un significativo efecto antifúngico son: *Cladonia*, *Myelochroa*, *Parmelia* y *Usnea*. El género *Ramalina* también presenta una marcada actividad fungicida, al igual que el género *Parmelia* cuyas especies inhibieron completamente el crecimiento de los hongos *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* sp y *Sclerotium cepivorum* (Soon *et al.*, 2006).

Los extractos obtenidos de las especies de *Parmotrema* en este estudio mostraron valores de inhibición significativos principalmente contra *P. nicotiane*. Algunos autores como Teixeira *et al.* (2002) demostraron la actividad fungicida de algunas especies de este género, tal es el caso de *P. tinctorum* quien mostró efecto inhibitorio del crecimiento de *Cladosporium sphaerospermum* debido fundamentalmente a la presencia en el talo del ácido lecanórico (citado por: Wei *et al.*, 2008). También *P. praesorediosum* inhibió el crecimiento de bacterias y levaduras patógenas en humanos, destacándose frente a *Candida albicans* (Balaji y Hariharan, 2007). Otras especies con efecto fungicida frente a hongos fitopatógenos son: *Parmelia saxatilis* y *Parmelia sulcata* las cuales revelaron además actividad inhibitoria en bacterias y hongos de importancia clínica a concentraciones mínimas inhibitorias en un rango de 1,56- 12,5 mg/ml (Rankovic y Kosanic, 2012).

Estudios recientes demuestran que el tipo de solvente empleado para la extracción de las sustancias liquénicas influye en la actividad antimicrobiana que puede presentar el extracto. Tiwari *et al.* (2011) estudiaron el efecto fungicida de los metabolitos producidos por las especies: *Bulbothrix setschwanensis*, *Ervernistrum nepalense*, *Heterodermia diademata* y *Parmelaria thomsonii* utilizando tres solventes diferentes (acetona, metanol y cloroformo), obteniéndose mejores resultados en los extractos con acetona frente a: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. roseum* y *Penicillium citrinum*.

De la literatura consultada no encontramos referencias sobre las dosis inhibitorias medias de los extractos liquénicos de estas especies. Existen otros estudios como los realizados por Prashith *et al.* (2012); donde emplearon extractos de *Everniastrum*

cirrhatum contra *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* con DI_{50} de 0,0474%.

Los metabolitos identificados en este estudio pertenecen a la clase de los dépsidos y las depsidonas; estas clases de metabolitos conjunto con los ácidos úsnicos son compuestos que solo se encuentran en los hongos liquenizados (Ranković *et al.*, 2009). Estas sustancias son muy abundante en los talos liquénicos y pueden representar de un 5 a un 10% del peso seco del talo y mostrar actividad antioxidante, antiviral, antibiótica y antitumoral (Gulluce *et al.*, 2006). Thadhani *et al.* (2012) aislaron de cuatro especies de líquenes; siete sustancias liquénicas pertenecientes a las clase de los dépsidos y las depsidonas. Entre las especies estudiadas se encontraban dos del género *Cladonia*. Estas sustancias fueron probadas frente a bacterias y hongos de importancia clínica y fitopatológicas, obteniéndose resultados significativos. Se destaca la relevante actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas del ácido sekikaico; meta dépsido relacionado con el ácido ramaniloico identificado en la especie *R. americana*. Por otra parte los dépsidos probados por estos autores mostraron una marcada actividad fungicida en hongos fitopatógenos como *Aspergillus flavus* y *Fusarium solani*. El ácido lobárico inhibió en un 90% el crecimiento micelial de *A. flavus* mientras que el metil-*b*-orcinoicarboxilato mostró igual resultado para *F. solani*.

Nash *et al.* (2001) reportan la presencia de antranorina en las tres especies del género *Parmotrema* analizadas; sin embargo en este trabajo no se identificó esta clase de sustancia. También en *P. praesorediosum*; estos mismos autores reportan metabolitos como la cloroantranorina en el corteza y en la médula los ácidos praesorediosico y protopraesorediosico. En estudios realizados por Kusumaningrum *et al.* (2011) en extracto acetónico de *P. tinctorum*; identificaron solamente depsidona y dépsidos. Barrero y Pérez-Ortega (2003), describen que en la médula de algunas especies de *Parmotrema* existen diversos compuestos derivados de β -orcinoil, depsidonas, dépsidos del orcinoil y ácidos grasos.

Caso muy similar ocurre con la especie *R. americana*, de la cual Hale (1979) describe la

presencia de ácido úsnico y más adelante Brodo (2001) describe la presencia de los ácidos divaricático, norbarbático y el 4-o-glomeliférico en la médula. También Barrero y Pérez- Ortega (2003) mencionan que en la médula de esta especie hay presencia de dépsidos, depsidonas y derivados del –orcinol.

Stark *et al.* (2007), extrajeron de especies de *Cladonia* para pruebas de actividad antibiótica del ácido úsnico y lecanórico, los cuales no fueron identificados en *C. ceratophylla*. Sin embargo Barrero y Pérez-Ortega (2003), exponen que los géneros *Cladonia* y *Cladina* se tratan conjuntamente, ya que por técnicas de biología molecular no hay muchas diferencias para tratarlos como géneros diferentes. Estos autores realizaron la técnica de TLC y detectaron algunas sustancias que no coincidieron a las descritas en la literatura, aunque no hacen referencia a las mismas.

Los resultados obtenidos en este trabajo se deben quizás, a que muchas de las especies descritas en la literatura consultada son de lugares con condiciones ecológicas y geográficas diferentes a las de Cuba. Estos son factores que pueden hacer variar las características cuantitativas de las sustancias liquénicas en los talos de los líquenes de una misma especie, lo cual se denomina quimiotipos (Culberson, 1986 citado por: Lumbsch, 1998). Para corroborar esta afirmación, teniéndose en cuenta que en

cromatografía de capa fina solo se detectan las sustancias de mayor concentración en el talo liquénico, se requieren realizar estudios químicos más profundos (HPLC, Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas) con estas especies cubanas.

CONCLUSIONES

- Los extractos liquénicos más efectivos fueron los obtenidos de *Parmotrema praesorediosum* para *P. nicotianae* y el de *Parmotrema dilatatum* para *R. solani*.
- Todos los extractos revelaron presencia de metabolitos liquénicos mediante TLC. Se identificaron tres metabolitos liquénicos de los cuales 2 son dépsidos y uno pertenece a la clase de las depsidonas.

AGRADECIMIENTOS

El Colectivo de autores desea agradecerles a los siguientes investigadores que colaboraron con el desarrollo de este estudio:

- Lic. Linda Teresa Guerrero López. Directora de la agencia de viajes Bio-Tour's. Michoacán, México
- MsC. Dania Rosabal López. Prof. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba, Cuba.

REFERENCIAS

1. Balaji, P. and Hariharan, G. H. (2007). In vitro antimicrobial activity of *Parmotrema praesoredium* thallus extracts. Research Journal of Botany. 2 (1): 54-59.
2. Barrero, E. y Pérez- Ortega, S. (2003). Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias. Serie naturaleza, Cuadernos de medio ambiente. Primera edición. Ediciones. Oviedo. Asturias, España. 522 p.
3. Brodo, I. M.; Duran-Sharnoff S. and Sharnoff, S. (2001). Lichens of North America. Yale University Press, New Haven & London, UK. 795 p.
4. Gulluce, M.; Aslan, A.; Sokmen, M.; Adiguzel, A.; Agar, G. and Sokmen, A. (2006). Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderiana*. Phytomedicine. (13): 515-521.
5. Hale, M.E. (1979). How to know the lichens. Segunda edición. The pictured key Nature series. Dubuque, Iowa. USA. 246 pp.
6. Kusumaningrum I.K.; Suwarso, W.P.; and Cahyana, A.H. (2011). Screening for bioactive compound group in *Parmotrema tinctorum*'s extract and bioactivity Test of dichloromethane extract as anti-tuberculosis against *Mycobacterium tuberculosis* H37RV and toxicity against *Artemia salina*. Sci. J.UBU. 2 (1): 53 - 59.
7. Lumbsch, H.T. (1998). The use of metabolic data in

lichenology at the species and subspecific levels. *Lichenologist*. 30 (4-5): 357-367.

8. Mietzsch E.; Lumbsch, H.T. and Elix, J.E. (1994): WINTABOLITES (Mactabolites for Windows). - Users manual and computer program, 2nd ed. (Universität Essen) 54p. www.nhc.asu.edu/lherbarium/lichen_info/tlc.php. **Última consulta: septiembre 2013.**

9. Minter, D.W.; Rodríguez, M. and Mena, J. 2001. *Fungi of Caribbean*. PDMS Publishing UK. ISBN: 0954016904, 2001. 1737 pp.

10. Nash, I.I.I.; Ryan, T. H.; Diederich, B. D.; Gries, C. and Bungarts, F. (2004). *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region. Vol II. Lichens Unlimited*, Arizona State University. Tempe, Arizona, U.S.A. 742 pp.

11. Nash, I.I.I.; Ryan, T. H.; Diederich, B. D.; Gries, C.; and Bungarts, F. (2007). *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region, Vol III. Lichens Unlimited*, Arizona State University. Tempe, Arizona, U.S.A. 567 pp.

12. Nash, I.I.I.; Ryan, T. H.; Diederich, B. D.; Gries, C. and Bungarts, F. (2001). *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region, Vol I. Lichens Unlimited*, Arizona State University. Tempe, Arizona, U.S.A. 532 pp.

13. Ortega, Ch. M. (2004). Bioactividad del ácido úsnico del complejo de especies de *Usnea* sp. *Biotechpn*. 11: 16 pp.

14. Prashith, R. Raghavendra, L.S. Swathi, D. Venugopal, M. and Kanivebagillu, V. (2012). Antifungal and cytotoxic activity of *Everniastrum cirrahatum*. *Chiang Mai J. Sci.* **39**(1): 76-83.

15. Rankovic, B. and Kosanic, M. (2012). Antimicrobial activities of different extracts of *Lecanora atra*, *Lecanora muralis*, *Parmelia saxatilis*, *Parmelia sulcata* and *Parmeliopsis ambigua*. *Pak J. Bot.* **44** (1): 429-433.

16. Ranković, B.; Misić, M. and Sukdolak, S. (2009). Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Biología*. **64**(1): 53-58.

17. hahi, S.K.; Shukla, A. C.; Dikshit, A. and Uperti, D.K. (2001). Broad spectrum antifungal properties of the lichen *Heterodermia leucomela*. *The Lichenologist*. **33**: 177-179.

18. Soon, O.; Hae, J.; Sook, Kwang, L.; Young, J. and Jae, H. (2006). Antifungal activity of lichen-forming fungi isolated from korean and chinese lichen species against plant pathogenic fungi. *Plant Pathol. J.* **22**(4): 381-385.

19. Suberu, H. (2004). Preliminary studies of inhibitions in *Aspergillus flavus* with extracts of two lichens and Bentex-T fungicide. *African Journal of Biotechnology*. **3** (9): 468-472.

20. Thadhani, V.M.; Choudhary, M. I.; Khan, S. and Karunaratne, V. (2012). Antimicrobial and toxicological activities of some depsides and depsidones. *J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka*. **40**(1): 43-48.

21. Tiwari, P.; Rai, H.; Upreti, D.K.; Trivedi, S. and Shunkla, P. (2011). Assessment of antifungal activity of some himalayan foliose lichens against plant pathogenic fungi. *American Journal of Plant Sciences*. **2**: 841-846.

22. Toledo, F.J. García, A. León, F. y Bermejo, J. (2004). Ecología química en hongos y líquenes. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **XXVIII** (109): 510-528.

23. Vargas, M. (2000). Programa ED50 plus v1.0. <http://www.sciencegateway.org>. **Última consulta: noviembre 2012.**

24. Wei, X.; Hae-Sook, J.; Keon, H.; Young, K. and Jae-Seoun, H. (2008). Antifungal activity of lichen-forming fungi against *Colletotrichum acutatum* on hot pepper. *Plant Pathol. J.* **24** (2): 202-206.