

UCH-FC
MAG-Q
S 164
C. 1



Dépsidos y depsidonas de líquenes antárticos: Estudio antioxidante y evaluación como posibles inhibidores de la agregación de la proteína Tau

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Químicas

Por

Francisco Javier Salgado Valdés



2016

Directores de Tesis:
Dr. Carlos Areche M.
Dr. William Tiznado V.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Magíster presentada por el candidato

Francisco Javier Salgado Valdés

Ha sido aprobada por la comisión de evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Químicas (Química de Productos Naturales), en el examen de Defensa privada de la tesis rendido el día 27 de Octubre del 2016

Director de Tesis:

Dr. Carlos Areche M.



Co-director de Tesis:

Dr. William Tiznado V.

.....

Comisión evaluadora de la Tesis:

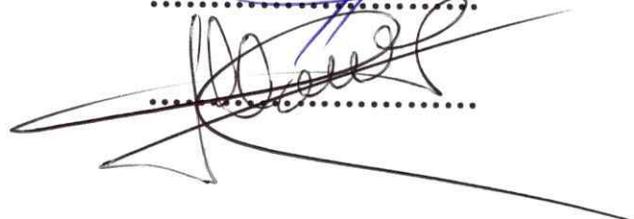
Dr. Patricio Iturriaga

.....

Dr. Paul Jara

.....

Dr. Claudio Olea





A todos los que creyeron en mi.....

Agradecimientos

El desarrollar esta investigación resulto ser más que un desafío, sino un reto personal, el cual no hubiera logrado sin el apoyo incondicional de mi querida Familia. En primera instancia quiero agradecerles a mis padres los cuales me han respaldado en todo. A mis hermanos Juan, Claudia, Stefany, a Nelson y Eli por sus consejos y también sus regaños. A mis sobrinos Isidora y Nacho por hacerme muy feliz. A mi querida novia Ina, por su extrema paciencia y amor incondicional.

Agradecer al Dr. Carlos Areche por su excelente dirección, su gran ejemplo como profesional y científico que es, además de haberme brindado más que su apoyo como tutor sino que más bien como un amigo, gracias por todo profe.

Agradezco al programa de becas del Instituto Antártico Chileno (proyecto INACH MT_03-14), por la beca que permitió cumplir uno de mis mayores sueños, el cual fue haber vivido en la Antártida Chilena.

Agradezco también la colaboración del Dr. Alberto Cornejo y al Dr. William Tiznado de la Universidad Andrés Bello por permitirme trabajar en sus laboratorios y estar bajo su tutela.

Agradezco a los tenores Campos, Fer, Moya y Zavala por el gran apoyo y animo brindado en todo ámbito.

A los incombustibles chicos de la Selección de Ciencias Diego Jaime Chino Lucho Pepe Abi Chris Dany, etc, por ser mi segunda familia y apoyarme en todo.

A mi amigo personal Matías Leal y su familia, por todo el apoyo brindado en muchos muchos ámbitos desde el pregrado hasta la fecha.

A mis queridas amigas Anto Benavente y Fran Cáceres por su gran apoyo y consejos a la distancia.

Al Dr. Claudio Olea y la Dra. M^a Carolina Zúñiga junto a los chicos del laboratorio de radicales por todo el apoyo y consejos además de permitirme trabajar en sus instalaciones como uno de ellos.

A los integrantes mi laboratorio de productos naturales extremos Yhis, Andrea, Dr. Ardiles Dr. Vaca Dr. Rivera y sus funcionarios por todos los favores y recomendaciones realizadas.

Índice de materias

Biografía.....	III
Agradecimientos	IV
RESUMEN.....	X
ABSTRAC.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Líquenes.....	1
1.2. Metabolitos y rutas biosintéticas	4
1.2.1. Metabolitos primarios	5
1.2.2. Metabolitos secundarios	7
1.2.3. Rutas biosintéticas	9
1.3. Actividades biológicas.....	15
1.3.1. Actividad antioxidante.....	17
1.3.2. Proteína tau y enfermedad de Alzheimer	23
1.4. Antártida	28
1.5. Hipótesis	31
1.6. Objetivo general	31
1.7. Objetivos específicos	31
2. MATERIALES Y MÉTODOS	32
2.1. Materiales	32
2.1.1. Biológicos.....	32
2.1.2. Reactivos.....	32
2.1.2.1. Fraccionamiento y purificación de moléculas.....	32
2.1.2.2. Ensayos antioxidantes.....	32
2.1.2.3. Expresión y purificación de la proteína tau.....	32
2.1.3. Equipos	33
2.2. Métodos	34
2.2.1. Obtención de los metabolitos secundarios	34
2.2.1.1. Recolección de muestras:.....	34
2.2.1.2. Preparación de los extractos:.....	35
2.2.1.3. Fraccionamiento y purificación:.....	35
2.2.1.4. Caracterización y elucidación estructural de los compuestos aislados	36
2.2.2. Ensayos antioxidantes.....	37
2.2.2.1. Determinación cuantitativa del poder captador del radical libre DPPH de extractos y compuestos puros aislados	37
2.2.2.2. Capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC fluoresceína (ORAC-FL)	38
2.2.3. Producción de proteína Tau	39
2.2.3.1. Clonamiento de htau en vectores de expresión bacteriana	39
2.2.3.2. Digestión Enzimática	39
2.2.3.3. Reacción de Ligación	40
2.2.3.4. Generación de bacterias competentes:	40
2.2.3.5. Transformación de bacterias competentes:	41

2.2.3.6.	Clonamiento de 4RMBD en vectores de expresión bacteriana	42
2.2.3.7.	Amplificación del fragmento de 4RMBD por PCR	42
2.2.3.8.	Digestión Enzimática:	43
2.2.3.9.	Reacción de Ligación:	44
2.2.3.10.	Transformación de células competentes:	44
2.2.4.	Purificación de 4RMBD desde cultivos de <i>E coli</i>	45
2.2.4.1.	Producción de proteína:	45
2.2.4.2.	Purificación proteica:	45
2.2.4.3.	Diálisis del fragmento 4RMBD	46
2.2.4.4.	Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE	47
2.2.5.	Estudio de la agregación para el fragmento 4RMBD	48
3.	RESULTADOS	49
3.1.	Recolección de las muestras	49
3.2.	Fraccionamiento y purificación	50
3.2.1.	<i>Umbillicaria antarctica</i>	50
3.2.1.1.	Elucidación estructural de los compuestos aislados	52
3.2.1.2.	Identificación de los metabolitos por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS	58
3.2.2.	Ramalina terebrata	63
3.2.2.1.	Elucidación estructural de los compuestos aislados	64
3.2.2.2.	Identificación de los metabolitos por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS	68
3.3.	Ensayos antioxidantes	72
3.3.1.	Determinación del poder captador del radical libre DPPH	72
3.3.2.	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC-FI)	73
3.4.	Producción de proteína	75
3.4.1.	Amplificación y clonamiento del fragmento 4RMBD	75
3.4.2.	Expresión y purificación de 4RMBD recombinante desde cultivos de <i>E. coli</i>	76
3.4.3.	Purificación de la fracción	77
3.4.4.	Estudio de la agregación del fragmento 4RMBD <i>in vitro</i>	77
4.	DISCUSIÓN	82
5.	CONCLUSIÓN	87
	PUBLICACIONES	90
	CONGRESOS	91
6.	BIBLIOGRAFÍA	92

Lista de Tablas

Tabla 1: Actividades antioxidantes de extractos líquénicos	19
Tabla 2: Actividades antioxidantes metabolitos secundarios	22
Tabla 3: Partidores de la amplificación de 4RMBD.....	42
Tabla 4: Datos de colecta U. antarctica	49
Tabla 5: Datos de colecta R. terebrata.....	50
Tabla 6: Obtención de los extractos	50
Tabla 7: Identificación por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS de los metabolitos presentes en el extracto metanólico U. antarctica.....	60
Tabla 8: Obtención de los extractos para R. terebrata.....	63
Tabla 9: Identificación por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS de los metabolitos presentes en el extracto metanólico de R. terebrata.....	69
Tabla 10: Actividades DPPH extractos y metabolitos.....	72
Tabla 11: Actividades ORAC-FI extractos y metabolitos	74
Tabla 12: Variables inducción.....	76

Lista de Figuras

Figura 1: Simbiosis liquénica	2
Figura 2: Metabolitos secundarios de líquenes	7
Figura 3: Rutas biosintéticas de los líquenes.....	9
Figura 4: Fenoles mononucleares	10
Figura 5: Esqueleto común dépsidos y depsidonas.....	11
Figura 6: Cromonas, xantonas y antraquinonas	13
Figura 7: Ácido úsnico	14
Figura 8: Metabolitos ruta ácido Shikímico.....	14
Figura 9: Esteroide vía ácido Mevalónico	15
Figura 10: Distribución de los metabolitos secundarios.....	20
Figura 11: Actividades antioxidantes de los dépsidos y las depsidonas	21
Figura 12: Isoformas de la proteína tau[98].	25
Figura 13: Miricetina y galato de epigalocatequina	27
Figura 14: Antraquinonas contra la agregación de tau	28
Figura 15: Actividades antioxidantes de líquenes Antárticos versus líquenes tropicales	30
Figura 16: Reacción DPPH.....	38
Figura 17: Metabolitos obtenidos del extracto de diclorometano de U. antartica	51
Figura 18: Metabolitos obtenidos del extracto metanólico de U. antartica	52
Figura 19: RMN-H¹ Tenuiorina	53
Figura 20: RMN-H¹ Acido girofórico	54
Figura 21: RMN-H¹ Acido lobarico.....	55
Figura 22: RMN-H¹ Acido úsnico	56
Figura 23: RMN-H1 Atrarato de metilo.....	57
Figura 24: Proporción de los metabolitos identificados para el extracto metanólico de U. antartica.....	61
Figura 25: Metabolitos secundarios identificados del extracto metanólico U. antartica	62
Figura 26: Nuevos compuestos identificados por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS	62
Figura 27: Metabolitos aislados de R. terebrata.....	64
Figura 28: RMN-H¹ Parietina	65
Figura 29: RMN-H¹ Atrarato de metilo	66
Figura 30: RMN-H¹ Inositol.....	67
Figura 31: Proporción de los metabolitos identificados para el extracto metanólico de R. terebrata.....	70
Figura 32: Metabolitos secundarios identificados del extracto metanólico de R. terebrata.....	71

Figura 33: Decaimiento del consumo de FI por efectos del radical peróxido, en presencia del compuesto a estudiar y relación del área bajo la curva del decaimiento versus concentración.....	73
Figura 34: Análisis electroforético de la digestión del vector pET-28a/4RMBD	76
Figura 35: Electroforesis en gel de SDS-PAGE al 15% evidenciando la presencia del fragmento 4RMBD purificado	77
Figura 36: Actividad anti-agregante del extracto metanólico de R. terebrata en comparación al respectivo control	79
Figura 37: Actividad anti-agregante de Parietina en comparación al respectivo control	79
Figura 38: Actividad anti-agregante del extracto metanólico de U. antarctica en comparación al respectivo control	80
Figura 39: Actividad anti-agregante de la Tenuiorina en comparación al respectivo control	80
Figura 40: Azul de metileno	81

Lista de términos y abreviaturas

4RMBD	Dominio de unión a microtúbulos de cuatro repeticiones
Aa	Aminoácidos
AAPH	2,2'-Azobis-(2-aminopropano)- dihidrocloruro
A β	Amiloide beta
AcOEt	Acetato de etilo
AGEs	Productos de glicosilación avanzada
BHA	Hidroxibutilanisol
BHT	Butilhidroxitolueno
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CE ₅₀	Concentración efectiva
CHCl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
DO	Densidad óptica
DMSO	Dimetilsulfoxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
GAE	Equivalentes de ácido gálico
Gsk-3 β	Glicógeno sintasa quinasa 3-beta
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Agua oxigenada
HPLC	Cromatografía líquida de alta precisión
Htau	Tau humana
Htau-Histag	Tau humana con hexapéptido de histidina
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria-Bertoni
MAPs	Proteínas asociadas a microtúbulos
MeOH	Metanol
NaCO ₃	Carbonato de sodio
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NaH ₂ PO ₄	Bifosfato de sodio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NFTs	Ovillos neurofibrilares
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHFs	Filamentos helicoidales pareados
PHFs-like	Filamentos tipo helicoidales pareados
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RMN-H ¹	Espectroscopia de resonancia nuclear de hidrógenos
SF	Filamentos rectos

SP	Placas seniles
ThT	Tioflavina T
TLC	Cromatografía en placa fina
TPTZ	2,4,6-tripicril-s-triazina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tween-20	Monolaureato de polioxietileno sorbitano
VC	Volúmenes de columna

RESUMEN

Los líquenes son el grupo vegetal de mayor diversidad presentes en el Continente Antártico. Con temperaturas extremas, altos niveles de radiación ultravioleta y tiempos prolongados de oscuridad, hacen de este territorio, el lugar ideal para la búsqueda de nuevos metabolitos con mejores propiedades farmacológicas.

El presente trabajo se centra en el estudio de las especies *Umbilicaria antarctica* y *Ramalina terebrata*. A partir de sus extractos metanólicos se lograron aislar 5 metabolitos de *U. antarctica* (ácido girofórico, ácido úsnico, ácido lobarico, metil orselinato y tenuiorina) y 6 metabolitos de *R. terebrata* (parietina, atrarato de metilo, inositol, ácido girofórico, ácido úsnico y el ácido lobarico).

El análisis realizado por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS a los mismos extractos, permitió por primera vez, identificar 15 metabolitos para *U. antarctica* y 22 metabolitos para *R. terebrata*. Además el derivado de la emodina (4,5-dihidroxi-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-2,7-dicarbaldhido), el derivado del ácido crustínico, el ácido 3-((4-((2,4-dihidroxi-6-methylbenzoil)oxi)-2-hidroxi-6-methylbenzoil)oxi)-5 hidroxibenzoico y el isómero del ácido girofórico, resultaron ser nuevos en *U. antarctica*. Mientras que los 22 metabolitos de *R. terebrata* ya habían sido reportados individualmente.

Por otro lado los ensayos antioxidantes demostraron que para el caso de ORAC-FL solo 4 de los 8 metabolitos testeados tuvieron actividades. El orden decreciente de las actividades fue: ácido girofórico, ácido lobarico, tenuiorina e inositol. Igualmente, el extracto metanólico de *R. terebrata* fue superior al extracto metanólico de *U. antarctica*.

Del mismo modo, el ensayo del DPPH arrojó que solo 6 de los 8 metabolitos presentaron actividad. El orden decreciente de las actividades para este caso fue: ácido girofórico, tenuiorina, ácido lobarico, parietina y ácido úsnico. Por otro lado el extracto metanólico de *U. antarctica* fue superior al extracto metanólico de *R. terebrata*. Por último en las dos metodologías empleadas los dépsidos demostraron tener mejores actividades antioxidantes que las depsidonas.

Finalmente del *screening* realizado por el ensayo ThT a los metabolitos, solo la parietina y la tenuiorina lograron inhibir la agregación de la proteína tau en base a efectos positivos de dosis/respuesta. De ellas la parietina fue la que tuvo los mejores resultados. Del mismo modo, el extracto metanólico de *R. terebrata* fue superior al extracto metanólico de *U. antarctica* (e inclusive a los dos metabolitos aislados).

ABSTRAC

Lichens are the most diverse vegetative group present in the Antarctic Continent. Extreme temperatures, high levels of ultraviolet radiation and prolonged hours of darkness, transform this territory into the ideal place for the search of new metabolites with improved pharmaceutical properties.

The following work is focused on the study of the *Umbilicaria antarctica* and *Ramalina terebrata* species. Five metabolites were successfully isolated from the methanolic extracts of the *U. antarctica* (gyrophoric acid, usnic acid, lobaric acid, methyl orselinate and tenuiorin), and six metabolites of the *R. terebrata* (parietin, methyl atrarate, gyrophoric acid, usnic acid, inositol and lobaric acid).

The analysis carried out by UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS upon the aforementioned extracts, for the first time, made possible the identification of fifteen and twenty-two metabolites for the *U. antarctica* and the *R. terebrata* respectively. Additionally, the emodin derivative (4,5-dihydroxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2,7-dicarbaldehyde), crustinic acid, the 3-((4-((2,4-dihydroxy-6-methylbenzoyl)oxy)-2-hydroxy-6-methylbenzoyl)oxy)-5-hydroxybenzoic acid and the gyrophoric acid isomer, turned out to be new in the *U. antarctica*. However, the twenty-two metabolites of the *R. terebrata* had been individually reported previously.

On the other hand, antioxidant testing demonstrated that in the case of ORAC-FL, only four of the eight tested metabolites show activities. The descendant order of activities was as follows: gyrophoric acid, lobaric acid, tenuiorin and inositol. Likewise, the methanolic extract of the *R. terebrata* was superior to that of the *U. antarctica*.

In the same manner, the DPHH testing cast only six of the eight metabolites showing activity. The descendant order of activities for this case was as follows: gyrophoric acid, tenuiorin, lobaric acid, parietin and usnic acid. On the other hand, the methanolic extract of the *U. antarctica* was superior to that of the *R. terebrata*. Finally, the dépside demonstrated superior antioxidant activity than that of the depsidones during both assay applied.

Finally, from the screening applied to the metabolites (ThT assay), only the parietin and the tenuiorin were able to inhibit the aggregation of the tau protein based on the positive dose/response correlation. Among these the parietin obtained the best results. Likewise, the methanolic extract of the *R. terebrata* was superior that of the *U. antarctica* (even to that of both metabolites isolated).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Líquenes

Desde un punto de vista fisiológico, un líquen puede ser definido como la asociación simbiótica entre un hongo (micobionte) y uno o más organismos fotosintetizadores (algas o cianobacterias)[1-4] de los cuales, se espera una estrecha relación entre ambas partes, independientemente del desarrollo morfológico alcanzado por la simbiosis. Hasta la fecha, se ha visto que en la mayoría de los casos, es el hongo quien estaría dominando la simbiosis, abarcando el mayor desarrollo y complejidad estructural que su par simbiote [5] (Figura 1). La gran mayoría de los hongos liquenizados son *ascomycetos*, mientras que muy pocas especies de líquenes pertenecen a *basidiomicota*, *deuteriomicota*, *mastigomicota* y *mixomicota*[6], sin embargo son tantos los cambios estructurales que sufre el micobionte, que resulta difícil poder relacionarlos con algún hongo de vida libre. Aproximadamente el 30% de todos los hongos posee el potencial para actuar como un micobionte, siendo un 8% ligado a la simbiosis como micorrizas y un 21% relacionado con la asociación líquénica[7]. Ante este hecho no parecería raro definirlos como hongos que se han adaptado a una forma de vida autotrófica, otorgando enormes ventajas evolutivas a los organismos que los conforman.

En el 90% de los líquenes, las algas son las responsables de la fotosíntesis. Entre las algas que participan destacan, las especies *Coccomixa*, *Trebouxia* y *Trentepohlia*, siendo esta última, la que presenta una mayor distribución, abarcando aproximadamente el 70% de

los líquenes[8]. Estas especies se caracterizan por su estructura eucariótica, además de pertenecer a las algas verdes. Para el 10% de los líquenes restantes, las algas verdes se sustituyen o son acompañadas por cianobacterias procariotas en su mayoría del género *Nostoc*, los cuales pueden sintetizar nutrientes a partir del nitrógeno absorbido por los heterocistos[8-10].

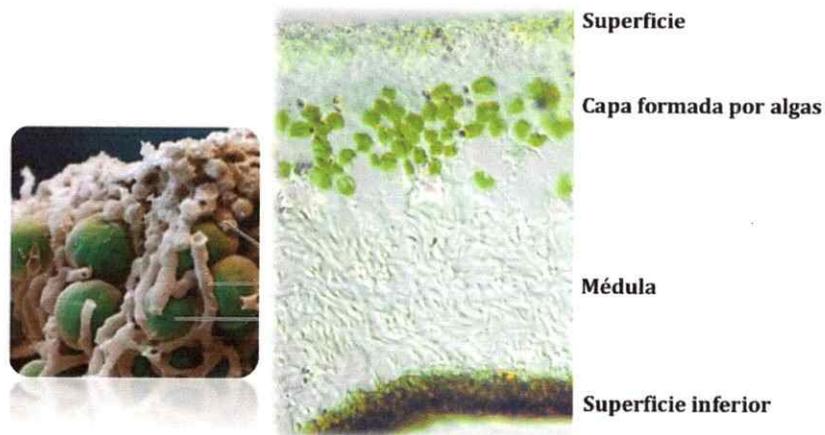


Figura 1: Simbiosis líquénica

En el estado de liquenización, ambos socios tienen beneficio. El hongo es el encargado de entregar el soporte estructural al alga y a su vez ser una fuente para sus requerimientos hídricos y luminosos[11]. A través de sus hifas opacas, el alga es protegida de la intensa luz solar, evitando así su desecación, factor que les ha permitido desarrollarse en zonas de alta luminosidad. En algunos casos se ha visto que los pigmentos depositados en la corteza del líquen contribuyen en algún grado a regular la cantidad de luz recibida por el ficobionte[7].

Por otro lado, el hongo al estar desprovisto de clorofila, obtiene su principal recurso energético a partir de la capacidad fotosintetizadora del ficobionte[11]. El alga traspassa una gran variedad de sustancias químicas al hongo, provocando que la pared celular se vuelva más permeable a la pérdida de hidratos de carbono, principalmente ribitol, poliol de tipo pentosa, el cual es transformado mediante complejas vías metabólicas, a una azúcar de seis carbonos denominada manitol, incapaz de retornar al alga, así el micobionte asegurará su alimento sin interferir en la dinámica del alga[12-13].

El éxito de la simbiosis ha hecho de que los líquenes puedan desarrollarse prácticamente en todas partes, ocupando variados sustratos ecológicos en diversas zonas climáticas, donde la condición de vida libre de los biontes, no existiría. Hasta la fecha se ha reportado 18.900 especies[14-15], lo que equivale aproximadamente a un 8% de la superficie terrestre del planeta[16]. Es posible encontrarlos desde el nivel del mar hasta las cumbres más altas, en desiertos donde la temperatura es variable, sobre y dentro de las rocas, en la corteza de los árboles y sus hojas, selvas tropicales, zonas de alta humedad y regiones polares, entre otras[17-18]. En definitiva la presencia de estas especies en los distintos hábitats dependerá de la disponibilidad de factores físicos y climáticos que proporcionen las condiciones necesarias para su desarrollo. Así cada región puede tener una comunidad líquénica con sus propios componentes específicos en respuesta a las condiciones ambientales[19]. En la Antártida por ejemplo forman el grupo vegetal de mayor diversidad específica, encontrándose mejor adaptado a las condiciones geográficas y climáticas[1]. A pesar de esta extrema variedad de adaptaciones ecológicas, la mayoría de los líquenes

son muy específicos respecto al sustrato y al medio donde se desarrollan, por este motivo es raro que puedan desarrollarse en hábitats donde las condiciones varíen mucho[20].

1.2. Metabolitos y rutas biosintéticas

Otra de las particularidades de los líquenes, es la capacidad de sintetizar una gran variedad de metabolitos, que a menudo son estructuralmente únicos. La variabilidad y cantidad de estos compuestos, en la mayoría de los líquenes, vendría a estar dado por los factores ambientales, lo que demostraría la importancia de estas sustancias para la capacidad de adaptación ecológica de líquenes, en algunos casos se ha comprobado que juegan un rol clave frente a la protección contra factores como: estrés oxidativo causado por: altos niveles de radiación UV, temperaturas extremas, y tiempos prolongados de oscuridad; efectos disuasivos contra herbívoros, protección contra un amplio espectro de agentes patógenos, efectos alelopáticos, factores abióticos, etc.[18,21-23] Los metabolitos sintetizados por los líquenes pueden clasificarse en dos grandes grupos: primarios y secundarios.

1.2.1. Metabolitos primarios

Los compuestos primarios, generalmente son sustancias intracelulares, producidos tanto por el hongo como el alga, la mayoría de estos metabolitos no son específicos, debido a que pueden encontrarse en la mayoría de los hongos de vida libre, algas y plantas superiores[24]. Generalmente son solubles en agua por lo que pueden ser extraídos, simplemente con agua caliente. Los metabolitos primarios incluyen: Hidratos de carbono, carotenoides, vitaminas, aminoácidos y proteínas[9].

Carbohidratos: Los polisacáridos son los productos principales de la actividad fotosintetizadora de los ficobiontes, su concentración fluctuaría entre el 3 y 5% de peso equivalente de los talos secos[25]. Entre los compuestos que más destacan se encuentran el glicerol, eritritol, ribitol, glucosa, arabitol, fructosa, volemitol, tagatosa, pustulan, mio-inositol, liquenin, sacarosa, trehalosa[20,26].

Carotenoides: Son productos metabólicos de ambos simbioses, su concentración varía entre un 1,5-24 mg/g de talo seco[9]. Entre los carotenoides identificados se encuentran: α criptoxantina, luteína, astaxantina, anteraxantina, cantaxantina, mutatoxantina, neoxantina, violaxantina, zeaxantina, taraxantina, mutatoxantina, α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno[20].

Vitaminas: El aporte vitamínico está netamente relacionado con el metabolismo del alga, dado que los hongos carecen de estos compuestos o simplemente son pobres en ellos. Vitaminas como el ácido ascórbico, biotina, α -tocoferol, ácido nicotínico, ácido

pantoteico, riboflavina, tiamina y ácido fólico son comunes de encontrar en casi todos los líquenes[20].

Aminoácidos y proteínas: La naturaleza de los aminoácidos y proteínas de líquenes no está bien establecida y hay pocos informes sobre el aislamiento de estas sustancias, se ha visto que la cantidad de estos compuestos está comprendida entre un 1,6 y 11,4% en relación al peso seco de los talos del liquen[9]. De los aminoácidos y sus respectivos derivados que se producen en líquenes destacan: la sarcosina, intermediario y subproducto en los procesos de degradación y síntesis de la glicina, taurina (derivado de la cisteína), citrulina α -aminoácido, ácido β -aminobutírico, alanina, ácido glutámico, entre otros. A su vez, en el ámbito de la enzimología se ha reportado el aislamiento de ureasas, manitol deshidrogenasa, bromoperoxidasa, inhibidores de serina proteasas (tripsina y calicreina tisular) entre otros [20,27,28].

1.2.2. Metabolitos secundarios

La mayoría de los compuestos orgánicos producidos por los líquenes son metabolitos secundarios. De acuerdo a las cifras reportadas, existen más de 1.200 compuestos identificados a partir del metabolismo secundario[29,30]. Gran parte son exclusivos de estas especies, mientras que solo una pequeña minoría se produce en los hongos no liquenizados o en plantas superiores. En general, la composición de las muestras se caracteriza por la presencia de 1 a 3 metabolitos acumulados en alto rendimiento[31]. Los compuestos más comunes que se pueden encontrar son los aromáticos policétidos (Figura 2), en particular; dépsidos, depsidonas, antraquinonas, dibenzofuranos, depsonas, quinonas, xantonas, etc. Hecho que ha caracterizado a los líquenes como una clase de organismos ricos en compuestos polifenólicos[32].

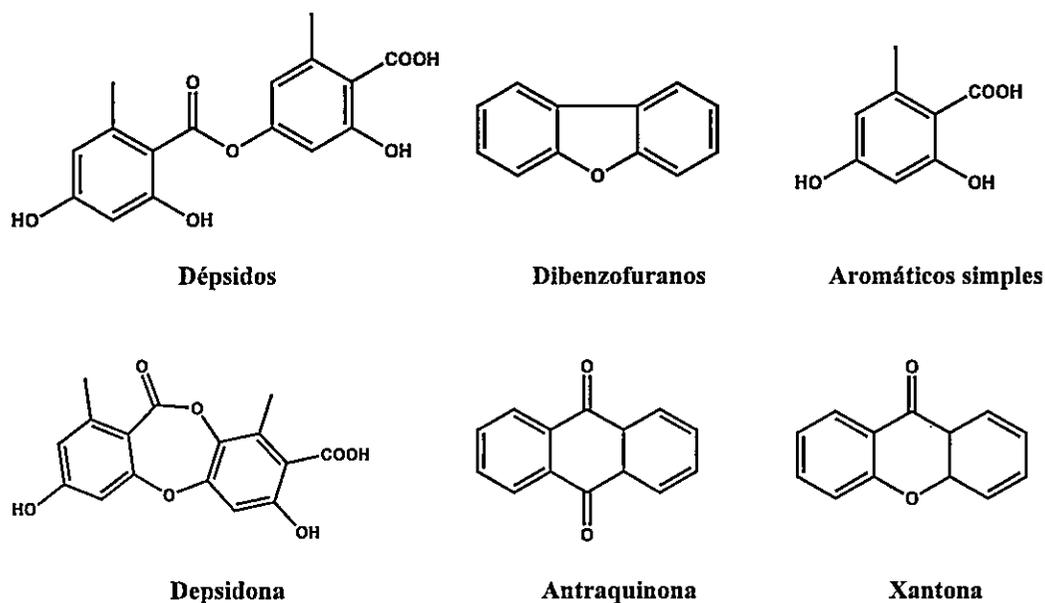


Figura 2: Metabolitos secundarios de líquenes

Los metabolitos secundarios son sintetizados principalmente por el socio fúngico. Este origen ha sido confirmado por varios autores[33-37]. Sin embargo, las interacciones metabólicas entre ambos biontes son esenciales para la producción de estos compuestos químicos, ya que la fuente de carbono necesaria para la biosíntesis de estos compuestos es proporcionada por la actividad fotosintética del alga. Este hecho ha sido corroborado por experimentos en donde un determinado micobionte se ha cultivado sin su respectivo fotobionte[38,39] demostrando que éste no produce los mismos metabolitos o genera un conjunto completamente diferente que el respectivo líquen.

Estas sustancias al ser generadas se liberan en el espacio extracelular, para depositarse en la superficie de las hifas (muchos de éstos en forma de cristales) los cuales son poco solubles en agua, y por lo general solo pueden ser extraídos con solventes orgánicos[40,41]. Sin embargo, cabe señalar que puede ocurrir que algunas de estas moléculas también se encuentren en otras partes de los líquenes, como en la médula o la corteza. Las sustancias de color son ejemplos típicos de metabolitos ubicados en la corteza.

Una vez formados los metabolitos secundarios, parecen ser extremadamente estables. Se ha comprobado que las especies de herbario muy antiguas, no muestran ninguna disminución significativa en las concentraciones de sus compuestos secundarios. Se estima que, las concentraciones de metabolitos secundarios puede variar de 0,1 a 10% respecto al peso seco del talo, aunque en algunos casos, su concentración puede ser más alta, no obstante estos valores pueden variar ampliamente dentro de una misma especie[42].

1.2.3. Rutas biosintéticas

Los líquenes emplean una serie de rutas biosintéticas para producir la inmensa variedad de metabolitos secundarios; entre las rutas que destacan se encuentran: la ruta de acetato polimalonato, la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido mevalónico.

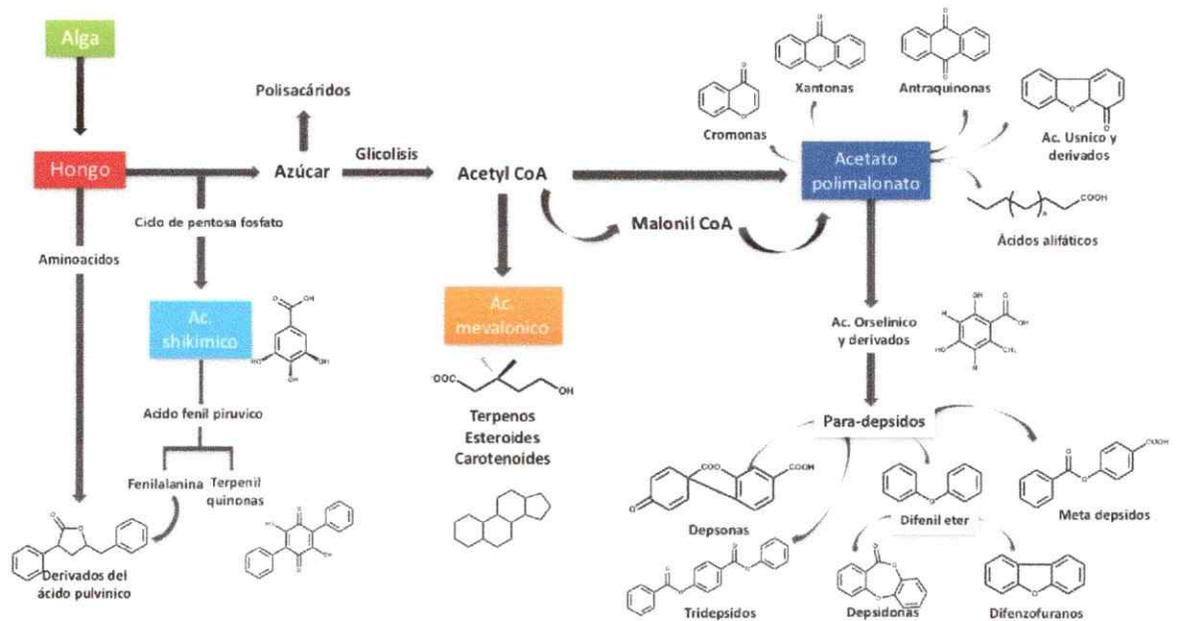


Figura 3: Rutas biosintéticas de los líquenes [43,44]

Vía del Acetato polimalonato: Produce los metabolitos más comunes y abundantes en líquenes, entre ellos destacan: Compuestos fenólicos mononucleares, dépsidos, tridépsidos, depsidonas, benzil ester, difenil ester, dibenzofuranos, antraquinonas, cromonas, xantonas ácidos alifáticos[45], etc.

Compuestos fenólicos mononucleares: Se caracterizan por la presencia de anillos aromáticos unidos a grupos hidroxilos y alquilos. Las unidades de compuestos fenólicos

más comunes en este grupo son las estructuras de tipo orcinol y β -orcinol, más sus respectivos derivados, tales como el ácido orselínico, el metil orselinato, atrarato de metilo[20], etc. (Figura 4).

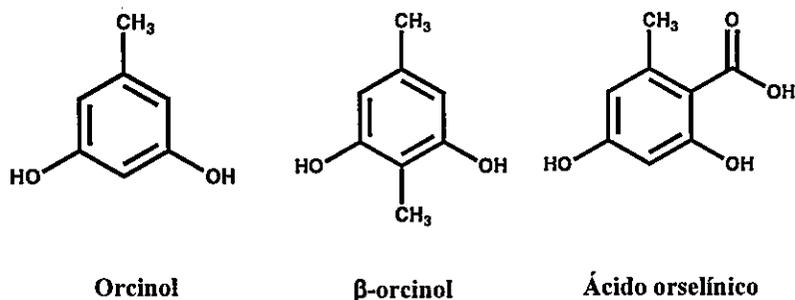


Figura 4: Fenoles mononucleares

Metabólicamente hablando los derivados del orcinol y β -orcinol son conocidos por ser intermediarios en la síntesis de otros metabolitos, tales como los dépsidos y las depsidonas. Un ejemplo de esto sería la esterificación de dos unidades de ácido orselínico, específicamente, entre el un grupo carboxílico de un anillo y el grupo hidroxilo en posición 3 o 4 del segundo anillo, lo que formaría un para- o un meta-dépsido, (dependiendo si es 3 o 4 la posición del OH). Ahora bien si hubiera una segunda esterificación, se produciría un tridépsido. En base a lo dicho, se ha visto que la presencia de estos metabolitos es muy escasa, debido a que la mayor parte de los compuestos presentes en los talos vendrían a ser productos finales de las rutas biosintéticas[44].

Dépsidos y depsidonas: Son la clase de metabolitos secundarios más abundante en los líquenes (Figura 5). Según *Huneck y Yoshimura*[20] existen aproximadamente 200 dépsidos y 116 depsidonas reportadas. La diversidad estructural y su ocurrencia en estas

especies ha generado un interés considerable en sus actividades biológicas. Para el caso de los dépsidos, su síntesis está mediada por la condensación de dos o más unidades de ácidos hidroxibenzoicos (ácido orselínico y derivados)[46]. El grupo carboxilo de un anillo se esterifica con un hidroxilo fenólico de la segunda molécula. Dependiendo si la posición del hidroxilo se encuentra en el orden 3 o 4 (segundo anillo) formará un para- o un meta- dépsido. Ahora bien, si hubiera una segunda esterificación, se produciría un tridépsido[47].

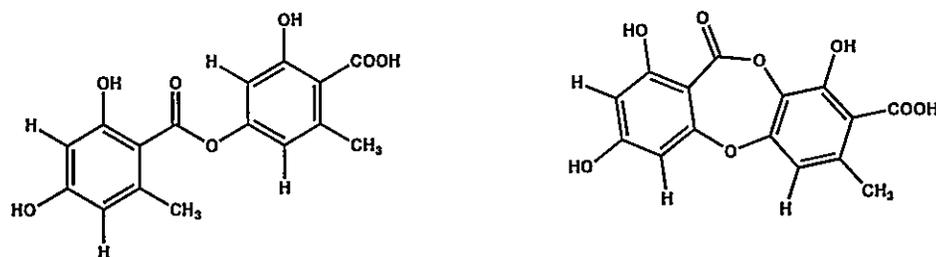


Figura 5: Esqueleto común dépsidos y depsidonas

Por otro lado, el origen biosintético de las depsidonas aún no está claro. *Culberson*[48] señala que la síntesis de estos metabolitos está dada por una ciclación oxidativa, entre el hidroxilo 2 y el hidroxilo 5' de cada anillo. Sin embargo la reacción es energéticamente desfavorable y no tiene lugar fácilmente en condiciones de laboratorio[49]. *Sala y col*[50] señaló que las depsidonas derivan de los dépsidos a través de benzofenonas de acoplamiento fenólico, con espirobenzofuranona como intermediario. Sin embargo, ninguno de estos intermediarios se produjo de forma natural en los líquenes, a pesar de ser un proceso energéticamente favorable[49,50]. Reconstrucciones miméticas de la vía

de biosíntesis han demostrado que existen varios reordenamientos intramoleculares, los cuales son sumamente necesarios, para la estabilidad del anillo dioxepin-11-ona-11-dibenzo-1,4, (un ejemplo de esto es la transposición de Smiles). Por último, la hipótesis más reciente, dice que la biosíntesis más probable estaría relacionada con la oxidación de para-dépsidos mediada por dioxigenasas seguida de la ciclación del intermediario dihidroxidihidrobenceno[44].

Cromonas, xantonas y antraquinonas:

Cromonas: Isómeros de la cumarina, se caracteriza por ser un derivado benzopirano sustituido en el anillo pirano por un grupo ceto. Según *Huneck y Yoshimura*[20] existen 13 cromonas identificadas.

Antraquinonas y naftoquinonas: Los compuestos que pertenecen a esta clase, también se producen en hongos y plantas superiores, se caracterizan por ser los pigmentos más comunes en los líquenes, presentando tonalidades amarillas, rojizas y anaranjadas, entre ellas destaca la parietina, antraquinona de tonalidad anaranjada, con propiedades: antiproliferativas, antibacterianas, antitumorales y antifúngicas[50], entre otras.

En las naftoquinonas y sus respectivos derivados, se han detectado propiedades citotóxicas, por ejemplo, contra líneas celulares de cáncer[51-53].

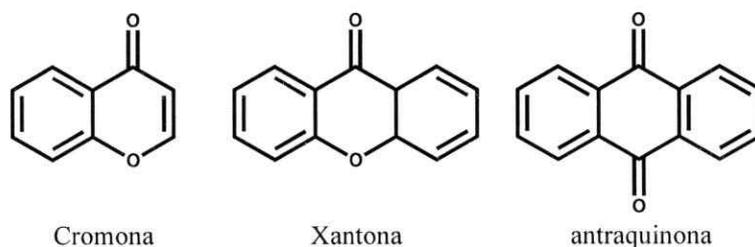


Figura 6: Cromonas, xantonas y antraquinonas

Xantonas: Aproximadamente existen 87 tipos de xantonas reportadas[20]. Su estructura podría derivarse de la condensación lineal de 7 unidades de acetato y de malonato más una ciclación de tipo ácido orselínico. A diferencia de las xantonas de los hongos, muchas xantonas de los líquenes tienen uno o más sustituyentes de cloro nucleares[54].

Dibenzofuranos: Se forman por la ciclación entre dos unidades de ácido orselínico, aparentemente por el acoplamiento carbono-carbono y la ciclo deshidratación de éstos. Se caracterizan por poseer actividades contra las bacterias Gram-positivas, exhibir efectos antivirales, anti-protozoarios, antimitótico, anti-inflamatoria y analgésica[55].

El dibenzofurano más conocido en los líquenes es el ácido úsnico (Figura 7) Este metabolito se caracteriza por su respectiva pigmentación amarilla, la cual es solo conocida para estas especies. Entre las propiedades biológicas reportadas se encuentran: efectos potentes contra bacterias *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Neumococo* y *Mycobacterium tuberculosis*; también exhibe efectos antimicóticos, antivirales, anti-inflamatoria, analgésica[32], etc.



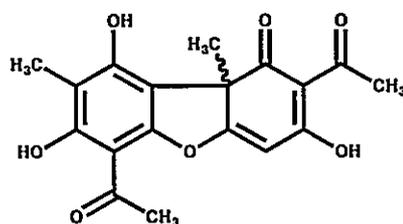


Figura 7: Ácido úsnico

Vía del ácido Shikímico: Los principales compuestos sintetizados por esta ruta son: el ácido pulvínico, las terfenilquinonas y los aminoácidos fenilalanina, tirosina y triptófano (Figura 8). El ácido pulvínico y sus derivados se caracterizan por ser pigmentos de color amarillo o anaranjado, este grupo incluye compuestos como: la calicina, epanirona, ácido leprapínico, ácido vulpínico, ácido rizocarpico ácido pinastrico[20], entre otros. Generalmente estos metabolitos son encontrados en líquenes como *Letraria vulpina*, *Rhizocarpum geographicum* y *Bryoria fremontii*. Por otro lado las terfenilquinonas se presentan como pigmentos rojos y púrpuras, y hasta la fecha solo se conocen dos moléculas; uno de ellos es el ácido polipórico y el ácido telefórico[56]. Además de la síntesis de estos metabolitos, esta ruta produce fenilalanina, tirosina y triptófano, aminoácidos aromáticos que participan como intermediarios en la producción de una gran variedad de productos naturales.

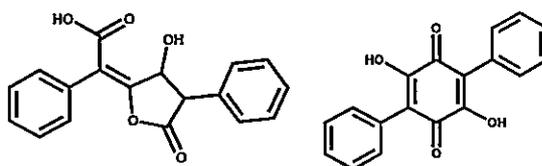


Figura 8: Metabolitos ruta ácido Shikímico

Vía del ácido Mevalónico: Hasta la fecha, se han aislado aproximadamente 70 compuestos derivados de esta vía, entre ellos destacan, los di, tri y sesqui-terpenos (zeorina, leucotina, ácido ursólico, dihidroxiopano, durvilldiol etc.); carotenoides (β -caroteno, γ -caroteno, violoxantina, xantofila y pigmentos de carotenoides no especificados) y esteroides (ergosterol, fungisterol, β -sitosterol)[20], entre otros.

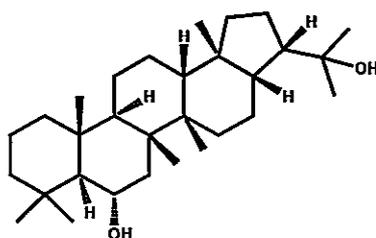


Figura 9: Esteroide vía ácido Mevalónico

1.3. Actividades biológicas

A lo largo de la historia, los líquenes han sido utilizados para diversos propósitos. Por ejemplo, los egipcios usaron a la especie *Evernia prunastri* para el proceso de embalsamar cuerpos. Los romanos emplearon a la especie *Rocella* para teñir las “togas”[57], mientras que en el periodo de Jesucristo, *Lecanora esculenta* fue conocida como el “maná” bíblico[58]. A mediados del siglo XIX, todavía se recogía *Lobaria pulmonaria* en algunas zonas de Inglaterra, para preparar infusiones contra las dolencias respiratorias y aún se usa en Highland de Escocia[59]. En Finlandia en 1919 *Cetraria islándica*, era empleada para combatir los resfriados[60]. Los maoríes de Nueva Zelanda han usado de modo

tradicional la especie *Usnea* como pañales o como compresas para mujeres[61]. *Ramalina farinacea*, *Lobaria pulmonaria*, *Usnea barbata* fueron consumidos para paliar el hambre durante la guerra de Bosnia-Herzegovina durante los años 1992-1995[62]. Los araucanos en nuestro país preparaban infusiones con talos liquénicos para combatir la tuberculosis pulmonar, mucho antes de que los españoles llegaran a América, y en general muchas culturas han utilizado sus extractos para el tratamiento de diferentes patologías[63].

En la actualidad, un buen número de líquenes son usados en la fabricación de productos cosméticos tales como cremas, champús, desodorantes, jabones, fijadores de perfumes y pastas dentales[1-4,11,12,64]. Gracias a su alta sensibilidad y capacidad de acumular diversos contaminantes del aire, los líquenes han sido ampliamente utilizados como biodetectores de contaminación para una serie de compuestos, entre ellos destacan: los metales de Cu, Pb, y Fe, nitrógeno y algunos elementos radionucleares (^7Be , ^{137}Cs , ^{210}Pb , ^{226}Ra , ^{238}U). Adicionalmente, los pigmentos de la especie *Rocella*, se siguen empleando en la fabricación del papel pH[11,65].

Hasta la fecha, las investigaciones sobre las propiedades farmacológicas de los líquenes han logrado demostrar que muchos de los metabolitos aislados de estos organismos presentan una gran variedad de actividades biológicas, proporcionando una fuente prometedora a futuras terapias de drogas. Entre las principales actividades reportadas se encuentran: Antibacterianas, antimicóticas, antivirales, antitumoral, analgésicas, antiinflamatorias, gastroprotectoras, fotoprotectora, anti-cancerígenas, y antioxidantes[1-4,6,11,12,23,31,42,45], entre otras.

1.3.1. Actividad antioxidante

En un normal funcionamiento del metabolismo de los seres vivos, aproximadamente un 2% del oxígeno molecular consumido durante la respiración celular, es reducido a el radical anión superóxido ($O_2^- \bullet$). Este radical ha sido considerado como el precursor de la mayoría de las especies reactivas de oxígeno (ROS)[66]. A concentraciones bajas o moderadas, estas moléculas cumplen un rol clave en procesos químicos celulares, como por ejemplo, etapas de maduración de las estructuras celulares y efectos defensivos contra determinados virus y bacterias[67,68]. Con el transcurso de la evolución, los seres vivos han desarrollado una serie de mecanismos, los cuales regulan el equilibrio entre la generación y la disminución de estas especies reactivas. Los mecanismos internos de eliminación se pueden dividir en 4 etapas:

- Supresión
- Eliminación
- Reparación y reconstitución del daño
- Inducción de proteínas y enzimas antioxidantes.

Ahora bien, el problema surge cuando los sistemas de protección no son suficientes para enfrentar el umbral normal de producción de radicales libres, desencadenando un desequilibrio en la generación y disminución de estos. Cuando se produce este desbalance se genera un fenómeno llamado estrés oxidativo[69]. El estrés oxidativo es un fenómeno nocivo que puede alterar gravemente las membranas celulares y otras estructuras relacionadas a esta como proteínas, lípidos y ácidos desoxirribonucleicos. De no ser regulado adecuadamente, el estrés oxidativo puede inducir una variedad de enfermedades crónicas y neurodegenerativas tales como: Arteriosclerosis, cáncer, diabetes mellitus,

demencia isquémica, Alzheimer, enfisema, hemocromatosis, Parkinson y envejecimiento prematuro[70-72].

Actualmente, los antioxidantes sintéticos como el α -tocoferol (vitamina E), el butil hidroxianisol (BHA), el butil hidroxitolueno (BHT), el terc-butilhidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo (PG) son los compuestos más usados para proteger fármacos y alimentos, dada su eficacia y menor costo que los antioxidantes naturales. Sin embargo, ya que muchos de estos antioxidantes sintéticos han mostrado tener efectos toxicológicos y cancerígenos, ha surgido la necesidad de reemplazarlos con productos de origen natural[73].

En base a esto, muchas investigaciones se han centrado en la búsqueda de nuevos antioxidantes a partir de productos naturales sin ningún efecto indeseable. Numerosos estudios *in vitro* en plantas, líquenes, macro y micro algas, apoyan firmemente el hecho de que sus constituyentes con capacidades antioxidantes, son aptos para ejercer efectos protectores contra el estrés oxidativo.

En el último tiempo, los líquenes han demostrado ser una buena fuente de antioxidantes naturales, debido a la alta presencia y variedad de moléculas polifenólicas que hay en sus extractos. (especialmente dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos, etc.). Se cree que las propiedades antioxidantes de los polifenoles estarían dadas por la presencia de uno o varios grupos hidroxilos fenólicos, los que conferirían un alto potencial para eliminar los

radicales libres[74]. Por ejemplo, los compuestos fenólicos son capaces de donar átomos de hidrógeno, correspondientes al OH para estabilizar a radicales libres, y a su vez, generar radicales menos reactivos como el radical fenoxilo[75,76].

Existen una serie de informes en los que se ha visto una correlación positiva entre el contenido total de compuestos fenólicos de los extractos, versus la actividad antioxidante testeada[77-80].

Tabla 1: Actividades antioxidantes de extractos líquénicos[81]

Especie	Trolox eq	Especie	Trolox eq
Alectoria ochroleuca	107	Letharia vulpina	7
Alectoria sarmentosa	5	Lobaria fuscotomentosa	196
Anzia opuntiella-1	37	Lobaria isidiophora	0
Anzia opuntiella-2	30	Lobaria linita	0
Anzia opuntiella-3	140	lobaria pulmonaria	0
Arctoparmelia centrifuga	0	Lobaria scrobiculata	87
Baeomyces placophyllus	72	Lobaria spathulata	14
Bryoria fremontii	128	Menegazzia terebrata	83
Bryoria nadvornikiana	51	Nephroma laevigatum	31
Canoparmelia aptata	64	Nephromopsis nephromoides	79
Cetraria laeviganda	56	Nephromopsis ornata	256
Cetrelia braunsiana-1	0	Ochrolechia yasudae	92
Cetrelia braunsiana-2	17	Pannoparmelia angustata	115
Cladia aggregata	0	Parmelia adaugescens	105
Cladina arbuscula	20	Parmelia laevior	109
Cladina rangiferina-1	12	Parmelia praesquarrosa	97
Cladina rangiferina-2	29	Parmelia sinanoana	56
Cladina subrangiferina	38	Parmelia squarrosa	38
Cladonia amaurocraea	75	Parmelia submontana	80
Cladonia arbuscula	64	Parmelia sulcata	100
Cladonia convolute	49	Parmotrema chinense-1	55
Cladonia crispata	0	Parmotrema chinense-2	121
Cladonia furcata	103	Peltigera aphthosa	207
Cladonia gracilis	57	Peltigera elizabethae	214
Cladonia krempelhuberi-1	6	Peltigera neopolydactyla	184
Cladonia krempelhuberi-2	24	Peltigera praetextata	139
Cladonia macilenta	90	Peltigera pruinosa	96
Cladonia rangiferina-1	4	Peltigera rufescens	201
Cladonia rangiferina-2	7	Peltigera aphthosa	182
Cladonia rangiferina-3	11	Pseudevernia furfuracea	257
Cladonia scabriuscula	1	Pseudocyphellaria crocata	83
Cladonia sp.	26	Punctelia rufecta	5
Cladonia vulcani-1	184	Pyxine limbulata	0
Cladonia vulcani-2	31	Ramalina capitata	47
Coenogonium luteum	10	Rimelia clavulifera	0
Collema sublaecidum	0	Stereocaulon intermedium-1	26
Evernia divaricata	0	Stereocaulon intermedium-2	31
Evernia esorediosa	34	Stereocaulon intermedium-3	119
Evernia prunastri	45	Stereocaulon japonicum	84
Flavoparmelia caperata	0	Stereocaulon sorediferum	3
Heterodermia diademata	8	Sticta nylanderiana-1	57
Heterodermia hypoleuca	37	Sticta nylanderiana-2	197
Heterodermia isidiophora	0	Sulcaria sulcata	76
Heterodermia japonica-1	8	Umbilicaria sp.	0
Heterodermia japonica-2	11	Usnea bismolliuscula	31
Hypogymnia hypotrypea	43	Usnea filipendula	120

Hypogymnia vittata	313	Usnea rubrotincta	38
Leptogium pedicellatum	0	Xanthoparmelia tuberculiformis	19
Letharia columbiana	69		

Sin embargo, han habido otros estudios en los que los resultados no mostraron ninguna tendencia. *Odabasoglu y col* en el año 2005[82], *Stojanovic y col* en el año 2010[83] y *Stanly y col.* en el año 2011[84], determinaron respectivamente que no había una correlación positiva entre las concentraciones fenólicas de distintas especies de líquenes (*Cladia*, *Bulbothrix*, *Ramalina*, *Parmotrema*) y sus actividades antioxidantes. Estos resultados implicarían una serie de interrogantes respecto a la actividad antioxidante. Por un lado, se podría decir que la actividad estaría dada por compuestos de naturaleza no fenólica, la cual afectaría las interacciones antagonistas o sinérgicas entre los componentes del extracto. Tampoco habría que descartar la influencia de los componentes minoritarios del extracto.

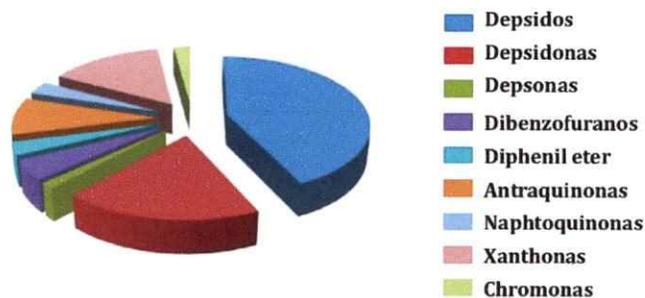


Figura 10: Distribución de los metabolitos secundarios

Intentando resolver esta disyuntiva, se han descrito una serie de ensayos en base a los compuestos aislados de los extractos liquénicos. Según los review realizados por *White y col* en el 2014[32] y *Fernández-Moriano y col* el 2015[74]. Señalaron que de un total de

aproximadamente 78 metabolitos testeados para el primer caso y 60 metabolitos para el segundo, los compuestos de mayor abundancia en los extractos metanólicos son los polifenoles de tipo dépsido y depsidona (Figura 10), por otro lado, la actividad antioxidante (Figura 11) fue evaluada principalmente sobre la base de algunos ensayos químicos, tales como la actividad eliminadora del radical libre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH), eliminación de radical anión superóxido, inhibición de la peroxidación lipídica, entre otros.

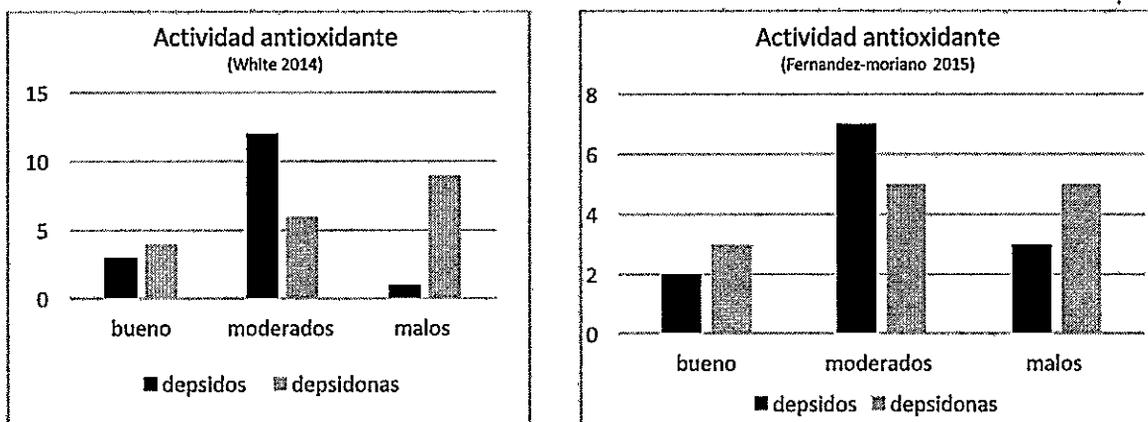


Figura 11: Actividades antioxidantes de los dépsidos y las depsidonas

A continuación se presenta una tabla de las actividades antioxidantes reportadas, para los metabolitos secundarios más comunes en las especies liquénicas.

Tabla 2: Actividades antioxidantes metabolitos secundarios[85]

Metabolito secundario	Referencia
Acido lecanorico	Jayaprakasha and Rao (2000), Lopes et al. (2008), Thadhani et al. (2011), Verma et al. (2011), Bucukoglu et al. (2013)
Atranorina	Hidalgo et al. (1994), Jayaprakasha and Rao (2000), Melo et al. (2011), Sisodia et al. (2013), Rankovic et al. (2014a, b), Kosanic et al. (2014a, b)
Acido psoromico	
Acido boninico	
cloroatranorina	
2,4-Dihydroxy-6-propyl	Sisodia et al. (2013)
Ramalin	Paudel et al. (2008)
Acido barbatico	Verma et al. (2011)
Acido divaricativo	Hidalgo et al. (1994)
Pannarin	Hidalgo et al. (1994), Russo et al. (2008)
Zeorina	Verma et al. (2011)
Acido giriforico	Bucukoglu et al. (2013)
Acido umbillicarico	Bucukoglu et al. (2013)
Acido protocetrarico	Manojlovic et al. (2012)
Acido fumarprotocetrarico	de Barros Alves et al. (2014), Kosanic et al. (2014a, b)
Acido stictico	Lohézic-Le Devéhat et al. (2007)
Acido salazinicico	Verma et al. (2012), Manojlovic et al. (2012)
Acido usnico	Odabasoglu Rankovic et al. (2006), Manojlovic et al. (2012), (2012), Verma et al. (2012), Sisodia et al. (2013), Rankovic et al. (2014a, b)
Acido variolarico	Brisdelli et al. (2013)
Acido 2hidroxi-4metoxi-6propilbenzoico	Sisodia et al. (2013)
Acido evernico	Kosanic et al. (2013a, b)
Erythrina	Choudhary et al. (2009)
2,4-Dihidroxi-3,6-dimetil benzoato	Sisodia et al. (2013)
Acido lobarico	Thadhani et al. (2011), Brisdelli et al. (2013)
Acido phisodico	Kosanic et al. (2013a, b), Rankovic et al. (2014a, b)
Acido protoliquenistico	Sisodia et al. (2013)
Acido norstictico	Rankovic et al. (2012)
Cuculloquinona	Stepanenko et al. (2002)
Acido homosekikaico	Sisodia et al. (2013)
Acido sekikaico	Thadhani et al. (2011), Verma et al. (2012), Sisodia et al. (2013)
Acido benzoico	Sisodia et al. 2013
Acido difractaico	Brisdelli et al. (2013)
Vicanicina	Brisdelli et al. (2013)
Sphaerophorina	Russo et al. (2008)
Isidiophorina	Atalay et al. (2011)
Rhizonaldehido	Atalay et al. (2011)
Alcohol rhizonilico	Atalay et al. (2011)
Pulmonarianina	Atalay et al. (2011)
Acido hypotrachinico	Papadopoulou et al. (2007)
Acido deoxistictico	Papadopoulou et al. (2007)
Cryptostictinolida	Papadopoulou et al. (2007)
Acido 8' metilconstictico	Papadopoulou et al. (2007)
Acido 8' metilstictico	Papadopoulou et al. (2007)

Acido 8 metilmenegaztaico	Papadopoulou et al. (2007)
Acido ethylstictico	Papadopoulou et al. (2007)

Si bien los líquenes son claramente una fuente interesante y rica en compuestos polifenólicos con potencial antioxidante, todavía se requieren más estudios para esclarecer los procesos y mecanismos de acción implicados en sus actividades, además de una correlación de los compuestos mayoritarios activos (dépsidos y depsidonas) en torno a la estructura-actividad.

1.3.2. Proteína tau y enfermedad de Alzheimer

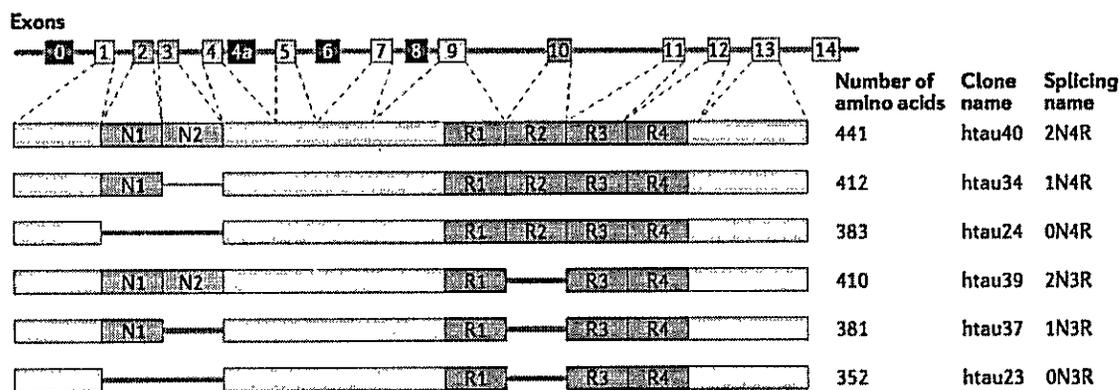
La enfermedad de Alzheimer (EA) es el trastorno neurodegenerativo más frecuente a nivel mundial. Según estimaciones realizadas en el informe mundial sobre el Alzheimer[86], existen más de 46,8 millones de personas que padecen este mal y que los nuevos casos por año se estarían incrementando en 9,9 millones, transformando a esta enfermedad en uno de los mayores problemas de la salud mundial, con un costo económico que en el año 2015 se situó en los 818.000 millones de dólares[86].

Clínicamente esta enfermedad se caracteriza por la degradación selectiva de neuronas en el hipocampo y la corteza, hecho que se ve manifestado en la pérdida de la memoria, disminución de realizar tareas rutinarias, desorientación[87,88], etc. En los cerebros con la EA, se pueden observar (*post mortem*) dos tipos de lesiones características: las placas seniles (PS) cuyo principal componente es un péptido de 39 a 42 aminoácidos llamado β -

amiloide (β A) y los ovillos o marañas neurofibrilares (MNF), estructuras netamente proteicas, constituidas por agregados de la proteina tau anormalmente fosforilada[89-91].

Tau pertenece a la familia de las proteinas asociadas a microtubulos, las que se expresan principalmente en las neuronas. En ellas, tau normalmente cumple la funcion de montaje y estabilizacion de los microtubulos mediante la regulacion del ensamblaje de la tubulina, ademàs de la union de estos con otras estructuras del citoesqueleto (dominio de proyeccion) como los neurofilamentos y proteinas de tipo espectrina y actina[92-94].

Tau està codificada por un gen ubicado en el cromosoma 17 (gen 17q21), el cual mediante el corte y empalme alternativo (*splicing*) de los exones 2, 3 y 10 originarà 6 isoformas moleculares, las que son exclusivas del cerebro humano[95,96]. Estas 6 isoformas estaràn definidas por la presencia de tres o cuatro dominios de repeticion (3R y 4R)[97] en la zona de union a microtubulos (extremo carboxi-terminal) y por la presencia o ausencia de 1 o 2 insertos en el dominio de proyeccion (extremo amino-terminal) tal como se muestra en la Figura 12[98].



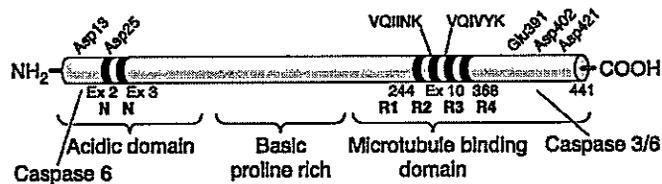


Figura 12: Isoformas de la proteína tau[98].

El corte y empalme del exón 10 es de interés particular, ya que está relacionado a distintas enfermedades neurodegenerativas denominadas taupatías. Sobre la base de estas isoformas, las taupatías se pueden clasificar en: taupatías con cuatro repeticiones (4R), las que incluyen a la parálisis supranuclear progresiva (PSP), la enfermedad de granos argirilos (AGD) y la degeneración ticobasal (CDB). Las taupatías con tres repeticiones (3R), como la enfermedad de Pick y las taupatías 3R + 4R como la enfermedad de Alzheimer[98].

1.3.2.1. Fosforilación de Tau

El proceso de fosforilación y desfosforilación de tau juega un rol clave en la unión de proteína a los microtúbulos y la regulación de la estabilidad del citoesqueleto. Aproximadamente la proteína tau posee más de 84 sitios potenciales de fosforilación. Durante el desarrollo de la patogénesis de la EA, tau comienza a hiperfosforilarse en múltiples sitios, lo que reduce su afinidad por los microtúbulos y se disocia para auto ensamblarse en filamentos de tipo helicoidal pareado o lineal, los que forman los ovillos neurofibrilares. El desacoplamiento de la proteína tau producido por la hiperfosforilación

conlleva a la pérdida de la sinapsis dendrítica, la degeneración de la membrana plasmática, la pérdida sináptica y finalmente la muerte neuronal[99].

La presencia de las inclusiones fibrilares de tau en varias enfermedades neurodegenerativas, llevó a proponer que esta proteína juega un rol clave en la fisiopatología de la EA. En estudios posteriores, se logró correlacionar la acumulación de los ovillos neurofibrilares con la progresión y la gravedad del deterioro cognitivo observado en los pacientes[100]. También una mutación en el gen de tau que causa la demencia frontotemporal y el parkinsonismo, demostró que la disfunción de tau en ausencia del beta-amiloide, fue suficiente para causar la pérdida neuronal y también la demencia clínica. Además la adición de inhibidores de la agregación de tau logró generar una reducción en la muerte neuronal. Curiosamente, se ha detectado la presencia de placas amiloides en pacientes con envejecimiento normal sin presentar ningún deterioro cognitivo[101].

Pese a la evidencia del rol central que estaría cumpliendo tau en una amplia gama de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo al Alzheimer, en las últimas dos décadas, la búsqueda y desarrollo de nuevas drogas ha seguido apuntando a blancos relacionados al beta-amiloide, pero sus resultados siguen siendo desfavorables. Es por esto que se hace vital y oportuno seguir investigando terapias dirigidas a la inhibición y reducción de tau mal plegada, como la indemnización por la pérdida de la función de ésta.

En este contexto, las investigaciones *in vitro* de tau han reportado las prometedoras actividades de algunos polifenoles, como por ejemplo el flavonoide miricetina (Figura 13) que logró inhibir de la agregación de tau para un $IC_{50}=1,2 \mu M$, además de interferir en la fase de elongación del montaje de fibrillas de tau. Otro estudio en base a las semillas de uva, confirmó su capacidad de inhibir la concentración de tau estequiometricamente. De manera, similar al polifenol galato de epigalocatequina (presente en altas concentraciones en la semilla de uva y el té verde) demostró tener un IC_{50} de $1,8 \mu M$, cercano a lo obtenido por la miricetina[102].

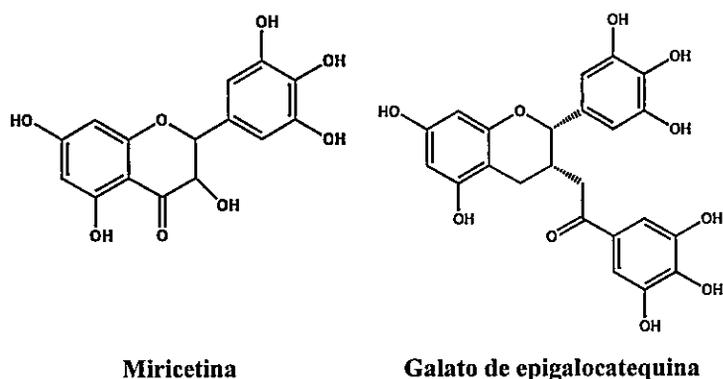


Figura 13: Miricetina y galato de epigalocatequina

Si bien el extracto (para este caso el de semilla de uva) es una mezcla compleja de metabolitos, no deja de ser llamativo que uno de los constituyentes mayoritarios presente la mayor actividad. Por último, las antraquinonas Adriamicina, Daunorubicina, emodina, PHF016 y PHF005, demostraron ser capaces de inhibir la agregación de tau para la secuencia de 3 repeticiones con valores de IC_{50} entre los $1,1$ y $2,4 \mu M$ e indujeron la desagregación de los agregados preformados con valores de DC_{50} entre los $2,2$ y $3,8 \mu M$ [102].

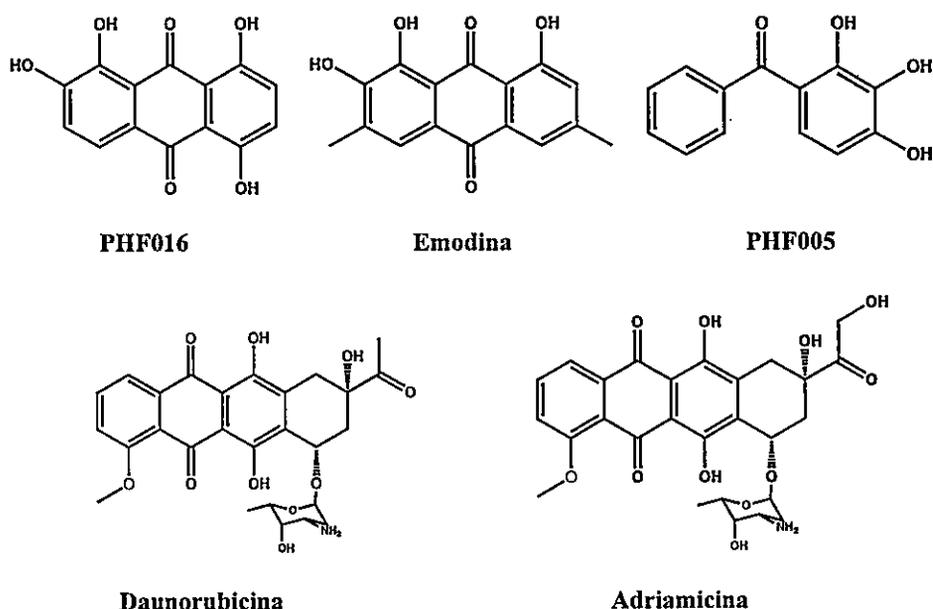


Figura 14: Antraquinonas contra la agregación de tau

1.4. Antártida

El continente Antártico, posee una superficie aproximada de 13.500.000 kilómetros cuadrados. Está dentro del paralelo 66°S, con excepción de la península antártica que avanza hasta el paralelo 63°S. Al oeste de esta península, aproximadamente en el paralelo 61°S, se encuentra la zona denominada Antártica marítima u oceánica. En este sector, se comprueba la existencia de un mejor desarrollo de la vegetación antártica terrestre: Dado su aislamiento geográfico y extremas condiciones ambientales (altos niveles de radiación UV, temperaturas extremas, y tiempos prolongados de oscuridad), es un lugar ideal para la búsqueda de nuevas especies, las cuales se desarrollan en forma limitada en los sectores costeros que quedan libres del hielo y nieve durante los meses de verano, como también

en algunos afloramientos rocosos ubicados en el interior, representando aproximadamente un 4% del área total de la Antártica[20].

Los líquenes, forman el grupo vegetal de mayor diversidad específica y que se encuentra mejor adaptado a estas condiciones, debido a la serie de mecanismos y metabolitos que han desarrollado para sobrellevar estas condiciones ambientales. En ese sentido los estudios realizados a estos organismos, han demostrado que presentan mejores actividades antioxidantes y en menores concentraciones que sus pares tropicales[1]. Sin embargo, los datos obtenidos siguen siendo escasos, en comparación con los abundantes recursos de líquenes que hay en la Antártida. Además, ha habido informes limitados sobre la relación entre la actividad antioxidante de muestras de líquenes y relativamente son pocas las sustancias liquénicas que han sido examinadas en detalle para la actividad biológica y potencial terapéutico, debido principalmente a las dificultades para obtener en cantidades y purezas suficientes para la elucidación estructural y los ensayos farmacológicos. Algunos metabolitos secundarios de líquenes antárticos se han reportado previamente por *Quillot y col. 1989*[106], *1992*[107]; *Piovano y col. 1993*[108], *Castillo y col. 1993*[103], *Garbarino et al. 1987*[104], *1990*[105]. Todos ellos recogidos de la Isla Robert, Islas Shetland del Sur y la isla Rey Jorge.

Actividad eliminadora de radicales (IC50)		
Líquenes antárticos	Extracto MeOH	Extracto acetona
<i>Cetraria aculeata</i>	>1,000	>1,000
<i>Cladonia furcata</i>	>1,000	471.3±35.4
<i>Pseudophebe pubescens</i>	>1,000	>1,000
<i>Sphaerophorus globosus</i>	>1,000	>1,000
<i>Stereocaulon alpinum</i>	>1,000	>1,000
<i>Umbilicaria antarctica</i>	>1,000	121.3±8.4
<i>Usnea antarctica</i>	>1,000	445.7±26.7
<i>Usnea aurantiacoatra</i>	>1,000	642.6±48.7
Líquenes tropicales		
<i>Parmelia saxatilis</i>	NA	—
<i>Platismatia glauca</i>	NA	—
<i>Ramalina pollinaria</i>	NA	—
<i>Ramalina polymorpha</i>	VA	—
<i>Umbilicaria nyländeriana</i>	400.2±0.5	—
<i>Usnea ghattensis</i>	>10,000	—

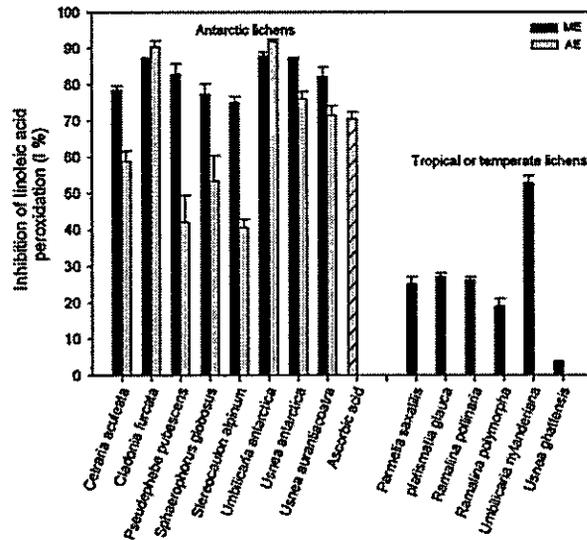


Figura 15: Actividades antioxidantes de líquenes Antárticos versus líquenes tropicales[1]

1.5.Hipótesis

Dados los antecedentes expuestos, la hipótesis de este trabajo es:

Los dépsidos al poseer estructuralmente una mayor cantidad de grupos hidroxilos tendrán mejores actividades antioxidantes que las depsidonas.

Además estos compuestos podrían inhibir la agregación de la proteína tau.

Para probar esta hipótesis se proponen los siguientes objetivos:

1.6.Objetivo general

Estudiar la capacidad antioxidante de metabolitos secundarios aislados de *Umbillicaria antártica* y *Ramalina terebrata* como los respectivos extractos metanólicos, mediante los ensayos ORAC-FL y DPPH.

Además, se evaluará la actividad anti agregante de los extractos metanólicos y de los respectivos metabolitos aislados mediante el test de la tioflavina (ThT).

1.7.Objetivos específicos

Para el cumplimiento del objetivo general se propone:

- **OE1:** Aislar y purificar metabolitos secundarios de *Umbillicaria antarctica* y *Ramalina terebrata*.
- **OE2:** Identificación mediante métodos espectroscópicos principalmente RMN- H^1 y espectrometría de masas de alta resolución.
- **OE3:** Evaluar la actividad antioxidante de los metabolitos aislados (ORAC-Fl y DPPH).
- **OE4:** Determinar la actividad anti agregante de los metabolitos aislados mediante el test de la tioflavina (ThT).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Biológicos

Líquenes: *Umbilicaria antártica* y *Ramalina terebrata*
Cepa bacteriana: *Escherichia coli* BL21(DE3)

2.1.2. Reactivos

2.1.2.1. Fraccionamiento y purificación de moléculas

Gel de sílice (Kieselgel 60, 0.063-0.200 mm, Merck Millipore)
Sephadex LH-20 (Merck Millipore)
Cromatofolios de sílice gel TLC (Kieselgel 60 GF254, Merck Millipore)
Reactivo de Lieberman
Solventes: metanol (MeOH), Acetato de etilo (AcOEt), éter de petróleo, diclorometano (CH₂Cl₂), acetona (CH₃COCH₃), cloroformo (CHCl₃) (Merck Millipore)
Solventes grado HPLC: Agua (H₂O), MeOH (Merck Millipore)
Solventes deuterados: D₂O, CD₃OD, CD₃COCD₃, CDCl₃, dimetil sulfoxido (DMSO) (Merck Millipore)

2.1.2.2. Ensayos antioxidantes

Ácido gálico (Sigma Aldrich).
2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Merck Millipore).
Fluoresceína (FL) (ácido 2-(3-hidroxi-6-oxo-6H-xanten-9-il)benzoico) (Sigma Aldrich).
AAPH (2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (Sigma Aldrich).
Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Sigma Aldrich).

2.1.2.3. Expresión y purificación de la proteína tau

pNG2/htau40 (donado por gentilmente por el Dr. E. Mandelkow, Max Planck Institute, Alemania).
pET-28a(+) (Novagen, USA).
Amortiguador 5X *phusion* HB, 4R Forward (0.1 µg/µL) y primer 4R Reverse (0.1 µg/µL)
polimerasa *phusion* (NEB F-530S, USA).
QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., USA).

Amortiguador 2 de restricción 10X (New England BioLabs, USA).
NdeI 20 U/uL (New England Biolabs, USA).
BamHI 20 U/uL (New England Biolabs, USA).
BSA (New England Biolabs, USA) 100X.
H₂Odd filtrada.
Polimerasa *phusion* (NEB F-530S, USA).
Agarosa, bromuro de etidio.
QIAprep Spin Miniprep Kit (50) (Qiagen Inc., USA).
Ni-Sepharose (GE Healthcare, USA).
Medio SOB.
Medio SOC.
Amortiguador de Células Competentes (CC): 100 mM KCl, 50 mM CaCl₂·H₂O, 10% glicerol y 10 mM acetato de potasio, pH 6.2.
Amortiguador de extracción: 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 1mM PMSF, pH 7.4 suplementado con cocktail de inhibidor de proteasas EDTA-free (Roche).
Amortiguador de unión: 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7.4.
Amortiguador de lavado: 20 mM NaH₂PO₄, 30 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7.4.
Amortiguador de elución: 20 mM NaH₂PO₄, 200 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7.4.

2.1.3. Equipos

pH metro Strarter 2100 Farmalatina.
Centrifuga Arquimed centrifugue 5804.
Balanza analítica AUX120 (SHIMADZU).
Agitador magnético FISATOM.
Agitador de tubos MOBIL TUB (JP selecta).
Baño termostático YSW-01.
Espectrofotómetro semiautomático con pantalla digital.
Fuente de Poder Bio-RadPower Pac 200.
Cámara Electroforética Mini-Protean Tetra System.
Refrigerador -80°C marca Panasonic modelo MDF-U33V-PB.
Refrigerador -20°C consul 260.
Refrigerador 4°C Mademsa.
Fluorímetro Synergy H1 Biotek (Monocromador).
Marcador de proteínas Precision Plus Protein™ Unstained Standards (bio-rad).
Sonicador omni sonic ruptor 400.
Incubador shaker zhwy 100b.
Lector de multiplatos Synergy HT Bio-Tek Instruments Inc. Winooski, USA.
Placas de poliestireno blancas de 96 platos.
Cromatografía líquida de ultra alta presión acoplada espectrometría de masa de alta resolución junto con un detector de arreglo de diodos y en modo negativo (UHPLC-PDA-Q/Orbitrap/MS/MS).
Equipo Buchi modelo Prep Chrom C-700 (Cromatografía líquida de alta resolución).

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención de los metabolitos secundarios

2.2.1.1. Recolección de muestras:

Umbillicaria antarctica y *Ramalina terebrata*, fueron colectadas bajo los protocolos señalados en el tratado antártico sobre protección del medioambiente, normativa SCAR y la autorización del Instituto Antártico Chileno, mediante el permiso N° 137/2015, para las zonas pertenecientes al área protegida ZAEP N°150, península Ardley, bahía Maxwell e Isla rey Jorge (paralelos 562° 12,572' W58° 56,438' y 562° 12,546' W58° 56,432'9), entre el periodo del 3 al 19 de Febrero del 2015, con la asesoría del liquenólogo Reinaldo Vargas Castillo, quien además realizó la determinación taxonómica de las especies antes mencionadas (tabla 4 y 5). Se depositó una determinada cantidad de las muestras, en el herbario interno del laboratorio de productos naturales extremos de la Universidad de Chile.

2.2.1.2. Preparación de los extractos:

Para la obtención de los respectivos extractos, se empleó el siguiente protocolo basado en *Huneck y Yoshimura*[20]. Las muestras secas fueron respectivamente cortadas en pequeños pedazos (1mm x 1mm), luego maceradas con diclorometano (CH_2Cl_2), aprox. 300 ml x 3 por un lapso de 24 hrs, 150 Rpm a 25°C. El producto fue filtrado y concentrado a sequedad mediante rotavapor a 40°C, para luego ser liofilizado y guardado a -20°C. El mismo procedimiento se repite para el metanol (MeOH).

2.2.1.3. Fraccionamiento y purificación:

R. terebrata: El extracto de CH_2Cl_2 en primera instancia fue purificado a través de cromatografía de exclusión molecular (Sephadex LH-20) usando una fase móvil de MeOH, con la finalidad de eliminar grasas, pigmentos y esteroides. Luego las fracciones de interés, fueron sometidas a cromatografía en columna de sílice gel (63-200 μm) utilizando una fase móvil de éter de petróleo: acetato de etilo (AcOEt) (0 a 100%) y CH_2Cl_2 : MeOH (0 a 50%). Para el extracto de MeOH se usó el mismo procedimiento.

U. antarctica: Para el extracto de CH_2Cl_2 , se empleó la misma metodología descrita anteriormente en *R. terebrata*. Por otro lado el extracto metanólico, también fue purificado a través de cromatografía de exclusión molecular, con el mismo fin que el caso anterior, pero debido a la gran cantidad de compuestos polares que presentaba, fue trabajado a través de cromatografía de fase reversa, con una fase móvil de MeOH: H_2O (0 a 100%)

con el fin de general un fraccionamiento de los respectivos metabolitos presentes en el extracto. Para finalizar el proceso las fracciones obtenidas fueron trabajadas en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) semi-preparativo de fase reversa, empleando una gradiente de MeOH: H₂O (0 a 100%).

2.2.1.4. Caracterización y elucidación estructural de los compuestos aislados

En primera instancia, se utilizó cromatografía de capa fina (CCF) para hacer el seguimiento y evaluar el grado de pureza de los metabolitos. Corroborado esto, la elucidación estructural de todos los compuestos fue mediante estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), principalmente mono-dimensional (RMN-¹H), además de cromatografía líquida de ultra alta presión acoplada espectrometría de masa de alta resolución junto con un detector de arreglo de diodos y en modo negativo (UHPLC-PDA-Q/Orbitrap/MS/MS).

2.2.2. Ensayos antioxidantes

2.2.2.1. Determinación cuantitativa del poder captador del radical libre DPPH de extractos y compuestos puros aislados

Ensayo que se caracteriza por medir las propiedades antioxidantes de los compuestos en base a la capacidad de eliminar el anión 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), mediante la transferencia de un átomo de hidrógeno desde los grupos hidroxilos de las moléculas estudiadas. El DPPH es uno de los pocos radicales nitrogenados estable, debido a la deslocalización de un electrón libre, en solución genera un tono violeta oscuro, que se caracteriza por una banda de absorción centrada aproximadamente en el rango de los 515 nm, pero cuando se mezcla con una solución protica, la forma reducida presenta un tono amarillo pálido[109]. Este hecho hace que el ensayo sea un método válido, reproducible y fácil de evaluar (*Esta variación colorimétrica hace que el ensayo sea un método válido, reproducible y comparable con otros test*)

La cuantificación del poder captador del radical libre se evaluó mediante la determinación de la concentración efectiva (IC_{50}), definiéndose como la concentración de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial del radical libre. Para ello se empleó (o se llevó a cabo) la metodología descrita por *Brad-William y col en 1995*[110], más modificaciones.

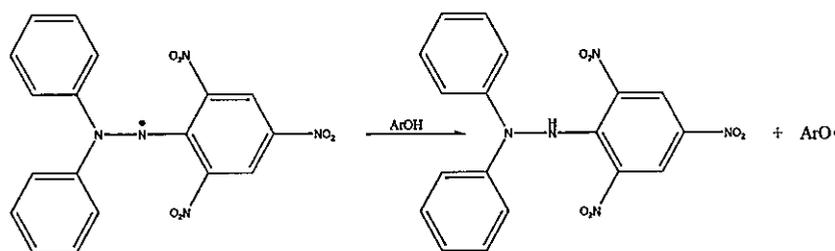


Figura 16: Reacción DPPH

Las muestras fueron preparadas a diversas concentraciones en un rango de 2-12 $\mu\text{g/ml}$, estas se mezclaron con 2 ml de DPPH a concentración 0.5mM Después de 30 min, se mide la absorbancia a 515nm. El porcentaje de la eliminación de radicales DPPH se calcula utilizando la ecuación como se indica a continuación:

$$\% \text{ actividad} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{control}} - \text{Absorbancia}_{\text{reacción}}}{\text{Absorbancia}_{\text{control}}} \cdot 100$$

2.2.2.2. Capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC fluoresceína (ORAC-FL)

El fundamento del método ORAC-FL se basa en la capacidad que tienen los compuestos antioxidantes frente a la presencia del radical peróxilo, en comparación al estándar Trolox, empleando una sonda fluorescente. El índice ORAC-FL fue determinado usando el protocolo de *Ou y col*[111], con algunas modificaciones. La reacción fue llevada a cabo en un tampón de fosfato (NaH_2PO_4) a 75mM a pH 7,4. En primer lugar, se agregaron 150 μL de fluoresceína 70nM (40nM de concentración en celda) más 25 μL del compuesto a

estudiar. La solución resultante fue preincubada en el lector de multiplatos Synergy HT BioTek por 15 minutos a 37°C en la respectivas celdas de la microplaca de 96 pocillos. Luego de esto se adicionaron alícuotas de AAPH (25 μ L a concentración de 18 mM). La microplaca fue colocada inmediatamente en el lector y agitada automáticamente antes de cada medición.

2.2.3. Producción de proteína Tau

2.2.3.1. Clonamiento de htau en vectores de expresión bacteriana

La secuencia htau40(2N4R) contenida en el vector pNG2/htau40 (donado por E. Mandelkow, Max Plank Institute, Alemania) fue cortado para luego ser subclonado en el vector de expresión bacteriana pET-28a, caracterizado por poseer una secuencia de polihistidina en el extremo amino terminal, lo que facilita su purificación.

2.2.3.2. Digestión Enzimática

Para la realización de la digestión enzimática se mezcló: 40 μ L del plásmido, 20 μ L de amortiguador 10X BamHI+, 4 μ L de NdeI (10 U/ μ L), 4 μ L de BamHI (10 U/ μ L) y 132 μ L de H₂O nanopura. Para la digestión del vector pET-28a(+) se agregaron 40 μ L de vector purificado, 20 μ L de amortiguador 10X BamHI+, 4 μ L de NdeI (10 U/ μ L), 4 μ L

de BamHI (10 U/ μ L), y agua nanopura para completar 200 μ L de volumen final. Las mezclas se incubaron a 37°C durante toda una noche. El producto de digestión de tamaño esperado se separó mediante geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, luego se purificó la banda correspondiente con un kit comercial (E.Z.N.A).

2.2.3.3. Reacción de Ligación

La ligación se llevó a cabo mediante la adición de: 4 μ L de vector digerido, con 6 μ L de inserto, más 2 μ L de amortiguador T4 DNA ligasa 10X, 1 μ L de T4 DNA ligasa (Fermentas) y agua nanopura para completar un volumen final de 20 μ L. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente por un lapso 3 hrs. Posteriormente, se realizó la transformación de las bacterias competentes con el producto de la ligación.

2.2.3.4. Generación de bacterias competentes:

La cepa bacteriana de *Escherichia coli* BL21(DE3) fue cultivada en placa Petri LB-agar. Transcurrido el periodo de crecimiento, se inoculó 5 ml de medio LB dejándolas crecer durante una noche a 37°C a 220 rpm. Al siguiente día se tomó 2,5 ml de este cultivo y se inoculó 250 ml de medio LB, a 37°C a 220 rpm, hasta obtener una densidad óptica (DO) entre los 0,4-0,6 a 600nm, para luego enfriar todo en hielo por 30 min. Cumplido el tiempo se centrifugaron las bacterias a 3000 rpm a 4°C por 15 min. Las bacterias se re suspendieron en 80 ml de amortiguador de células competentes (CC) frío y se incubaron

en hielo durante 30 min. Enseguida de esto, las bacterias se volvieron a centrifugar a 3.000 rpm a 4°C por 15 min y se re suspendieron en 20 mL de amortiguador CC, se alicuotaron en volúmenes de 400 µL en tubos *Eppendorf* y fueron congeladas para su uso posterior a -80°C.

2.2.3.5. Transformación de bacterias competentes:

Las células competentes se descongelaron en hielo y se mezclaron 400 µL de esta suspensión de bacterias con 10 µL de producto de ligación o 5 µL de plásmido (100 ng de DNA aprox.). Esta mezcla se dejó reposar 30 min en hielo y luego, se incubó por 45-60 seg a 42°C en un baño termorregulado y enseguida se dejó enfriar por 2 min en hielo. Se agregó 1 ml de medio LB y se dejó incubando a 37°C por 1 hora con agitación constante (220 rpm aprox.). A continuación, las bacterias se concentraron centrifugando a 4000 rpm por 5 min hasta un volumen de 100 µL aproximado y se sembraron en placas LB-agar que contenían kanamicina (30 µg/mL). Las placas LB-agar se incubaron a 37°C por 24 horas y se tomaron al menos tres colonias al azar para analizar la presencia del inserto de htau40 por el ensayo de restricción con las enzimas correspondientes, previa purificación del DNA plasmidial con el sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Las colonias que contenían el inserto fueron enviadas a secuenciar para comprobar la secuencia de las isoformas de tau. Los plásmidos con las secuencias correctas fueron almacenados a -20°C y los stocks de bacterias transformadas con el plásmido pET-28a(+) con las secuencias de htau fueron almacenadas en glicerol 20% (v/v) a -80°C.

2.2.3.6. Clonamiento de 4RMBD en vectores de expresión bacteriana

La secuencia codificante del fragmento de 4RMBD (htau244-372) fue amplificado mediante PCR a partir del vector que contiene el gen de htau40 como templado. Este fragmento de 4RMBD fue subclonado en el vector de expresión bacteriano pET-28a(+).

2.2.3.7. Amplificación del fragmento de 4RMBD por PCR

Para la amplificación de la secuencia codificante del fragmento de 4RMBD se diseñó la siguiente pareja de partidores:

Tabla 3: Partidores de la amplificación de 4RMBD

Nombre	Secuencia (5'-3')	Sitio de restricción
4R forward	GGAATCCATATGCAGACAGCCCCCGTGCCCATG	NdeI
4R reverse	CGCGGATCCTTATTCAATGTTTTATTTCCTCCGCCAG	BamHI

Protocolo de ampliación por PCR: 10 μ L de amortiguador 5X *phusion* HB, 2 μ L de templado, 1 μ L de primer 4R Forward (0,1 μ g/ μ L), 1 μ L primer 4R Reverse (0,1 μ g/ μ L), 0,4 μ L de dNTPs (25 mM), un 1 μ L de polimerasa *phusion* y 34,6 μ L de H₂O dd filtrada.

Programa de termociclación: Primera etapa de 30 seg a 98°C, una segunda etapa de 30 ciclos de 20 seg a 98°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C y una tercera etapa final de 10 min a 72°C. Se corroboró la presencia del producto de PCR, corriendo un gel de agarosa al 1%, con tinción posterior de bromuro de etidio. El producto de PCR obtenido fue purificado con un kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit).

2.2.3.8. Digestión Enzimática:

Para la realización de la digestión enzimática se mezcló: 25 µL de producto de PCR purificado, 5 µL de amortiguador 2 de restricción 10X, 0,5 µL de NdeI (20 U/µL), 0,5 µL de BamHI (20 U/µL), 0,5 µL de BSA 100X y 18,5 µL de H₂Odd filtrada. Para la digestión del vector pET-28a(+) se agregaron 4 µg de vector purificado, 5 µL de amortiguador 2 de restricción 10X, 1 µL de NdeI (20 U/uL), 1 µL de BamHI (20 U/uL), 0,5 µL de BSA 100X y 42,5 µL H₂Odd filtrada. Las mezclas se incubaron a 37°C por 4 hrs. El producto de digestión de tamaño esperado se separó mediante geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, luego se purificó la banda correspondiente con un kit comercial (E.Z.N.A.).

2.2.3.9. Reacción de Ligación:

Se realizó mezclando 150 ng del vector digerido con 26 ng de inserto, 1 μL de amortiguador T4 DNA ligasa, 0,5 μL de T4 DNA ligasa y 8,5 μL H_2O filtrada. Se incluyó un control negativo sin inserto en la reacción de ligación. La mezcla fue incubada a baño termorregulado a 16°C por 4 hrs.

2.2.3.10. Transformación de células competentes:

Se transformaron 50 μL de bacterias competentes XL1-Blue con 5 μL del producto de ligación y a su vez, con 5 μL del control negativo. Las bacterias se sembraron en placas LB-agar con kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las placas LB-agar se incubaron a 37°C por 24 hrs. Al día siguiente, se picaron entre seis y ocho colonias al azar para analizar la presencia del inserto de 4RMBD por ensayo de restricción con las enzimas correspondientes, previa purificación del DNA plasmidial con el sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit*. Las colonias que contenían el inserto fueron enviadas a secuenciar para comprobar la secuencia de 4RMBD. Los plásmidos con las secuencias correctas fueron almacenados a -20°C y stocks de bacterias transformadas con el plasmidio pET-28a(+)/4RMBD fueron almacenadas en glicerol 20% (v/v) a -80°C .

2.2.4. Purificación de 4RMBD desde cultivos de *E coli*

2.2.4.1. Producción de proteína:

A partir de un stock de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los plásmidos de expresión pET-28a(+)/4RMBD se inoculó un cultivo de 50 mL de medio LB con 150 μ L de kanamicina 10mg/mL, los cuales se dejaron crecer por una noche a 37°C con agitación constante (220 rpm). Al día siguiente se inoculó con 20 ml del cultivo, 1 L de medio LB con 20 μ L de kanamicina 10mg/mL, cultivándose a las mismas condiciones antes mencionadas, hasta el punto de alcanzar una DO a 600 nm entre los 0,5 y 0,6; al llegar a este punto, se indujo la expresión con 250 μ L de IPTG 1mM durante un lapso de 4 hrs, manteniendo las condiciones de cultivo. Las bacterias obtenidas se centrifugaron a 5000 rpm, a 4°C durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y el pellet generado de bacterias competentes fue congelado a -80°C hasta su posterior tratamiento.

2.2.4.2. Purificación proteica:

Protocolo: Se preparó una columna de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) con 3 ml de una resina de consta de un quelante tetradentado cargado con cobalto, que posee una notable afinidad y especificidad para las proteínas etiquetadas con histidina. Las respectivas fases móviles empleadas fueron:

- Buffer de unión: 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH= 7,4

- Buffer de lavado: 20 mM NaH₂PO₄, 30 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH= 7,4
- Buffer de elución: 20 mM NaH₂PO₄, 200 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH= 7,4

Los pellet obtenidos fueron trabajados con 5 mL de buffer de unión, más 50 µL de inhibidor de proteasa (PMFS), luego se procedió a la ruptura de la bacteria, para ello se usó un sonicador a 37°C durante 5 min a máxima potencia en un sonicador, luego se congeló a -80°C por 10 min, después se descongeló a 37°C por 5 min, para ser de nuevo sonificado a las mismas condiciones. El proceso de congelamiento y descongelamiento se aplica una vez más, para así centrifugar todo a 5000 rpm por 5 min. Una vez obtenido el sobrenadante, se mezcló con la resina de la columna y se incubó en agitación constante en frío durante 2 hrs. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 2000 rpm a 4°C durante 5 min. El sobrenadante generado se guardó a -20°C con el nombre de fracción 1, para su posterior análisis. La resina ya activada fue eluida con 150 ml de buffer de lavado a flujo de 1ml/min, para realizar de esta forma el lavado, el cual se dejó a 4°C durante 10 min en agitación constante, una vez transcurrido este periodo, la resina se incubó con buffer de elución por 20 min, para luego recolectar fracciones de 5ml de buffer con la proteína ya purificada.

2.2.4.3. Diálisis del fragmento 4RMBD

El producto de la purificación fue dializado por medio del kit Pur-A-L-lyzer mega 6000 dialysis y se empleó el siguiente protocolo: Se depositaron en los pocillos de diálisis las

eluciones proteicas obtenidas, para luego dejarse en una solución de Acetato de sodio 100 mM por alrededor de 18 horas y se mantuvieron en agitación constante por medio del agitador magnético.

La solución obtenida en la diálisis, se concentró en filtros clontech, concentrándose a 4.000 rpm por 10 min. El concentrado final fue guardado en tubos eppendorf con un volumen final de 500 μL y se congelaron hasta su uso a -80°C .

Finalmente, se midió la concentración final mediante el coeficiente de extinción molar a 280 nm.

$$A = l \cdot \epsilon \cdot C$$

En donde A es la absorbancia de la muestra, ϵ es el coeficiente de extinción molar que en este caso es de $1520 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y C es la concentración. El resultado se expresa como $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.2.4.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE se realizó según lo descrito por *Laemmli en 1970*[112]. Se formaron geles acrilamida / bisacrilamida con una concentración del 15%, las muestras fueron tratadas con SDS y llevados a 90°C por 5 min al baño termostático YSW-01, donde finalmente son cargadas 20 μL de la muestra dentro de los pocillos del gel concentrador. Cada gel se sometió a un voltaje constante de 130 volts hasta la caída del frente de corrida. Luego de la corrida, los geles fueron teñidos por 1 hora en una solución de tinción con azul de comassie y finalmente se destiñó en

solución de destinción en incubadora shaker zhwy100b a 23°C con una agitación constante de 120 rpm aproximadamente toda la noche. Posteriormente son lavados y visualizados.

2.2.5. Estudio de la agregación para el fragmento 4RMBD

La evaluación de la actividad anti-agregante se llevó a cabo mediante el ensayo de la fluoresceína ThT, reportado por *Pickhardt et al*[91], con algunas modificaciones. El ensayo se inicia con la inducción para la formación de estructuras filamentosas del fragmento 4RMBD en microplacas de 96 pocillos. Para ello se mezcló: 49,5 µL de la proteína a una concentración de 40 µM, 45.9 µL de heparina 5 µM en acetato a 100 mM a pH 7,0, más 1 µL del compuesto a estudiar solubilizado en DMSO a distintas concentraciones. La mezcla de todos estos reactivos dio una concentración final 20 µM por pocillo. Luego de esto, la placa se sella para incubarla a 37°C durante 20 hrs. Transcurrido este tiempo se adicionó 100 µL de una solución de ThT 25 mM y se continuó la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la lectura de fluorescencia. A continuación, se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro Biotek H1 (Biotek Instruments, EE.UU.) con una longitud de onda de excitación a 440 nm y emisión de 485 nm. Cada experimento se repitió al menos tres veces y la fluorescencia de fondo se sustrajo cuando sea necesario.

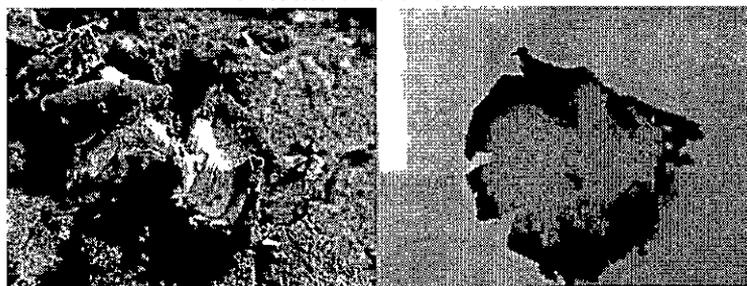
3. RESULTADOS

3.1.Recolección de las muestras

Las muestras en estudio fueron colectadas desde la zona de origen bajo la autorización y permisos correspondientes. Los datos de colecta para cada especie se detallan a continuación:

Tabla 4: Datos de colecta *U. antarctica*

Umbilicaria antarctica

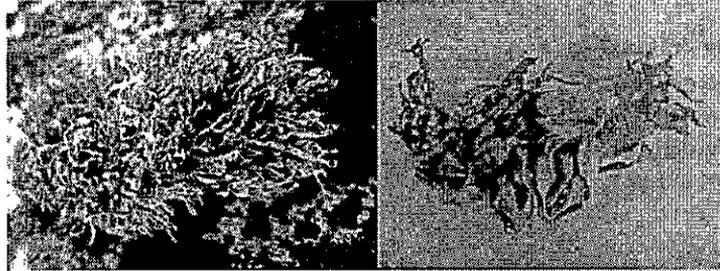


Colecta

Fecha	03/02/2015 al 18/02/2015
Lugar	Península Ardley (Z/AEP N°150)
Coordenadas geográficas	562° 12,572' W 58° 56,438'
Sustrato	Rocas
Vegetación asociada	Líquenes de otras especies
Colector	Francisco Salgado V.
Taxónomo	Reinaldo Vargas C.
Fotografías tomadas por Francisco Salgado V.	

Tabla 5: Datos de colecta *R. terebrata*

Ramalina terebrata



Colecta

Fecha	03/02/2015 al 18/02/2015
Lugar	Península Ardley, (ZAEP N°150)
Coordenadas geográficas	562° 12,572' W58° 56,438'
Sustrato	Rocas
Vegetación asociada	Líquenes de otras especies
Colector	Francisco Salgado V.
Taxónomo	Reinaldo Vargas C.
Fotografías tomadas por Francisco Salgado V.	

3.2. Fraccionamiento y purificación

3.2.1. *Umbilicaria antarctica*

La muestra seca de *U. antarctica* fue extraída con diclorometano y luego con metanol. Producto del concentrado total, para el extracto de diclorometano se obtuvo 10.3 g, equivalentes a un 6.87% de rendimiento, en relación al peso del líquen seco. Asimismo, para el extracto metanólico el resultado fue de un 13.8g, equivalente a un 9.20% de rendimiento, en relación al peso del líquen seco.

Tabla 6: Obtención de los extractos

<i>Umbilicaria antarctica</i>		
Relación entre peso de extracto obtenido a partir de 150 g de líquen seco		
Disolvente	Extracto (g)	Rendimiento (%)
CH ₂ Cl ₂	10.3	6.87
MeOH	13.8	9.20

Para el extracto de CH_2Cl_2 , el fraccionamiento se inició a través de cromatografía de exclusión molecular. Mediante placas cromatográficas de prueba, se seleccionaron las fracciones primarias para ser sometidas a procesos de separación y purificación por cromatografía de columna de sílice gel (63-200 μm). La separación cromatográfica del extracto de CH_2Cl_2 , condujo al aislamiento de 3 metabolitos (Figura 17), cuyas estructuras se determinaron a través del análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (RMN- H^1). Las constantes espectroscópicas para los valores de RMN- H^1 concuerdan con las descritas en la literatura.¹⁹

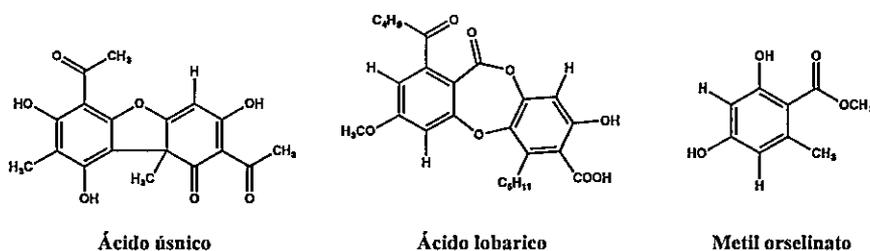


Figura 17: Metabolitos obtenidos del extracto de diclorometano de *U. antarctica*

El extracto metanólico, también fue sometido a Sephadex LH-20, para luego ser fraccionado a través de cromatografía de fase reversa. Al corroborar por cromatografía de capa fina (CCF) la presencia de metabolitos secundarios, estos fueron colectados de acuerdo a su patrón TLC, para luego ser purificados por HPLC semipreparativo. De esta purificación se logró aislar 5 metabolitos (Figura 18).

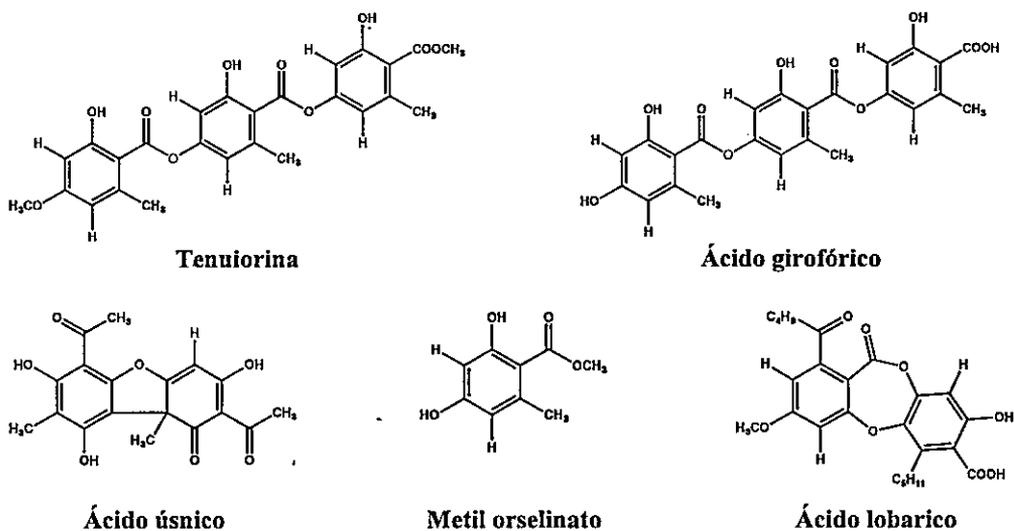


Figura 18: Metabolitos obtenidos del extracto metanólico de *U. antarctica*

3.2.1.1. Elucidación estructural de los compuestos aislados

La elucidación estructural de todos los compuestos fue mediante estudios de resonancia magnética nuclear, principalmente mono-dimensional (RMN- H^1). Las constantes espectroscópicas para los valores de RMN- H^1 concuerdan con las descritas en la literatura.¹⁹

Tenuiorina: A partir del extracto metanólico se obtuvo un sólido cristalino blanco, soluble en cloroformo (CHCl₃), acetona y DMSO. Fórmula molecular C₂₆H₂₄O₁₀ (496.45). RMN-H¹ (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm); 2.45 (3H, s, CH₃-8), 2.54 (3H, s, CH₃-8'), 2.58 (3H, s, CH₃-8''), 3.89 (3H, s, CH₃O-9), 3.95 (3H, s, CH₃O-9''), 6.19 (1H, s, H-4), 6.24 (1H, s, H-6), 6.28 (1H, s, H-6''), 6.29 (1H, s, H-4''), 6.68 (1H, s, H-4'), 6.56 (1H, s, H-6'), 10.0 (1H, s, OH-3''), 10.30 (1H, s, OH-3), 10.30 (1H, s, OH-5), 10.47 (1H, s, OH-3').

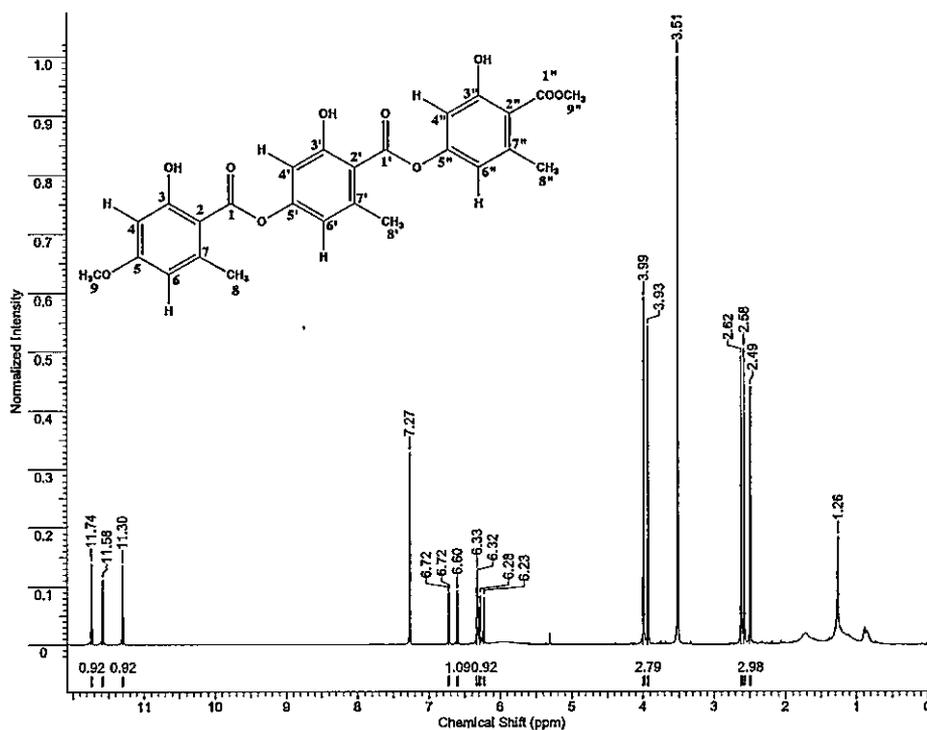


Figura 19: RMN-H¹ Tenuiorina

Ácido girofórico: A partir del extracto metanólico se obtuvo un sólido cristalino blanco, soluble en cloroformo (CHCl_3), acetona y DMSO. Fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ (468.40). RMN- H^1 (DMSO, 400 MHz) δ (ppm); 2.36 (3H, s, CH_3 -8), 2.36 (3H, s, CH_3 -8'), 2.38 (3H, s, CH_3 -8''), 6.23 (1H, s, H-4), 6.23 (1H, s, H-6), 6.60 (1H, s, H-6''), 6.62 (1H, s, H-4''), 6.67 (1H, s, H-4'), 6.67 (1H, s, H-6'), 10.0 (1H, s, OH-3''), 10.30 (1H, s, OH-3), 10.30 (1H, s, OH-5), 10.47 (1H, s, OH-3').

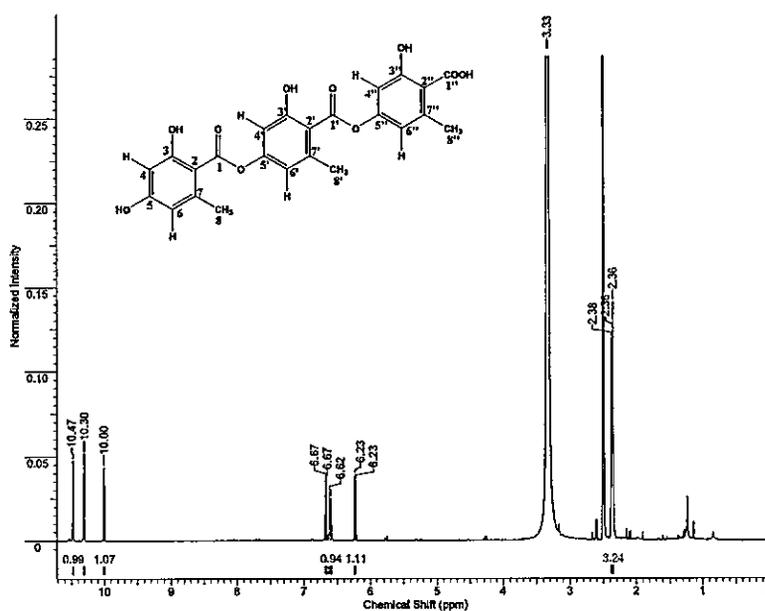


Figura 20: RMN- H^1 Acido girofórico

Ácido lobarico: Aislado de ambos extractos (CH_2Cl_2 y MeOH), este sólido de color blanco y de naturaleza cristalina, presenta solubilidad en CHCl_3 , acetona y DMSO. Su fórmula molecular fue $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{O}_8$ (456.47). RMN- H^1 (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm); 0.75 (3H, s, CH_3 -5''), 0.75 (3H, s, CH_3 -5'''), 1.41 (2H, m, CH_2 -4''), 1.41 (2H, m, CH_2 -4'''), 1.56 (2H, m, CH_2 -2'''), 1.73 (2H, m, CH_2 -3'''), 1.73 (2H, m, CH_2 -3'''), 2.83 (2H, t, CH_2 -2''), 3.15 (2H, t, CH_2 -1'''), 3.91 (3H, s, CH_3O -8), 6.75 (1H, d, H-3), 6.75 (1H, d, H-5), 6.78 (1H, s, H-3'), 11.07 (1H, s, OH-2').

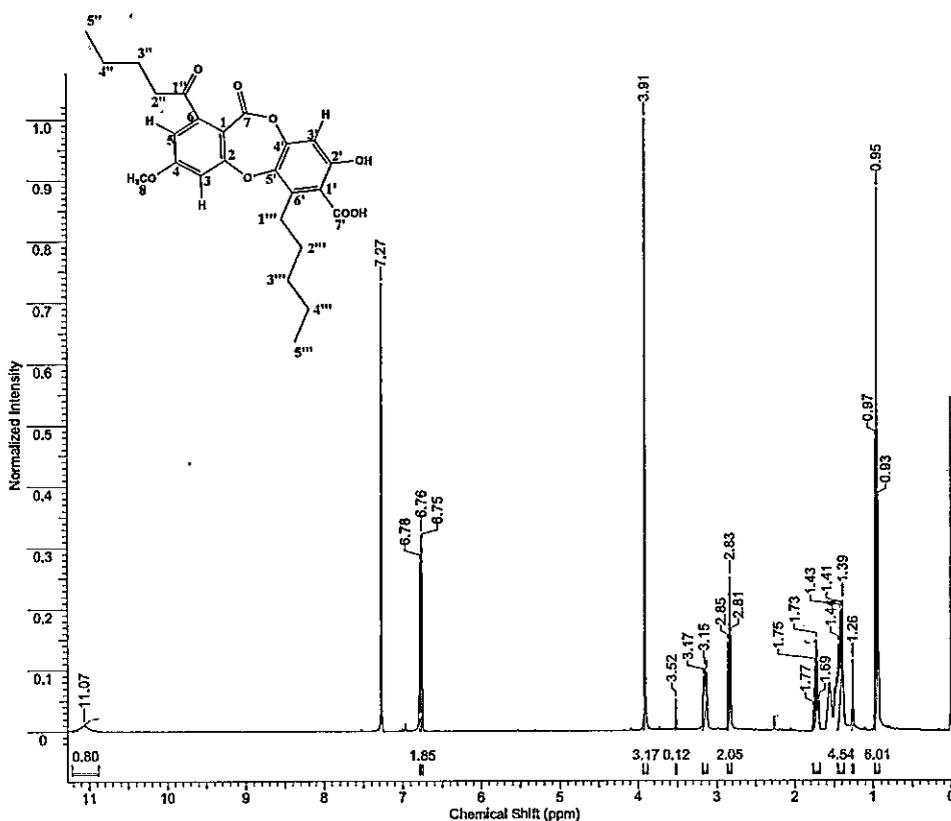


Figura 21: RMN- H^1 Ácido lobarico

Ácido úsnico: Aislado a partir de ambos extractos (CH_2Cl_2 y MeOH), se obtuvo un sólido cristalino de tonalidad amarilla, muy característico a esta clase de metabolitos. La muestra fue soluble en; CHCl_3 , acetona y DMSO. Su fórmula molecular fue $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ (343.31).
RMN- H^1 (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm); 1.76 (3H, s, CH_3 -13), 2.11 (3H, s, CH_3 -9), 2.66 (3H, s, CH_3 -15), 2.68 (3H, s, CH_3 -8), 5.98 (1H, s, H-4), 13.31 (1H, s, H-8).

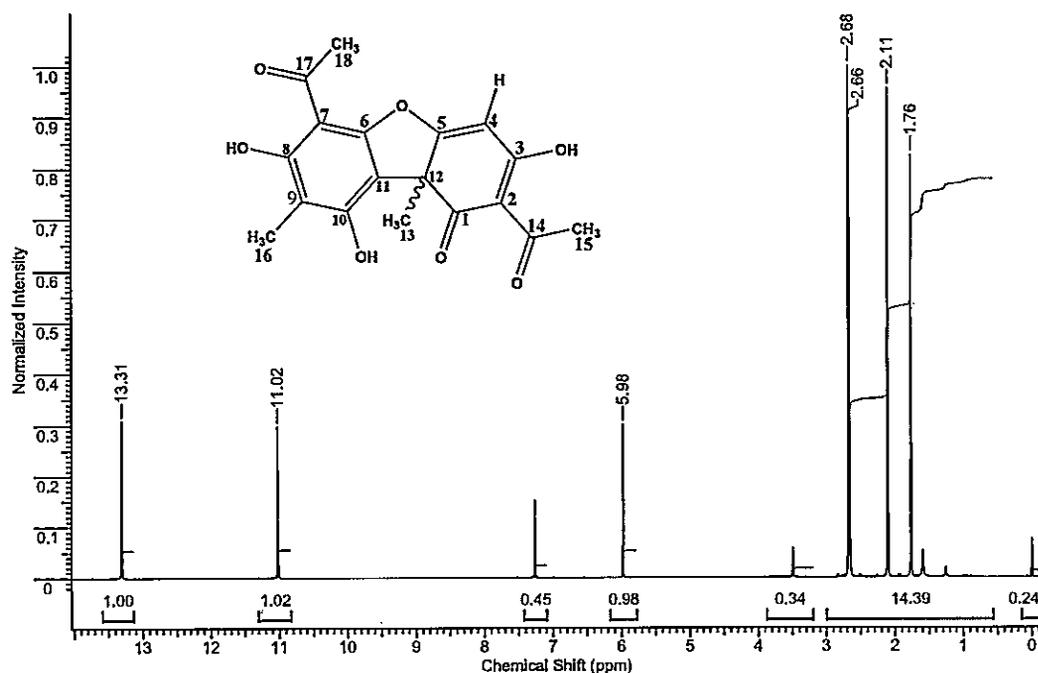


Figura 22: RMN- H^1 Acido úsnico

Metil orselinato: A partir de los extractos de CH_2Cl_2 y MeOH , se obtuvo un sólido amorfo de color blanco, que fue soluble solubilizado en CHCl_3 . Su formula molecular fue $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4$ (182.17). **RMN- H^1** (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm); 2.50 (3H, s, CH_3 -6), 3.93 (3H, s, CH_3O -7), 6.24 (1H, s, H-3), 6.28 (1H, s, H-5), 11.72 (1H, s, OH-2).

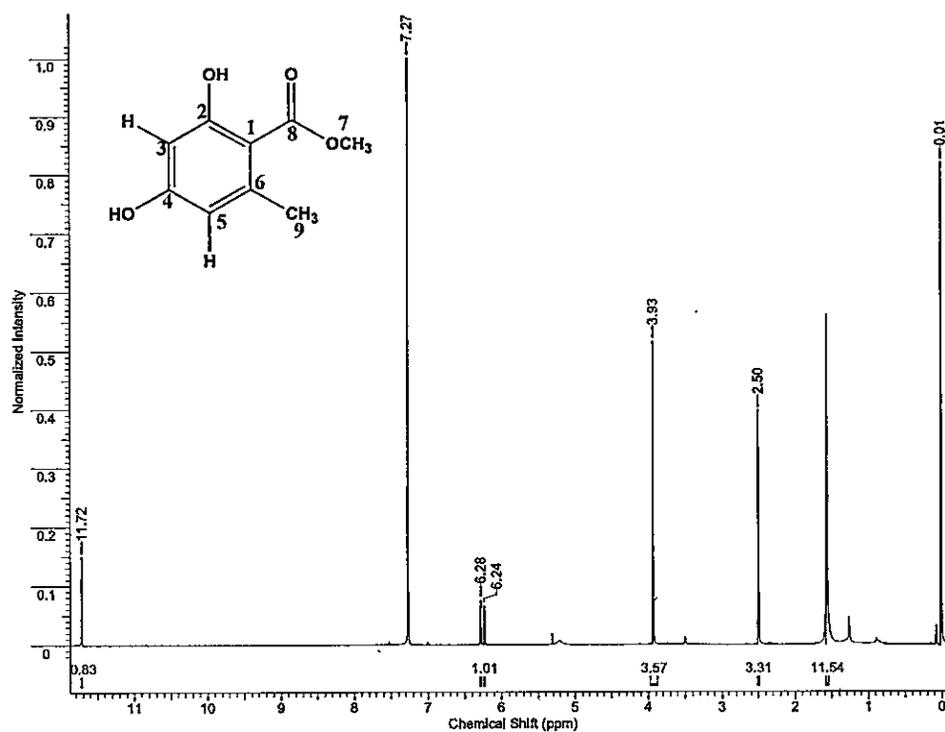


Figura 23: RMN- H^1 Atrarato de metilo

3.2.1.2. Identificación de los metabolitos por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS

El análisis por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS en modo negativo del extracto metanólico dio como resultado la identificación de 15 compuestos, descritos por primera vez en esta investigación (tabla 7). El **peak 1** fue identificado como el ácido orselínico (anión molecular a m/z 167.0337) cuya fragmentación produjo un anión a 123.0437. El **peak 2** fue tentativamente identificado como un derivado de la emodina, mostrando valores de absorbancia UV a λ_{\max} 250, 284 y 312 nm, los cuales son característicos de las antraquinonas. En este mismo ámbito, la molécula desprotonada ($[M-H]^-$) mostró un ion principal en m/z 295.0234 e iones secundarios a valores de m/z 267.0284, 239.0335 y 211.0385. Teniendo en cuenta que este compuesto, mostró una pérdida de 2CO mas las consideraciones de una biosíntesis, tentativamente el **peak 2** sería el "4,5-dihidroxi-9,10-dioxo-9,10-dihidroantraceno-2,7-dicarbaldéhidó" (Figura 24). El **peak 3** fue identificado como el ácido lecanórico, mostrando un valor de $[M-H]^-$ m/z 317.0657. Los valores de los iones secundarios respectivamente fueron $[M-H - C_8H_6O_3]^-$, $[M-H - C_8H_8O_4]^-$, y $[C_7H_7O_2]^-$ (167.0339, 149.0231 y 123.0439 a.m.u., respectivamente). El **peak 4** fue identificado como un derivado no hidroxilado del 7,7'-bis(2,5,6,8-tetrahidroxi-3-ethylnafta-2,6-quinona). El **peak 5** con un ion $[M-H]^-$ a m/z 497.0711 fue identificado como 7,7'-bis(2,5,6,8-tetrahidroxi-3-ethylnafta-2,6-quinona) el ion principal genera importantes iones de diagnóstico MS a 347.0389 $[M-H - C_8H_6O_3]^-$ y 197.0077 $[M-H - C_{16}H_{12}O_6]^-$ confirman que se trata de una naftoquinona. El **peak 6** con un $[M-H]^-$ ion a m/z 483.0911 fue identificado como el ácido crustínico, y el **peak 7** como el ácido hiasico.

El **peak 8** fue tentativamente identificado como un nuevo derivado del ácido crustínico (m/z 495.0908) el cual produce un ion MS^2 a m/z 299.0546, 255.0648 y 195.0285, mostrando también valores de UV max a λ_{max} 252.289 nm. El **peak 9** fue identificado como un nuevo tridépsido, basado en la siguiente información: UV max a λ_{max} 219, 269 y 305 nm; anión molecular $[M-H]^-$ a m/z 453.0806 que está de acuerdo con dos unidades de ácido orsellínico vinculados a una unidad de ácido resorcilico. Los principales iones hijos MS de diagnóstico fueron: $[M-H - C_{16}H_{12}O_6]^-$, $[M-H - C_{15}H_{10}O_6]^-$ y $[M-H - C_{15}H_{12}O_7]^-$ (153.0179, 167.0336, y 149.0230 a.m.u., respectivamente). Finalmente, se propuso la estructura del **peak 9** como el ácido 3-((4-((2,4-dihidroxi-6 metilbenzoil) oxi)-2-hidroxi-6-metilbenzoil)oxi)-5 hidroxibenzoico (Figura 25) todo basado en consideraciones biosintéticas. El **peak 10** $[M-H]^-$ con unión pseudomolecular m/z a 467.0961, fue considerado como el ácido girofórico, el cual también fue aislado e identificado (Figura 25), adicionalmente este compuesto mostro iones hijos a valores de m/z 317.0647, 167.0336, 149.0230 y 123.0438. El **peak 11** fue identificado como un isómero del ácido girofórico (UV max a λ_{max} 253, 270 y 305nm), cuyo anión molecular estaba a m/z 467.0960. la fragmentación por parte de este ion genero iones a m/z 317.0647 $[M-H - C_8H_6O_3]^-$, 167.0336 $[M-H - C_{16}H_{12}O_6]^-$, 151.0387 $[M-H - C_{16}H_{12}O_7]^-$, y 123.0438 $[M-H - C_{17}H_{12}O_8]^-$, confirmando este tridépsido (Figura 25). El **peak 12** y **13** fueron tentativamente identificados como el ácido 2,2'-O-dimetildivaricatico y Skyrin, basados en los valores de la absorbancia UV y el ion $[M-H]^-$ a m/z 415.1744 y 537.0799 respectivamente. El **peak 14** fue identificado como el ácido lobarico (anión molecular a m/z 455.1712). La fragmentación del **peak 14** produjo iones a 411.1808 $[M-H - CO_2]^-$,

367.1909 [M-H - 2CO₂]⁻, 352.1675 [M-H - 2CO₂-CH₃]⁻, y 296.1049 [M-H - 2CO₂ - C₃H₁₁]⁻. El **peak 15** fue identificado como el ácido úsnico, el cual mostro un [M-H]⁻ peak a *m/z* 343.0803. sus principales iones secundarios de diagnóstico fueron [M-H-CH₃]⁻, [M-H-C₄H₃O₂]⁻ y [M-H-C₅H₃O₃]⁻ (328.0583, 259.0612 y 231.0663 u.m.a., respectivamente). Según nuestra búsqueda estructural basada en SciFinder, los compuestos identificados con el **peak: 2, 8, 9 y 11**, se reportan por primera vez en esta investigación. Para mayor detalle ver anexo.

Tabla 7: Identificación por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS de los metabolitos presentes en el extracto metanólico *U. antarctica*

peak	Estructura tentativa	[M-H] ⁻	Tiempo de retención (min)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	Exactitud (ppm)	MS ⁿ (δ ppm)
1	Acido orselínico	C ₉ H ₇ O ₄	11.33	167.0344	167.0337	4.2	123.0437
2	Derivado de la emodina	C ₁₆ H ₇ O ₆	19.23	295.0243	295.0234	3.2	267.0284; 239.0335; 211.0385
3	Acido lecanórico	C ₂₂ H ₁₃ O ₆	19.45	317.0661	317.0657	1.3	167.0339; 149.0231 123.0439
4	7,7'-bis(2,5,6,8-tetrahidroxi-3-etilnaphtha-2,6-quinona)	C ₃₁ H ₁₇ O ₁₁	19.59	481.0771	481.0761	2.1	181.0132; 149.0229
5	7,7'-bis(2,5,6,8-tetrahidroxi-3-etilnaphtha-2,6-quinona)	C ₂₄ H ₁₇ O ₁₂	19.89	497.0720	497.0711	1.8	347.0396; 197.0092
6	Acido crustínico	C ₂₄ H ₁₉ O ₁₁	20.03	483.0927	483.0911	5.0	333.599; 317.0651; 187.0285; 139.0386
7	Acido hiasico	C ₂₄ H ₁₉ O ₁₁	20.49	483.0933	483.0909	4.9	317.0652; 167.0338; 123.0441
8	Derivado del Acido crustínico (nueva depsidona)	C ₂₅ H ₁₉ O ₁₁	20.76	495.0933	495.0908	5.0	299.0546; 255.0648; 195.0285
9	3-((4-(2,4-dihidroxi-6-metilbenzoi)oxi)-2-hidroxi-6-metilbenzoi)oxi)-5-hidroxi benzoico	C ₂₃ H ₁₇ O ₁₀	21.07	453.0827	453.0806	4.6	167.0336; 153.0179; 149.0230
10	Acido girofórico	C ₂₄ H ₁₉ O ₁₀	21.33	467.0978	467.0961	3.4	317.0647; 167.0336 149.0230; 123.0438
11	Isomero del ácido girofórico	C ₂₄ H ₁₉ O ₁₀	21.52	467.0978	467.0961	3.4	317.0647; 167.0336 151.0387; 123.0438
12	Acido 2,2'-O-dimetil divaricatico	C ₂₃ H ₁₇ O ₇	22.54	415.1762	415.1744	3.1	-
13	Skyrin	C ₁₀ H ₁₇ O ₁₀	23.38	537.0822	537.0799	4.8	-
14	Acido lobarico	C ₂₅ H ₁₇ O ₅	24.83	455.1711	455.1712	-0.2	411.1808; 367.1909; 352.1675; 296.1049
15	Acido úsnico	C ₁₈ H ₁₅ O ₇	26.16	343.0818	343.0803	4.3	328.0583; 259.0612; 231.0663

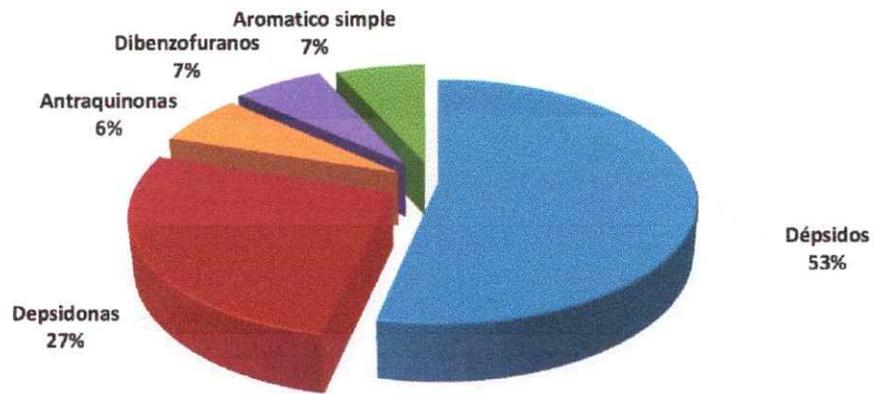
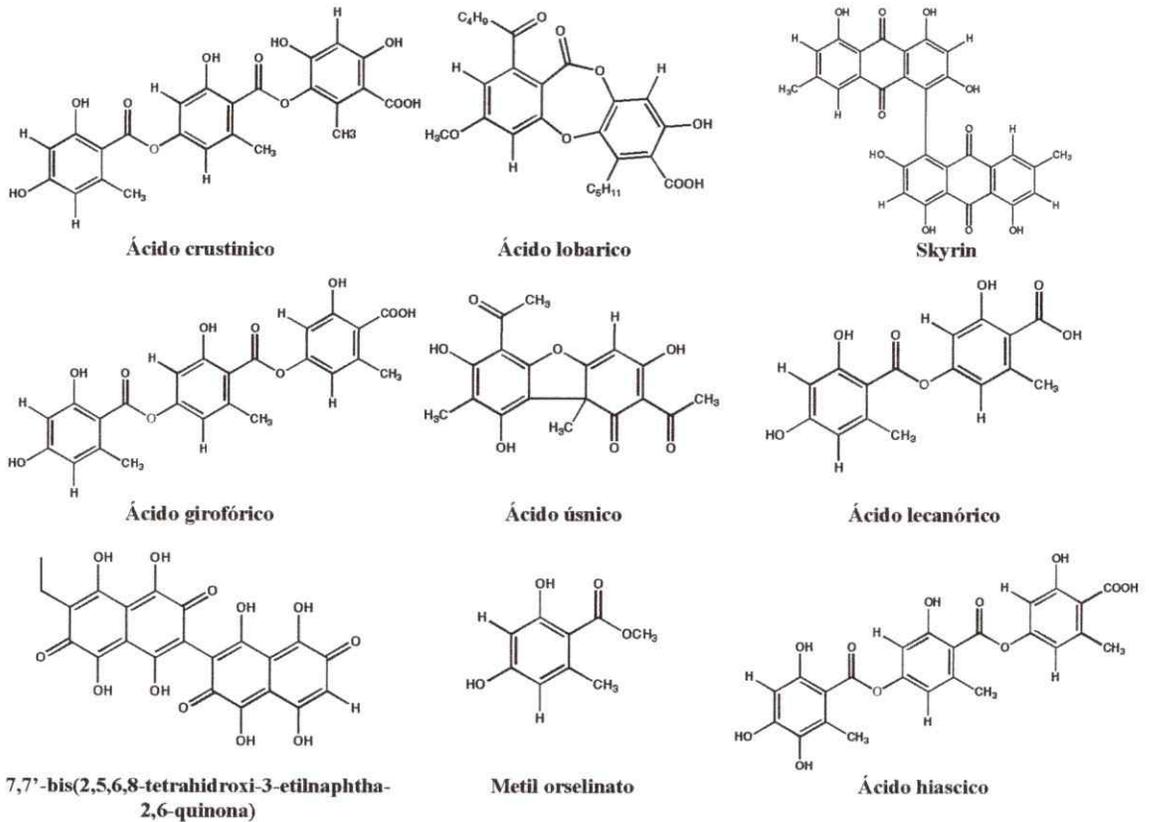
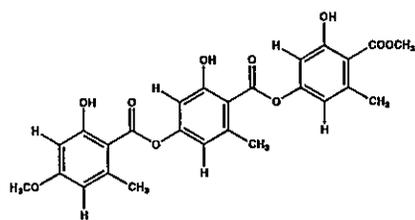
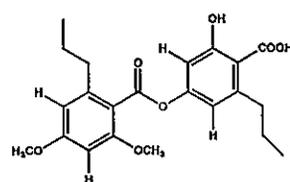


Figura 24: Proporción de los metabolitos identificados para el extracto metanólico de *U. antarctica*



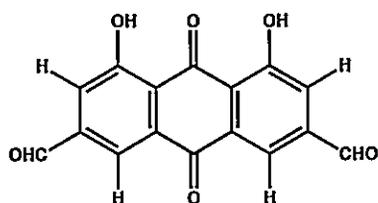


Tenuiorina

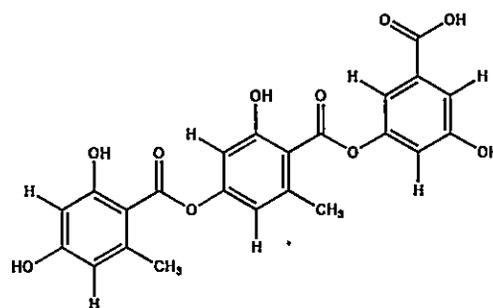


Ácido 2,2'-O-dimetil divaricático

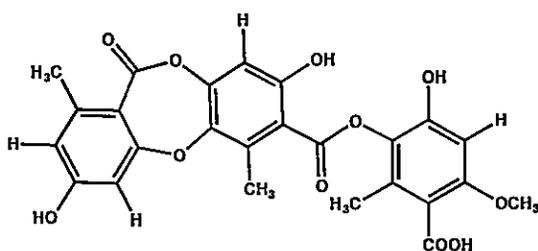
Figura 25: Metabolitos secundarios identificados del extracto metanólico U. antarctica



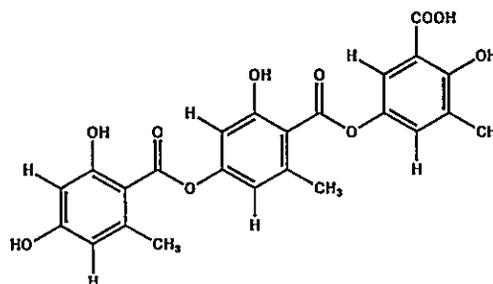
Peak 2, Derivado de la emodina



Peak 9, 3-((4-((2,4-dihidroxi-6 z-metilbenzoi)oxi)-2-hidroxi-6-metilbenzoi)oxi)-5-hidroxi-benzoico



Peak 8, Derivado del ácido crustinico



Peak 11, Isomero del ácido giroforico

Figura 26: Nuevos compuestos identificados por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS

3.2.2. Ramalina terebrata

Al igual que en la sección anterior, *R. terebrata* fue extraída en primera instancia con diclorometano y luego metanol. Los respectivos extractos finales dieron un peso de 12.7 g con un rendimiento del 8.46% para CH₂Cl₂ y de 15.6 g con un rendimiento de 10.4% para MeOH, todo en relación al peso del liquen seco (tabla 8).

Tabla 8: Obtención de los extractos para *R. terebrata*

<i>Ramalina terebrata</i>		
Relación entre peso de extracto obtenido a partir de 150 g de liquen seco		
Disolvente	Extracto (g)	Rendimiento (%)
CH ₂ Cl ₂	12.7	8.46
MeOH	15.6	10.7

Tanto para el fraccionamiento del extracto de diclorometano como el metanólico, se realizó la misma metodología empleada anteriormente, es decir, para ambos extractos el fraccionamiento se inició con Sephadex LH-20, para finalizar con una cromatografía de columna de sílice gel (63-200 μm), a distintas mezclas de fase móvil.

Del extracto de CH₂Cl₂ se logró aislar 4 compuestos, mientras que para el extracto metanólico se aislaron los mismos 4 del extracto anterior más otros dos. A través de los datos de RMN-H¹ se logró elucidar las 6 estructuras moleculares (Figura 23), las que fueron corroboradas con los datos descritos en la literatura.

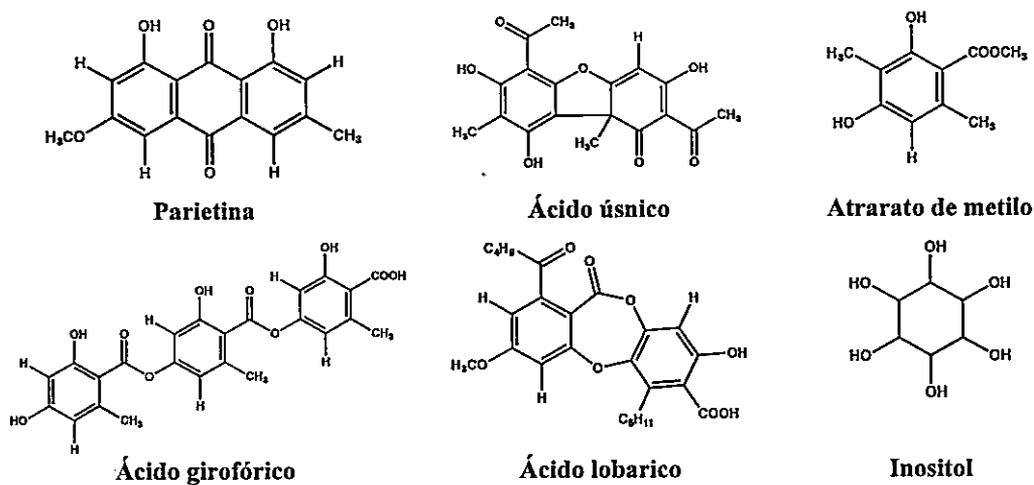


Figura 27: Metabolitos aislados de *R. terebrata*

3.2.2.1. Elucidación estructural de los compuestos aislados

La elucidación estructural de todos los compuestos fue mediante estudios de resonancia magnética nuclear, principalmente mono-dimensional (RMN-H^1). Las constantes espectroscópicas para los valores de RMN-H^1 concuerdan con las descritas en la literatura[20].

Parietina: A partir de ambos extractos, se obtuvo este sólido cristalino de color anaranjado. Soluble en cloroformo (CHCl_3), y DMSO. Su fórmula molecular fue de $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$ (284.26). RMN- H^1 (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 2.45 (3H, s, CH_3 -3), 3.94 (3H, s, CH_3 O-6), 6.68 (1H, d, H-2), 7.26 (1H, d, H-4), 7.62 (1H, d, H-5), 12.1 (1H, s, OH-1), 12.3 (1H, s, OH-5).

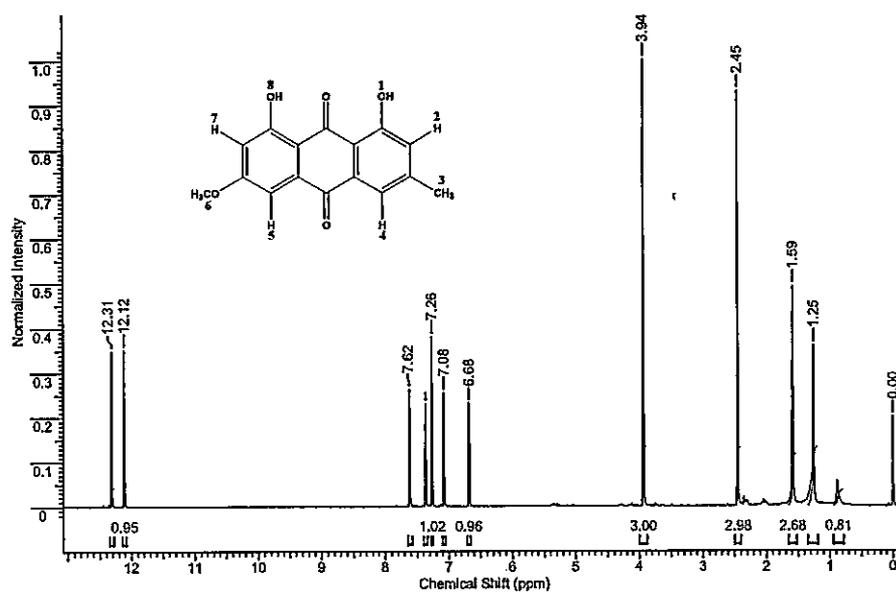


Figura 28: RMN- H^1 Parietina

Atrarato de metilo: A partir de ambos extractos, se obtuvo este sólido cristalino de color blanco Soluble en cloroformo (CHCl_3), y DMSO. Su fórmula molecular fue de $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ (196.19). RMN- H^1 (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 2.11 (3H, s, CH_3 -6), 2.47 (3H, s, CH_3 -3), 3.93 (3H, s, CH_3O -6), 6.27 (1H, s, H-5), 12.03 (1H, s, OH-2).

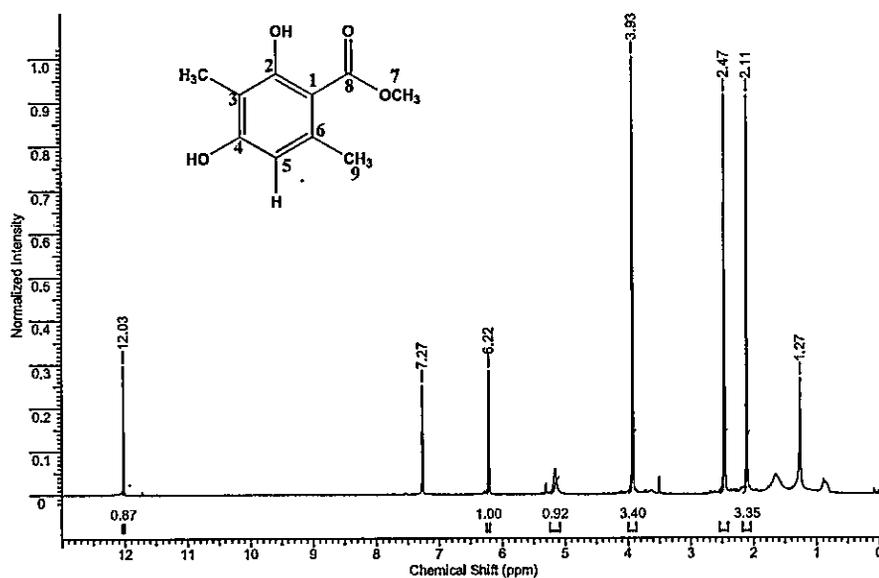


Figura 29: RMN- H^1 Atrarato de metilo

Inositol: A partir del extracto metanólico se obtuvo este sólido cristalino blanco, soluble en cloroformo (CHCl_3), acetona y DMSO. Fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_6$ (174.02). RMN- H^1 (DMSO, 400 MHz) δ (ppm): 3.37 (1H, s, OH), 3.54, (1H, s, OH), 3.57, (1H, s, OH), 3.66, (1H, s, OH), 3.78, (1H, s, OH), 3.91, (1H, s, OH).

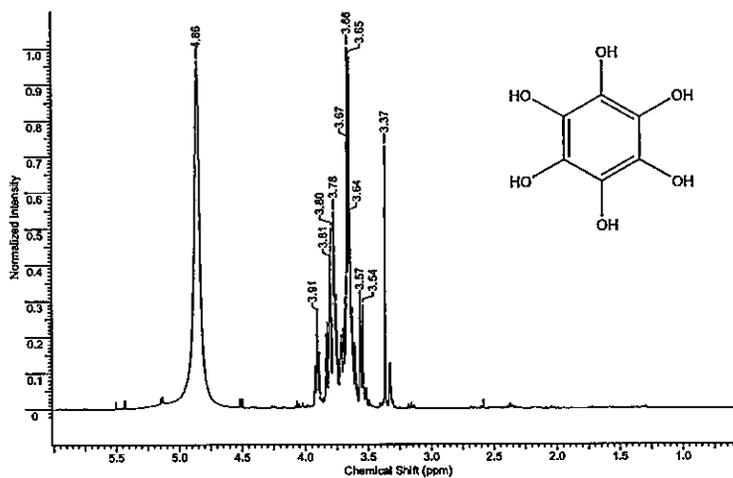


Figura 30: RMN- H^1 Inositol

Los espectros de ácido girofórico, ácido lobarico y ácido úsnico fueron descritos en la sección de *U. antarctica*.

3.2.2.2. Identificación de los metabolitos por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS

El análisis por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS en modo negativo del extracto metanólico dio como resultado la identificación de 22 compuestos, descritos por primera vez en esta investigación (tabla 9). 10 ácidos grasos del tipo tetrahidroxi (**peak 1, 2, 3, 5, 7, 9, 10, 11, 13, 14**), mas tres ácidos grasos pentahidroxi (**peak 4, 6 y 12**), fueron tentativamente identificados como ácidos polihidroxi grasos, según los datos reportados por *Huneck y Yoshimura*. El **peak 8** fue tentativamente identificado como ácido 4-O-dimetil baemycesico, (m/z 359.0756) el cual genera un ion MS^2 a m/z 302.0417. **Peak 15** con un valor de m/z 497.1065 fue identificado como el ácido 3-hidroxiumbilicarico, su ion secundario fue de 317.0652 $[M-H - C_9H_8O_4]^-$. **Peak 16** fue identificado como el ácido girofórico el cual también fue aislado e identificado (Figura 24). El **peak 17 y 19** $[M-H]^-$ tenían el mismo ion a m/z 375.170 con diferentes tiempos de retención base en el UHPLC a 22.04 y 23.65 min respectivamente. Estos compuestos fueron identificados como el ácido pladiolico o el ácido pseudopladiolico. El **peak 18** $[M-H]^-$ con un ion a m/z 527.2290 fue identificado como el ácido artoniaico. El **peak 20** fue identificado como el ácido lobarico (ion molecular a m/z 455.1712). El **peak 21** fue identificado como el ácido úsnico, el cual mostró un peak $[M-H]^-$ a m/z 343.0803. los principales iones fragmentados MS fueron $[M-H - CH_3]^-$, $[M-H - C_4H_3O_2]^-$, y $[M-H - C_5H_3O_3]^-$ (328.0583, 259.0612 y 231.0663 a.m.u., respectivamente). El **peak 22** fue identificado como la parietina (anión molecular a m/z 283.0601).

Tabla 9: Identificación por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS de los metabolitos presentes en el extracto metanólico de *R. terebrata*

peak	Estructura tentativa	[M-H] ⁻	Tiempo de retención (min)	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	Exactitud (ppm)	MS ⁿ (δ, ppm)
1	Ácido 9,10,12,13-tetrahidroxiheptadecanoico	C ₁₇ H ₃₃ O ₆	14.53	333.2283	333.2267	4.8	
2	Ácido 9,10,12,13-tetrahidroxi octadecanoico	C ₁₈ H ₃₅ O ₆	15.54	347.2439	347.2423	4.6	
3	Ácido 9,10,12,13-tetrahidroxi nonadecanoico	C ₁₉ H ₃₇ O ₆	17.45	361.2596	361.2577	5.2	343.2472
4	Ácido pentahidroxi docosanoico	C ₂₂ H ₄₃ O ₇	18.54	419.3014	419.2995	4.5	
5	Ácido 9,10,12,13-tetrahidroxi eicosanoico	C ₂₀ H ₃₉ O ₆	18.61	375.2752	375.2736	4.2	357.2628; 187.0962
6	9,10,11,12,13-pentahidroxi tricosanoico	C ₂₃ H ₄₅ O ₇	19.21	433.3165	433.3150	3.5	
7	Ácido 9,10,12,13-tetrahidroxi heneicosanoico	C ₂₁ H ₄₁ O ₆	19.29	389.2909	389.2890	4.8	371.2782
8	Ácido 4-O-dimetil baemycésico	C ₁₈ H ₃₅ O ₈	19.58	359.0767	359.0756	3.0	
9	Ácido 9,10,12,13-tetrahidroxi eicosanoico	C ₂₀ H ₃₉ O ₆	19.64	375.2747	375.2735	3.2	
10	Ácido 9,10,12,13-tetrahidroxi docosanoico	C ₂₂ H ₄₃ O ₆	19.80	403.3065	403.3047	4.4	385.2940; 215.1274
11	Ácido 9,10,12,13-pentahidroxi tricosanoico	C ₂₃ H ₄₅ O ₇	19.95	389.2909	389.2892	4.3	371.2782
12	Ácido 9,10,12,13-pentahidroxi tetracosanoico	C ₂₄ H ₄₇ O ₇	20.20	447.3327	447.3306	4.7	
13	Ácido 9,10,12,13-tetrahidroxi docosanoico	C ₂₂ H ₄₃ O ₆	20.37	403.3065	403.3043	5.4	385.2938; 187.0961
14	Ácido 9,10,12,13-tetrahidroxi tricosanoico	C ₂₃ H ₄₅ O ₆	20.79	417.3222	417.3198	5.7	399.3094
15	Ácido 3-hidroxi tumbilicarico	C ₂₅ H ₂₁ O ₁	21.25	497.1089	497.1065	4.8	317.0652; 167.0336
16	Ácido girofórico	C ₂₁ H ₃₉ O ₁	21.27	467.0978	467.0962	3.4	317.0647; 167.0336; 149.0230; 123.0438
17	Ácido placodiólico o Ácido pseudoplacodiólico	C ₁₉ H ₃₉ O ₈	22.04	375.1079	375.1070	2.4	343.0807; 259.0598; 231.0648
18	Ácido arthoniaco	C ₂₉ H ₃₆ O ₇	22.78	527.2281	527.2290	-1.7	-28
19	Ácido pseudoplacodiólico o Ácido placodiólico	C ₁₉ H ₃₉ O ₈	23.65	375.1079	375.1068	2.9	343.0805; 259.057; 231.0647
20	Ácido lobarico	C ₂₃ H ₃₇ O ₃	24.82	455.1711	455.1712	-0.2	411.1808; 367.1909; 352.1675; 296.1049
21	Ácido úsnico	C ₁₈ H ₃₅ O ₇	26.17	343.0818	343.0803	4.3	328.0583; 259.0612; 231.0663
22	Parietina	C ₁₈ H ₃₅ O ₅	27.21	283.0612	283.0601	3.9	-

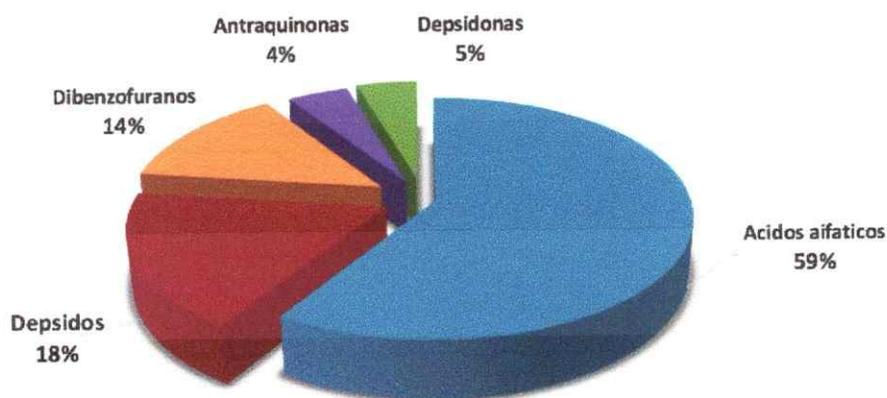
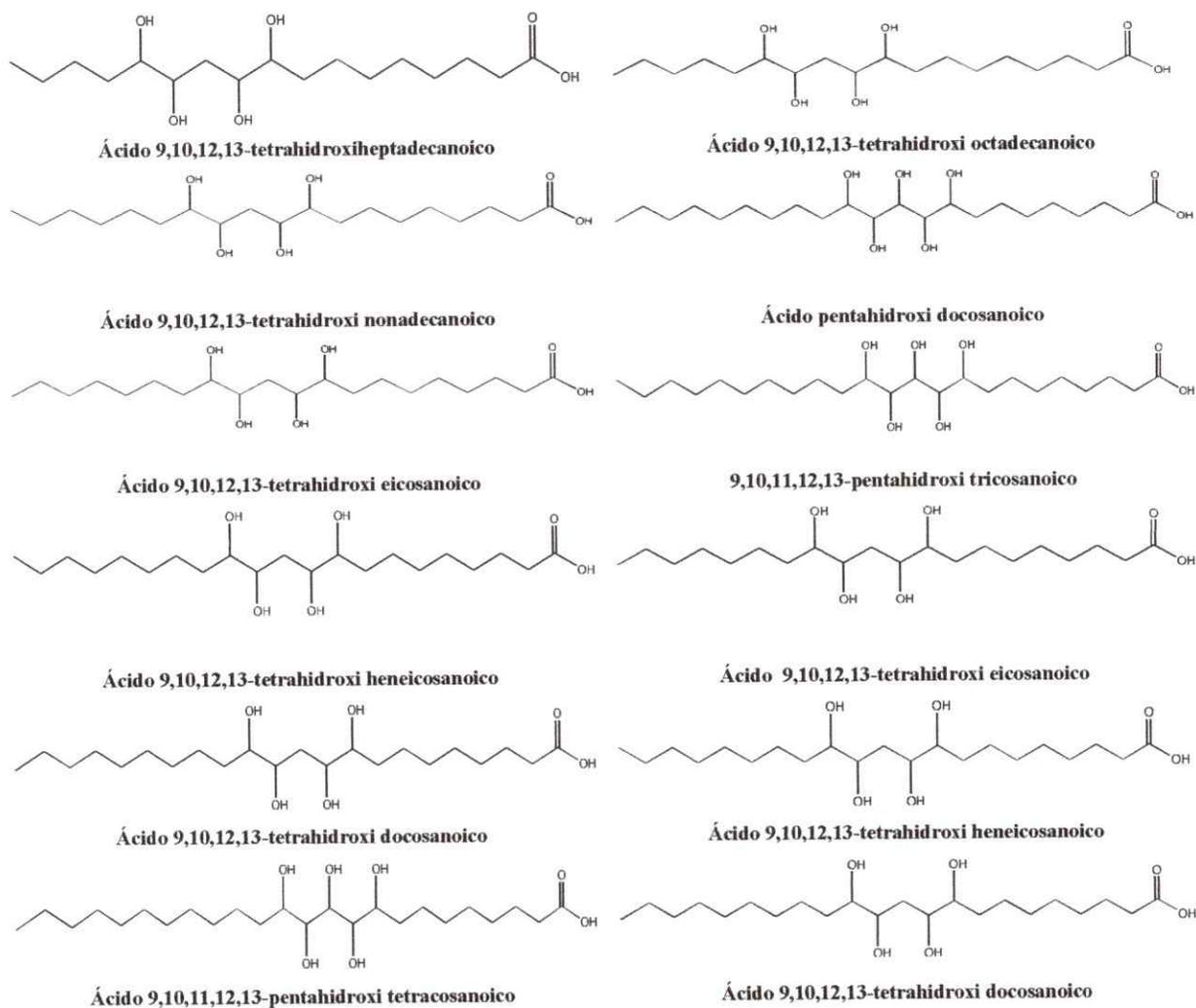
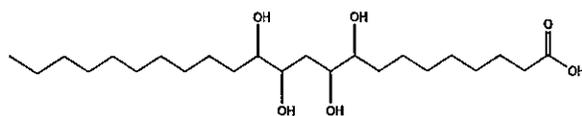
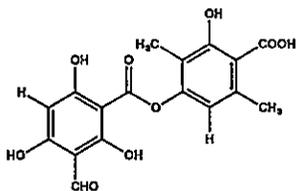


Figura 31: Proporción de los metabolitos identificados para el extracto metanólico de *R. terebrata*

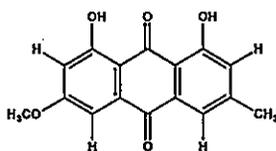




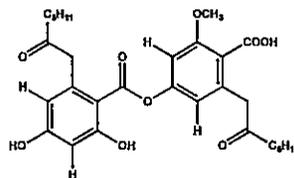
Ácido 9,10,12,13-tetrahidroxi tricosanoico



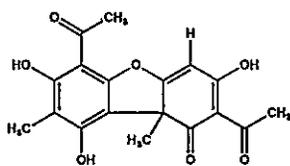
Ácido 4-O-dimetil
baemycesico



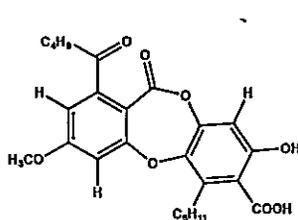
Parietina



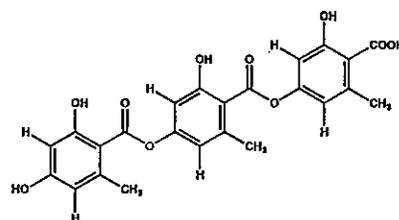
Ácido arthoniaico



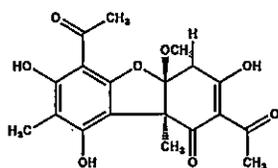
Ácido úsnico



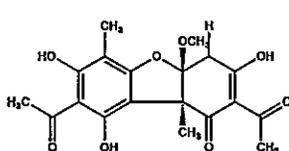
Ácido lobarico



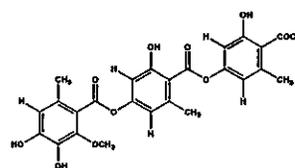
Ácido girofórico



Ácido pseudoplacodialico



Ácido placodialico



Ácido 3-hidroxi umbilicarico

Figura 32: Metabolitos secundarios identificados del extracto metanólico de *R. terebrata*

3.3. Ensayos antioxidantes

3.3.1. Determinación del poder captador del radical libre DPPH

El poder captador del radical libre DPPH fue medido siguiendo el protocolo de *Brad-William et al., 1995*[110], con algunas modificaciones. La cuantificación del poder captador del radical libre para todas las muestras se evaluó mediante la determinación de la concentración efectiva (IC_{50}), definiéndose como la concentración de antioxidante necesaria para reducir en un 50% la concentración inicial del radical libre. Para ello, se efectuó el análisis de la regresión lineal de la curva dosis respuesta entre el porcentaje la actividad eliminación vs la concentración de las muestras [$\mu\text{g/ml}$]. Para garantizar la reproducibilidad del experimento todos los ensayos se realizaron por triplicado de muestras. Los resultados del ensayo para el extracto de *U. antarctica* y *R. terebrata* se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 10: Actividades DPPH extractos y metabolitos

Metabolito	DPPH IC_{50} (μM)
Acido girofórico	337
Tenuiorina	342
Acido lobarico	421
Parietina	517
Acido úsnico	639
Metil orselinato	704
Acido gálico	7,99
Ext. <i>U. antarctica</i>	79.37 ($\mu\text{g/ml}$)
Ext. <i>R. terebrata</i>	224.61 ($\mu\text{g/ml}$)

3.3.2. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC-FI)

El fundamento de la metodología ORAC-FI se basa en la habilidad que tienen los compuestos con capacidad antioxidante para bloquear radicales libres por donación de un átomo de hidrógeno. Para comprobar esto, se evaluó la capacidad de apagamiento de los radicales peróxilo midiendo el decaimiento de la intensidad de la fluorescencia de la sonda producto de la oxidación.

Los perfiles cinéticos del consumo de la sonda fueron monitoreados en un determinado lapso de tiempo, a través de la excitación de las muestras a una longitud de onda (λ) de 485nm, más un filtro de emisión de λ 528nm. La efectividad del posible antioxidante se evaluó en base a las áreas bajo la curva de la intensidad de la fluorescencia neta versus el tiempo registrado. (Figura 28)

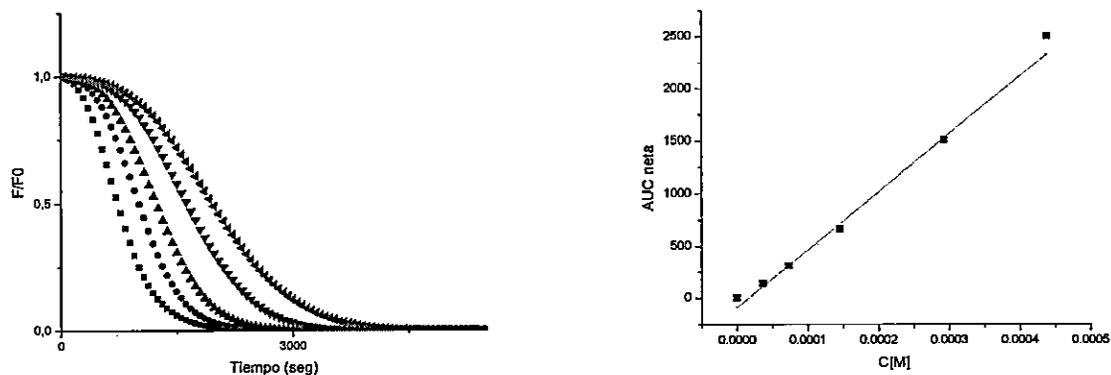


Figura 33: Decaimiento del consumo de FI por efectos del radical peróxilo, en presencia del compuesto a estudiar y relación del área bajo la curva del decaimiento versus concentración.

Las actividades tanto de los extractos como de los metabolitos aislados se evaluaron en base a la comparación del estándar Trolox, el cual es un derivado hidrosoluble de la vitamina E.

Para los extractos se determinó la actividad en base a los micromoles (μmol) de equivalentes de Trolox para 100 g de extracto seco. Mientras que para los metabolitos purificados del respectivo extracto se determinaron mediante la equivalencia de la molaridad (μM) de Trolox. A continuación se muestra una tabla resumen de las actividades evaluadas

Tabla 11: Actividades ORAC-FI extractos y metabolitos

Metabolito	μM de equivalente de Trolox
Ácido girofórico	66.43
Ácido lobarico	18.05
Tenuiorina	7,1
Inositol	0.0241
Extractos metanólicos	$\mu\text{mol eq de trolox en 100g ext. seco}$
Ext. <i>U. antarctica</i>	6.912,93
Ext. <i>R. terebrata</i>	12.742,05

3.4. Producción de proteína

3.4.1. Amplificación y clonamiento del fragmento 4RMBD

La secuencia de *hat40* fue amplificada con el fin de poder clonar el fragmento de *dominio de unión a microtúbulos de 4 repeticiones*, (más conocido como **fragmento 4RMBD**) en el respectivo vector de expresión pET-28a(+).

Para poder lograr esto, se diseñaron los partidores 4R forward y 4R reverse. Utilizando como templado el vector pET-28a/*htau40* y los partidores mencionados, se obtuvieron bandas cercanas a los 310 bp, lo que correspondería al esperado de la amplificación. Los productos de esta reacción fueron purificados, mezclados y digeridos con las respectivas enzimas de restricción BamHI y NdeI, los que fueron ligados en el vector pET-28a(+). El producto de ligación se denominó pET-28a/4RMBD (5723 bp), el cual al igual que el caso anterior también fue mandado a secuenciar para corroborar la presencia correcta del fragmento en estudio. Como resultado de ligación se obtuvo el vector pET-28a(+) con la secuencia del dominio 4RMBD.

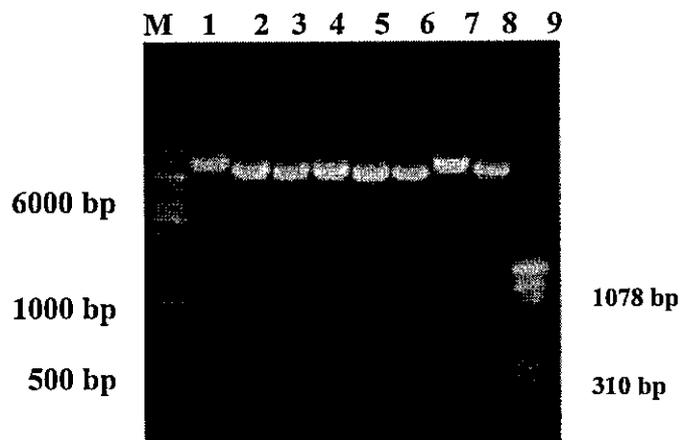


Figura 34: Análisis electroforético de la digestión del vector pET-28a/4RMBD (Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, donde M: ladder de peso molecular, 1: plásmido sin inserto, 2 al 8: vector digerido con enzimas y M: ladder peso molecular.)

3.4.2. Expresión y purificación de 4RMBD recombinante desde cultivos de *E. coli*

La inducción de la expresión proteica por el sistema *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+)/4RMBD, siguió las condiciones planteadas en la sección de materiales y métodos.

Para la optimización del fragmento en estudio se determinaron las siguientes condiciones:

Tabla 12: Variables inducción

Variables	Valores
Concentración inductor IPTG	: 1 mM
Tiempo de inducción	: De 3 a 4 hrs
DO a 600 nm	: Entre 0.5-0.6
Temperatura de reacción	: 37°C
Rpm	: 220

3.4.3. Purificación de la fracción

El resultado de la purificación del fragmento 4RMBD sobre expresado, se logró determinar gracias al análisis electroforético de las fracciones eluidas. De la Figura 34, se logró evidenciar una banda cercana a la zona de los 16 kDa. Este valor se ajusta al peso molecular real de 15.976 kDa del fragmento en estudio, predicho por la cadena compuesta por 150 aminoácidos de longitud.

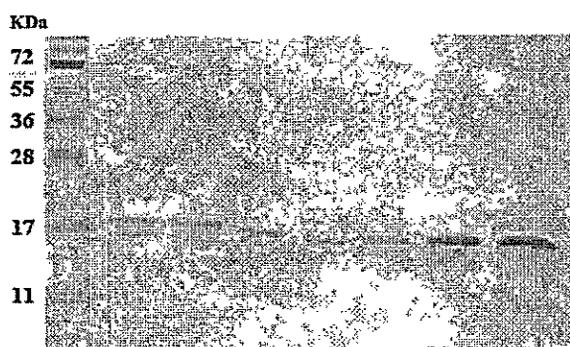


Figura 35: Electroforesis en gel de SDS-PAGE al 15% evidenciando la presencia del fragmento 4RMBD purificado

3.4.4. Estudio de la agregación del fragmento 4RMBD *in vitro*

La evaluación de la actividad anti-agregante se llevó a cabo mediante el ensayo de la fluoresceína ThT, reportado por *Pickhardt et al*[91], con algunas modificaciones. El ensayo se inicia con la inducción para la formación de estructuras filamentosas del fragmento 4RMBD en microplacas de 96 pocillos. Para ello se mezcló: 49,5 μ L de la proteína a una concentración de 40 μ M, 45,9 μ L de heparina 5 μ M en acetato a 100 mM a pH 7,0, más 1 μ L del compuesto a estudiar solubilizado en DMSO a distintas

concentraciones. La mezcla de todos estos reactivos dio una concentración final 20 μ M por pocillo. Luego de esto, la placa se sella para incubarla a 37°C durante 20 hrs. Transcurrido este tiempo se adicionó 100 μ L de una solución de ThT 25 mM y se continuó la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la lectura de fluorescencia. A continuación, se midió la fluorescencia en un espectrofluorímetro Biotek H1 con una longitud de onda de excitación a 440 nm y emisión de 485 nm. Cada experimento se repitió al menos tres veces y la fluorescencia de fondo se sustrajo cuando fue necesario.

Para el extracto MeOH de *R. terebrata*, el rango de concentración testeado fue desde los 100 μ g/ml hasta los 1000 μ g/ml, tal como se aprecia en la figura 35. El gráfico de barras negras corresponde al control constituido netamente por la proteína agregada en un 100% más las condiciones de cultivo (solventes, sales, buffer, inductor). Mientras que el gráfico de barras plomas demuestra el efecto que generó el extracto metanólico evitando casi en un 100% la agregación de tau. Con estos resultados se procedió al análisis de los metabolitos aislados de este extracto. De todos los metabolitos testeados solo la parietina (figura 36) demostró tener una tendencia en torno a los efectos de dosis/respuesta del efecto de la anti-agregación, por lo que no se consideraron en este estudio los resultados del inositol, del atrarato de metilo y de los ácidos úsnico, lobarico y girofórico.

Los resultados en torno a la inhibición de la agregación van desde el 5% hasta Aproximadamente el 75% para las concentraciones definidas.

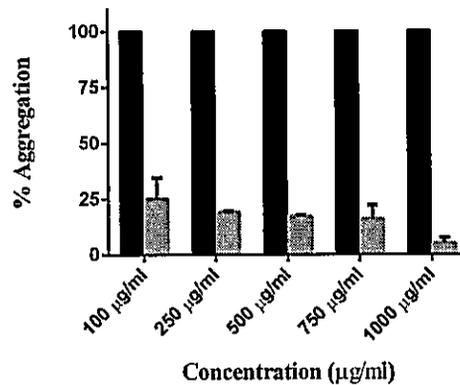


Figura 36: Actividad anti-agregante del extracto metanólico de *R. terebrata* en comparación al respectivo control

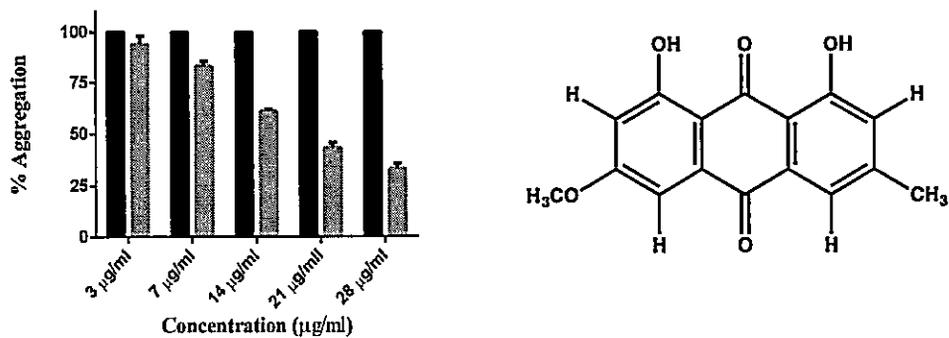


Figura 37: Actividad anti-agregante de Parietina en comparación al respectivo control

De igual forma, que el extracto anterior, *U. antarctica* fue analizado a un rango de concentración que varió desde los 100 µg/ml hasta los 1000 µg/ml., demostrando que sí posee una proporción inversa en base al aumento de concentración. El análisis de los metabolitos secundarios aislados arrojó solo la actividad moderada del tridésido Tenuiorina, testado a una concentración de los 5 µg/ml (10 µM) hasta los 50 µg/ml (100 µM).

En la figura 37 se muestra la curva de tendencia dosis/respuesta por parte del extracto metanólico de *U. antarctica*, mas la actividad anti-agregante de Tenuiorina (Figura 38).

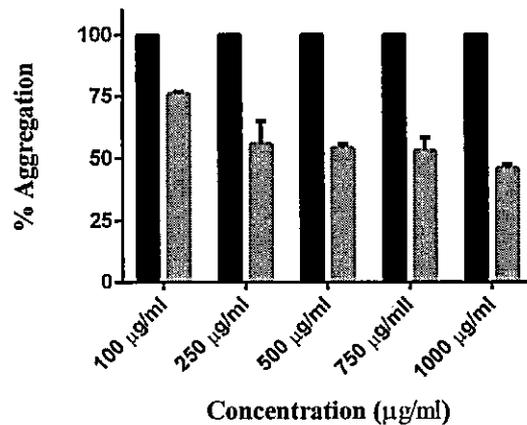
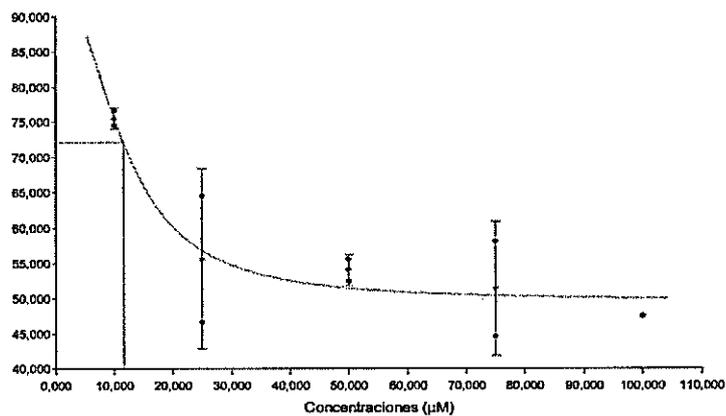


Figura 38: Actividad anti-agregante del extracto metanólico de *U. antarctica* en comparación al respectivo control

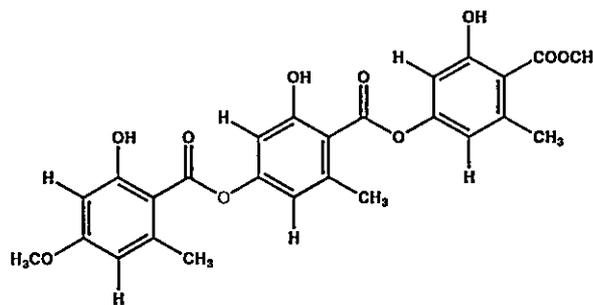
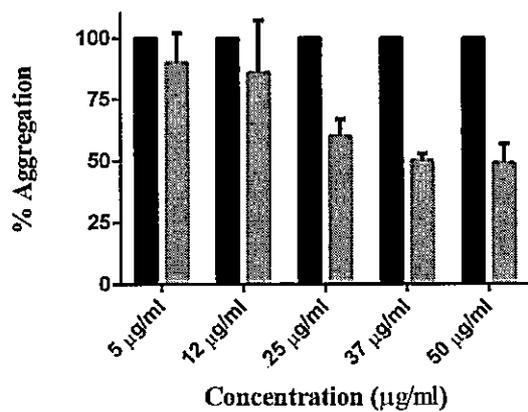


Figura 39: Actividad anti-agregante de la Tenuiorina en comparación al respectivo control

Para tener una mejor interpretación de estos resultados, se corroboró la actividad del compuesto comercial azul de metileno reportado por *Hattori y col 2008*. Cuyo IC_{50} equivale a $0,4-1\mu M$. [103]

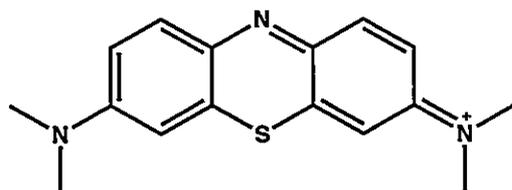


Figura 40: Azul de metileno

4. DISCUSIÓN

A través de los estudios con cromatografía líquida de ultra alta presión acoplada espectroscopia de masa de alta resolución junto con un detector de arreglo de diodos y en modo negativo (UHPLC-PDA-Q/Orbitrap/MS/MS), se logró por primera vez identificar 15 metabolitos para el extracto metanólico de *U. Antártica*, de los cuales el derivado de la emodina (peak 2); el derivado del ácido crustínico (peak 8); el ácido 3-((4-((2,4-dihidroxi-6-metilbenzoil)oxi)-2-hidroxi-6-metilbenzoil)oxi)-5-hidroxibenzoico (peak 9) y el isómero del ácido girofórico (peak 11) según nuestra búsqueda estructural basada en SciFinder, se reportan por primera vez en esta investigación. Además de esto, los resultados obtenidos indican que los metabolitos presentes que en el extracto metanólico son solo de 5 tipos de familias fenólicas. De ellos destacó la presencia de los dépsidos con un 53%, las depsidonas con un 27%, los dibenzofuranos y aromáticos simples con un 7% cada uno y las antraquinonas con un 6%. Este hecho corrobora lo expuesto en la sección 3.2.1.2 (Figura 23). En este mismo ámbito para el extracto metanólico de *R. terebrata*, también se reportó por primera vez la presencia de 22 metabolitos, los cuales se encontraban en proporciones totalmente distintas a las esperadas (como en el caso de *U. antártica*). El análisis arrojó que del total de los 22 compuestos identificados, el 53% son ácidos alifáticos, el 18% son dépsidos, el 14% dibenzofuranos, el 5% depsidonas y solo el 4% son antraquinonas (Figura 30).

Finalmente, en base a los resultados expuestos para ambas especies, se puede deducir que la cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masa es una metodología

excepcional, poderosa y rápida, para el análisis de los compuestos fenólicos en muestras biológicas.

Mediante el ensayo del ORAC-FI se evaluó la capacidad antioxidante de los 8 metabolitos aislados de ambas especies. Los resultados demostraron que solo el ácido girofórico, la tenuiorina, el ácido lobarico y el inositol tuvieron actividad. El resto de los metabolitos no pudieron ser testeados dado que presentaban solubilidades parciales en el buffer de fosfato. El compuesto que presentó mejores resultados fue el ácido girofórico > seguido del ácido lobarico > seguido de la tenuiorina y finalmente seguido del inositol. Sobre la base del mecanismo de inactivación de radicales libres la metodología ORAC mide la capacidad de un antioxidante para neutralizar o “apagar” los radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno. En base a esta información más lo expuesto en el marco teórico, nuestros resultados tienen mucha lógica debido a que por un lado el ácido girofórico es el dépsido que posee más grupos fenólicos (4 OH), de los cuales solo uno no se encuentra con ningún tipo de impedimento o esta interactuando con algún grupo funcional, como lo demuestra el resto de los metabolitos en los cuales todos sus grupos fenólicos están formando puentes de hidrogeno con los respectivos carbonilo del enlace éster. Este hecho fundamental podría ser la razón por la cual el resto de los metabolitos presentan una gran disminución entorno a sus actividades. Con valores que bordean el 80%. Para el caso de los extracto metanólicos, la especie *R. terebrata* mostró tener casi el doble de actividad que *U. antarctica*. si analizamos la composición de sus extractos (figura

23 y 30) se puede llegar a la deducción que en esta metodología los compuestos de carácter no fenólico estarían cumpliendo un rol primordial en la actividad.

Para poder abarcar el otro mecanismo implicado en la determinación de la capacidad antioxidante, se realizó la cuantificación del poder captador del radical libre DPPH, debido a la validación de sus resultados con antioxidantes estandarizados. Mediante la determinación de la concentración efectiva (IC₅₀) se comprobó la capacidad antioxidante de solo 6 de los 8 metabolitos aislados. El compuesto que tuvo mejores resultados fue el ácido girofórico > seguido de la tenuiorina > luego el ácido girofórico > seguido de la parietina > el ácido úsnico y finalmente el metil orselinato.

Por otro lado, el extracto metanólico de *U. antarctica* fue superior al extracto metanólico de *R. terebrata* y al resto de los metabolitos.

En primera instancia, hay que señalar que la expresión de la proteína tau (4RMBD) a partir de los cultivos de *E. coli*, fue una técnica favorable desde el punto de vista de la reproducción, y eficiencia con respecto a los rendimientos obtenidos en el aislamiento de este fragmento. Este hecho queda de manifiesto en el grado de pureza presentado por parte de la proteína en el análisis electroforético (Figura 34). Por otro lado, mediante el ensayo de la fluorescencia con tioflavina (ThT) *in vitro*, se siguió la cinética de formación de agregados de tau *in vitro*. Para ello se utilizó la metodología descrita por *Pickhardt y col*[91] más algunas modificaciones. Hay que señalar que el uso de heparina como inductor polianiónico de la agregación de tau es el método más empleado y validado para el estudio de compuestos con capacidades anti-agregantes. La formación de los agregados

en presencia de este inductor, se postula que generaría efectos electroestáticos, los que de alguna manera influyen en la estructura *random coil* de tau monomérico, induciendo su reestructuración en agregados ricos en sábana β . (Sin embargo, no se conoce con exactitud cómo se desarrolla este proceso *in vitro*).

En este trabajo, si se logró la inducción de la agregación de tau *in vitro* hecho que fue corroborado en los respectivos controles positivos de los ensayos realizados. Inicialmente fue testeado el extracto metanólico de *R. terebrata* a un rango de concentración que varió desde los 100 $\mu\text{g/ml}$ hasta los 1000 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados obtenidos señalan que a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ la actividad inhibitoria frente al proceso de agregación de la proteína tau era casi completa (Figura 35). En base a estos resultados se decidió evaluar los metabolitos aislados de este extracto. De ellos sólo la parietina logró inhibir la agregación a un rango de concentración desde 3 $\mu\text{g/ml}$ (10 μM) hasta los 28 $\mu\text{g/ml}$ (100 μM). A esta última concentración, los resultados muestran un 75% de inhibición frente a la agregación de la proteína. Además, se logran apreciar efectos de dosis respuesta por parte de este compuesto. De igual forma que *R. terebrata*, el extracto de *U. antarctica* fue trabajado a un rango de concentración que varió desde los 100 $\mu\text{g/ml}$ hasta los 1000 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados para este extracto demuestran que su concentración máxima logra inhibir un 52.5% de la agregación junto con una correlación positiva de dosis/respuesta. La evaluación de los metabolitos aislados arrojó solo la baja actividad de la Tenuiorina con una inhibición máxima de un 55% a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ equivalente a 100 μM .

Para ambas especies se logra deducir, por un lado que las actividades anti-agregantes están dadas por el conjunto de los metabolitos. Además, queda reflejada la importancia de los metabolitos minoritarios en las actividades, hecho que se ve reflejado la parietina que fue el compuesto con mejor actividad anti-agregante, a su vez fue el de menor proporción, presentando solo un 4% de la totalidad del en el extracto metanólico de *R. terebrata*.

5. CONCLUSIÓN

- El fraccionamiento realizado al extracto metanólico de *Umbillicaria antarctica* permitió aislar e identificar un total de 5 metabolitos: el **ácido girofórico**, el **ácido úsnico**, el **ácido lobarico**, el **metil orselinato** y la **tenuiorina**. En este mismo ámbito para el extracto metanólico de *R. terebrata* se lograron aislar 6 metabolitos: la **parietina**, el **atrarato de metilo**, el **inositol**, el **ácido girofórico**, el **ácido úsnico** y el **ácido lobarico** (Todos ellos individualmente ya están reportados).
- El análisis realizado al extracto metanólico de *U. antarctica* por UHPLC-Q/Orbitrap/ESI/MS/MS, permitió por primera vez la identificación de 15 metabolitos para esta especie. Además, de acuerdo a nuestra revisión bibliográfica, el derivado de la emodina, el derivado del ácido crustínico, el ácido 3-((4-((2,4-dihidroxi-6-methylbenzoil)oxi)-2-hidroxi-6-methylbenzoil)oxi)-5-hidroxibenzoico y el isómero del ácido girofórico, son nuevos por lo que por primera vez serían reportados en esta investigación. De igual forma, el estudio realizado al extracto metanólico de *Ramalina terebrata* también permitió identificar por primera vez la presencia de 22 metabolitos, los cuales individualmente ya están reportados.
- Para el ensayo ORAC-FI solo 4 de los 8 metabolitos aislados presentaron actividades. El compuesto que tuvo mejores resultados fue el **ácido girofórico** > seguido del **ácido lobarico** > seguido de la **tenuiorina** y finalmente seguido del

inositol. Por otro lado el extracto metanólico de *R. terebrata* fue superior al extracto metanólico de *U. antarctica*.

- Para el ensayo del DPPH solo 6 de 8 metabolitos presentaron actividades. El compuesto que tuvo mejores resultados fue el **ácido girofórico** > seguido de la **tenuiorina** > seguido del **ácido lobarico** > seguido de la **parietina** > seguido del **ácido úsnico** y finalmente seguido del **metil orselinato**. Por otro lado el extracto metanólico de *U. antarctica* fue superior al extracto metanólico de *R. terebrata*.
- En los dos ensayos antioxidantes empleados, quedó demostrado que los Dépsidos tienen mejor actividad antioxidante que las Depsidonas.
- Se logró expresar, purificar y cuantificar de forma exitosa el fragmento 4RMBD de la proteína tau, así como la inducción de la agregación esta mediante heparina.
- Del *screening* realizado a los metabolitos, solo la **parietina** y la **tenuiorina** lograron inhibir la agregación en base a la correlación positiva de dosis/respuesta. De ellas la parietina fue la que presentó los mejores resultados. Del mismo modo, el extracto metanólico de *R. terebrata* fue superior al extracto metanólico de *U. antarctica* (e inclusive a los dos metabolitos aislados).

- Se logró demostrar de que la actividad antioxidante no está relacionada en su totalidad a la actividad anti-agregante *in vitro*, sino que más bien ésta depende del efecto sinérgico de todos los constituyentes del extracto por muy minoritarios que sean.

PUBLICACIONES

Parte de esta investigación fue publicada en revistas indexada ISI.



International Journal of
Molecular Sciences



Article

Secondary Metabolites in *Ramalina terebrata* Detected by UHPLC/ESI/MS/MS and Identification of Parietin as Tau Protein Inhibitor

Alberto Cornejo ^{1,*}, Francisco Salgado ², Julio Caballero ³, Reinaldo Vargas ⁴, Mario Simirgiotis ⁵
and Carlos Areche ^{2,*}

- ¹ Facultad de Medicina, Escuela de Tecnología Médica, Universidad Andrés Bello, Sazié 2315, Primer Piso, Santiago 8370092, Chile
 - ² Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Ñuñoa, Santiago 8320000, Chile; fsalgado@ug.uchile.cl
 - ³ Centro de Bioinformática y Simulación Molecular, Facultad de Ingeniería, Universidad de Talca, 2 Norte 685, Casilla 721, Talca 3460000, Chile; jcaballero@utalca.cl
 - ⁴ Departamento de Biología, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Avda. José Pedro Alessandri 774, Ñuñoa, Santiago 8320000, Chile; reinaldo.vargas@umce.cl
 - ⁵ Laboratorio de Productos Naturales, Instituto de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia 5090000, Chile; mario.simirgiotis@gmail.com
- * Correspondence: alberto.cornejo@unab.cl (A.C.); areche@uchile.cl (C.A.);
Tel.: +56-2-2770-3610 (A.C.); +56-2-2978-7259 (C.A.)

Academic Editors: Ana María Gómez Caravaca and David Arraez-Roman
Received: 24 June 2016; Accepted: 1 August 2016; Published: 10 August 2016

- En referato



molecules



Article

Fast detection of lichen's substances from *Umbilicaria antarctica* by UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS and its tau protein aggregation inhibitory activity

Francisco Salgado¹, Mario Simirgiotis², Reinaldo Vargas³, Carlos Ramírez⁴, Claudio Cisternas¹,
Andreas L. Tapia⁵, Alberto Cornejo^{6,*}, Carlos Areche^{1,*}

- ¹ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile
- ² Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Antofagasta, Av. Coloso S-N, Antofagasta 1240000, Chile
- ³ Departamento de Biología, Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación, Avda. José Pedro Alessandri 774, Ñuñoa, Santiago, Chile
- ⁴ Facultad de Medicina, Escuela de Tecnología Médica, Universidad Andrés Bello, Avenida República 330, Primer Piso, Santiago, Chile
- ⁵ Laboratorio de Nanobiología y Nanotoxicología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile
- ⁶ Correspondence: areche@uchile.cl; Tel.: +56-2-29787259; alberto.cornejo@unab.cl; Tel.: +56-2-27703610

Academic Editor: name

Received: date; Accepted: date; Published: date

CONGRESOS

- 5th Brazilian Conference on Natural Products - BCNP" and "XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology – RESEM, **Octubre 2015**, Atibaia-SP/Brazil. “Secondary metabolites from *Umbilicaria antarctica*: Evaluation of their potential as tau protein inhibitions.”
- 32º Congreso latinoamericano de química, XXXI Jornadas Chilenas de química, **Febrero 2016**, Concepcion/Chile. “Secondary metabolites isolated from *Stereocaulon alpinum*: evaluation of their potential as tau protein inhibitor”
- V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales CIPNat 2016, el XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica y el VIII Congreso Colombiano de Cromatografía COCOCRO 2016. **Abril 2016**, Bogota/Colombia. “FAST DETECTION OF DEPSIDES AND DEPSIDONES IN METHANOLIC EXTRACTS OF ANTARTIC LICHENS *Ramalina terebrata* AND *Umbilicaria antartica* BY UHPLC-Q/ORBITRAP/MS/MS”

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Goedert, M. Spillantini, y col., «Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain,» *EMBO Journal*, nº 2, pp. 393-399, 1989.
- [2] H. Luo, Y. Yamamoto, y col., «Lecanoric acid, a secondary lichen substance with antioxidant properties from *Umbilicaria antarctica* in maritime Antarctica (King George Island),» *polar biology*, nº 33, p. 1033-1040, 2009.
- [3] Z. S. Marković y N. T. Manojlović, «Analytical characterization of lichexanthone in lichen: HPLC, UV spectroscopic, and DFT analysis of lichexanthone extracted from *Laurera benguelensis* (Mull. Arg.) Zahlbr.,» *monatsh chemistry*, nº 141, p. 945-952, 2010.
- [4] Z. Marković, D. Milenković, y col., «PM6 and DFT study of free radical scavenging activity of morin,» *Food Chemistry*, nº 134, p. 1754-1760, 2012.
- [5] B. Ranković, M. Kosanić, y col., «Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites,» *Medicinal Chemistry Research*, nº 1, p. 408-416, 2014.
- [6] R. Honegger, «Functional aspects of the lichen symbioses,» *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, nº 42, p. 553-578, 1991.
- [7] T. Nash, «Lichen biology,» *Cambridge University Press, Cambridge*.
- [8] M. Hale, «The biology of lichens,» *Edward Arnold, London*, 1983.
- [9] C. Hametner, E. Stocker-Wörgötter y col., «New insights into diversity and selectivity of trentepohlialean lichen photobionts from the extratropics,» nº 63, pp. 31-40, 2014.
- [10] V. Ahmadjian, «Phycologia,» nº 6, p. 127, 1967.
- [11] K. Müller, «Pharmaceutically relevant metabolites from lichens,» *Applied Microbiology and Biotechnology*, nº 1, pp. 9-16, 2001.
- [12] J. W. Deacon, «Modern Mycology,» p. 111, 1997.
- [13] S. Huneck, «The Significance of Lichens and Their Metabolites,» *Naturwissenschaften*, nº 86, pp. 559-570, 1999.
- [14] J. Boustie y M. Grube, «Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites,» *plant genetics resources journal*, nº 3, pp. 273-287, 2005.
- [15] T. Feuerer y D. Hawksworth, «Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions,» *Biodiversity and Conservation*, nº 16, pp. 85-98, 2007.

- [16] V. Ahmadjian , «Lichens are more important than you think,» *Bioscience* , nº 45, pp. 123-124, 1995.
- [17] J. De Vera, G. Honeck, y col., «The potential of the lichen symbiosis to cope with the extreme conditions of outer space II: germination capacity of lichen ascospores in response to simulated space conditions.,» *advances in space research*, nº 33, pp. 1246-43, 2004.
- [18] N. Honda y . W. Vilegas, «A química dos líquens,» *química nova*, nº 1, pp. 110-125., 1999.
- [19] S. Huneck y I. Yoshimura, «Identification of lichen substances,» *Springer Berlin Heidelberg*, 1996.
- [20] Z. Vasudeo y C. Lew, «Biopharmaceutical potencial of lichens,» *Pharmaceutical Biology*, nº 50, pp. 778-798, 2012.
- [21] G. Karthikaidevi, G. Thirumaran, y col., «Screening of the antibacterial properties of lichen *Roccella belangeriana* (awasthi) from Pichavaram mangrove (*Rhizophora* sp.),» *Advances in Biological Research*, nº 3, p. 127–131, 2009.
- [22] F. Atalay, M. Hacili, y col., Kufreviogly, «Antioxidant phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. lichen species,» *Turkish Journal of Chemistry*, nº 35, pp. 647-661, 2011.
- [23] J. Lawrey , «A biological review of lichen substances,» *Bryologist*, nº 89, pp. 111-122, 1986.
- [24] K. Molnár y E. Farkas, «Current results on biological activities of lichen secondary metabolites,» *Zeitschrift für Naturforschung*, nº 65, p. 157 – 173, 2010.
- [25] W. Culberson, «Chemosystematics and ecology of lichen-forming fungi,» *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, nº 1, p. 153–170, 1970.
- [26] B. Lindberg, B. Silvaner, y col., «Studies on the chemistry of lichens 19* Mannitolglycosides in peltigera species,» *Acta chemica scandinavica*, nº 18, pp. 213-216, 1964.
- [27] P. Badhe y P. Patwardhan, «Qualitative and quantitative determination of free amino acid in *parmelia wallichiana* and *Leptogium azureum*,» *The Bryologist*, nº 75, pp. 368-389, 1972.
- [28] N. Margaris., «Free amino acid pools in *Cladonia pyxidata* and *Peltigera* Sp.,» *The Bryologist*, nº 77, pp. 77-79, 1974.
- [29] J. ELIX y E. Stocker-worgotter, «Biochemistry and secondary metabolites,» *Lichen biology*, 2nd ed. *Cambridge University Press*, pp. 104-133, 2008.
- [30] P. Le Pogam, A. Schinkovitz, y col., «Matrix-Free UV-Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry as a Versatile Approach for Accelerating Dereplication Studies on Lichens,» *Analytical chemistry*, nº 87, pp. 10421-10428, 2015.
- [31] J. Boustie , S. Tomasi, y col., «Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source,» *Phytochemistry Reviews*, nº 10, pp. 287-307, 2011.

- [32] C. Culberson y D. Armaleo, «Induction of a complete secondary-product pathway in a cultured lichen fungus,» *Experimental Mycology*, nº 16, pp. 52-63, 1992.
- [33] A. Fazio, M. Adler, y col., «Lichen secondary metabolites from the cultured lichen mycobionts of *Teloschistes chrysophthalmus* and *Ramalina celastri* and their antiviral activities,» *Zeitschrift für Naturforschung*, nº 62, pp. 543-549, 2007.
- [34] A. Hager, G. Brunauer y col., «Production and bioactivity of common lichen metabolites as exemplified by *Heterodea muelleri* (Hampe),» *Journal of Chemical Ecology*, nº 34, pp. 113-120, 2008.
- [35] J. Mattsson, «Lichen proteins, secondary products and morphology: a review of protein studies in lichens with special emphasis on taxonomy,» *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, nº 76, pp. 235-248, 1994.
- [36] E. Stocker-Worgotter y J. Elix, «Secondary chemistry of cultured mycobionts: formation of a complete chemosyndrome by the lichen fungus of *Lobaria spathulata*,» *Lichenologist*, nº 34, pp. 351-359, 2002.
- [37] G. Brunauer, A. Hager, y col., Stocker-Worgotter, «Alterations in secondary metabolism of aposymbiotically grown mycobionts of *Xanthoria elegans* and cultured resynthesis stages,» *Plant Physiology and Biochemistry*, nº 45, pp. 146-151, 2007.
- [38] I. Yoshimura, T. Kurokawa, y col., «Lichen substances in cultured lichens,» *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, nº 7, pp. 249-261, 1994.
- [39] M. Hale, «The biology of lichens,» *Edward Arnold, London*, p. 190, 1983.
- [40] R. Honegger, «Ultrastructural studies in lichens,» *New Phytologist*, nº 103, pp. 797-808, 1986.
- [41] G. Shrestha y L. St. Clair, «Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs,» *Phytochemistry Review*, nº 12, p. 229-244, 2013.
- [42] J. Elix, «Biochemistry and secondary metabolites,» *Lichen Biology*, nº 1, pp. 154-180, 1996.
- [43] E. Stocker-Wörgötter, «Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes,» *Natural Product Reports*, nº 25, pp. 188-200, 2008.
- [44] V. Shukla y G. Pant Joshi, «Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review,» *Phytochemistry Reviews*, nº 9, pp. 303-314, 2010.
- [45] C. Vicente y M. Legaz, «Lichen Enzymology,» *CRC Handbook of Lichenology, vol II, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida*, p. 239, 1988.
- [46] C. Vicente, «Fisiología de las sustancias líquénicas,» *Alhambra, Madrid*, p. 162, 1975.
- [47] C. Culberson, «Join occurrence of lichen depsidone and its probable depsides precursor,» *Science*, nº 143, p. 255, 1964.

- [48] C. Culberson , «Biogenetic relationship of the lichen substances in the framework of systematics,» *The briologist*, nº 89, p. 91.
- [49] A. Basile, D. Rigano, y col., «Antiproliferative, Antibacterial and Antifungal Activity of the Lichen *Xanthoria parietina* and Its Secondary Metabolite Parietin,» *International Journal of Molecular Sciences*, nº 16, pp. 7861-7875, 2015.
- [50] L. Xu Song, Z. Yina, y col., «The antibacterial activity and action mechanism of emodin from *Polygonum cuspidatum* against *Haemophilus parasuis* in vitro,» *Microbiological Research*, nº 186, p. 139-145, 2016.
- [51] K. Ahirwar y C. Jain, «Aloe-emodin novel anticancer Herbal Drug,» *International Journal of Phytomedicine*, nº 3, pp. 27-31, 2011.
- [52] L. Yan Sun, Z. Liang Liu, y col., «Three antibacterial naphthoquinone analogues from cultured mycobiont of lichen *Astrothelium* sp,» *Chinese Chemical Letters*, nº 7, pp. 842-845, 2010.
- [53] M. Luckner, «Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals,» *Springer-Verlag, Berlin*, p. 563, 1990.
- [54] J. Elix , « Biochemistry and secondary metabolites in lichen biology (Nash III T. H., ed.),» *Cambridge University Press, Cambridge*, pp. 155-180, 1996.
- [55] J. Rikkinen, «What's behind the pretty colours? A study on the photobiology of lichens,» *Nordic journal of botany*, nº 5, p. 556, 1997.
- [56] B. Muggia, I. Schmitt y M. Grube, «Lichens as treasure chests of natural products,» *Sim news*, pp. 85-97, 2009.
- [57] R. Donkin, «The "Manna Lichen": *Lecanora esculenta*,» *Anthropos*, nº 76, pp. 562-576, 1981.
- [58] D. Allen y G. Hatfield, «Medicinal plants in folk tradition. An ethnobotany of Britain & Ireland,» *Timber Press*, p. 417, 2004.
- [59] D. Richardson, «Medicinal and other economic aspects of lichens CRC Handbook of Lichenology volume III,» *CRC Press, Boca Raton, Florida.*, pp. 93-108, 1988.
- [60] N. Perry, N. Benn, y col., «Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens,» *ichenologist*, nº 31, pp. 627-636, 1999.
- [61] S. Redzic, S. Barudanovic, y col., «Wild mushrooms and lichens used as human food for survival in war conditions; Podrinje-Zepa Region (Bosnia and Herzegovina, W. Balkan),» *Human ecology*, nº 17, pp. 175-187, 2010.
- [62] J. Redon, «liques Antarticos,» *Instituto Antartico Chileno (INACH)*, p. 123, 1985.
- [63] D. Richardson, «Medicinal and other economic aspects of lichens,» *CRC Handbook of lichenology, vol III, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida*, nº 1, pp. 93-108, 1988.
- [64] A. Karagöz y A. Zuhai, «Antibacterial activity of some lichen extracts,» *Journal of Medicinal Plants Research*, nº 12, pp. 1034-1039, 2009.

- [65] D. Joulian y R. Tabacchi, «Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: oakmoss,» *Flavour and Fragrance Journal*, nº 2, pp. 49-61, 2009.
- [66] B. Poljsak, D. Uput, y col., «Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants,» *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p. 11, 2013.
- [67] B. Halliwell y J. Gutteridge, «The definition and measurement of antioxidants in biological systems,» *Free Radical Biology and Medicine*, nº 1, pp. 125-126, 1995.
- [68] W. Dröge, «Free radicals in the physiological control of cell function,» *Physiological Reviews*, nº 1, pp. 47-95, 2002.
- [69] H. Sies, «Strategies of antioxidant Physiologies defense,» *European Journal of Biochemistry*, nº 225, pp. 213-219, 1993.
- [70] D. Betteridge, «What is oxidative stress?,» *Metabolism*, nº 49, pp. 3-8, 2000.
- [71] B. Sangameswaran y D. Chumbhale, «In vitro antioxidant activity of roots of *Thespesia lampas dalz* and *gips*,» *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, nº 22, pp. 368-372, 2009.
- [72] N. Sachindra, M. Airanthi, y col. «Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of extracts from Indian seaweeds,» *Journal of Food Science and Technology*, nº 47, pp. 94-99, 2010.
- [73] R. Kahl y H. Kappus, «Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E,» *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, nº 4, pp. 329-338, 1993.
- [74] C. Fernandez-Moriano, M. Gomez-Serranillos, y col., «Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review,» *Pharmaceutical biology*, nº 1, pp. 1-17, 2015.
- [75] T. Sawa, M. Nakao, y col., «Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor promoter effect of vegetables,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, nº 47, pp. 397-402, 1999.
- [76] I. Guncin, S. Beydemir, y col., «Invitroantioxidant properties of morphine,» *Pharmacological Research*, nº 49, pp. 59-66, 2004.
- [77] M. Kosanic y N. Manojlovic, «*Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents,» *Food and Chemical Toxicology*, nº 53, pp. 112-118, 2013.
- [78] M. Kosanic, B. Rankovic, y col., «Antioxidant properties of some lichen species,» *Journal of Food Science and Technology*, nº 48, pp. 584-590, 2011.
- [79] N. Manojlovic, P. Vasiljevic, y col., «Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (*Umbilicariaceae*,» *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 8, 2012.

- [80] F. Odabasoglu, A. Aslan, y col., «Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species,» *Phytotherapy Research*, nº 18, pp. 938-941, 2014.
- [81] F. Odabasoglu, A. Aslan, y col., «Antioxidant activity, reducing power phenolic content of some lichen species,» *Fitoterapia*, nº 76, pp. 216-219, 2005.
- [82] G. Stojanovic, I. Stojanovic, y col., «Reducing power and radical scavenging activity of four Parmeliaceae species,» *Central European Journal of Biology*, nº 5, pp. 808-813, 2010.
- [83] C. Stanly, D. Ali, y col., «Comparative evaluation of antioxidant activity and total phenolic content of selected lichen species from Malaysia,» *Journal of Pharmacy Research*, nº 4, p. 2824–2827, 2011.
- [84] S. White, A. Pollyanna, y col., «Antioxidant Activity and Mechanisms of Action of Natural Compounds Isolated from Lichens: A Systematic Review,» *Molecules*, nº 19, pp. 14496-14527, 2014.
- [85] B. Ranković, «Lichen Secondary Metabolites,» *Springer*, p. 202, 2015.
- [86] M. Prince, A. Wimo, y col., «informe mundial sobre el Alzheimer 2015, las consecuencias de la demencia,» *Alzheimer's Disease International*, 2015.
- [87] R. Maccioni y J. Muñoz, «The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders,» *Archives of Medical Research*, nº 32, pp. 367-381, 2001.
- [88] I. Khlistunova y J. Biernat, «Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs,» *Journal of Biological Chemistry*, nº 281, pp. 1205- 1214, 2006.
- [89] S. Taniguchi y N. Suzuki, «Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins,» *Journal of Biological Chemistry*, nº 280, pp. 7614-7623., 2005.
- [90] Y. Porat y A. Abramowitz, «Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism.,» *Chemical Biology & Drug Design Journal*, nº 67, pp. 27- 37, 2006.
- [91] M. Pickhardt y Z. Gazova, «Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells.,» *The Journal of Biological Chemistry*, nº 280, pp. 3628-3635., 2005.
- [92] D. Drechsel y A. Hyman, «Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau.,» *Molecular biology of the cell*, nº 10, pp. 1141-1154, 1992.
- [93] P. LoPresti, S. Szuchet, y col., «Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes,» *Proceedings of the National Academy of Sciences*, nº 22, p. 10369–10373, 1995.

- [94] A. Ebnet, R. Godemann, y col., «Overexpression of Tau Protein Inhibits Kinesin-dependent Trafficking of Vesicles, Mitochondria, and Endoplasmic Reticulum: Implications for Alzheimer's Disease,» *The Journal of Cell Biology*, nº 3, pp. 777-794, 1998.
- [95] A. Himmler, O. Drechsel, y col., «Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule binding domains and variable N-terminal domains,» *Molecular and Cellular Biology*, nº 9, pp. 1389-1396, 1989.
- [96] P. Nelson, K. Stefansson, y col., «Molecular evolution of tau protein: implications for Alzheimer's disease,» *Journal of Neurochemistry*, nº 67, pp. 1622-1632, 1996.
- [97] D. Kumar Upreti, P. Divakar, y col., «Recent Advances in Lichenology. Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques, Volume 2,» *Springer*, p. 232, 2015.
- [98] Y. Wang y E. Mandelkow, «Tau in physiology and pathology,» *Nature Reviews Neuroscience*, nº 1, pp. 5-21, 2016.
- [99] J. Avila, J. Lucas, y col., «Role of Tau Protein in both Physiological and Pathological Conditions,» nº 84, pp. 361-384, 2004.
- [100] C. Wischik, C. Harrington, y col., «Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease,» *Biochemical Pharmacology*, nº 88, pp. 529-539, 2014.
- [101] A. Kern, C. Behl, y col., «The unsolved relationship of brain aging and late-onset Alzheimer disease,» *Biochimica et Biophysica Acta*, nº 1790, pp. 1124-1132, 2009.
- [102] B. Bulic, M. Pickhardt, y col., «Progress and developments in Tau aggregation inhibitors for Alzheimer disease,» *Journal of Medical Chemistry*, nº 56, pp. 4135-4155, 2013.
- [103] P. Castillo, M. Piovano, y col., «Studies on Chilean lichens. XXVI. Secondary products from Lepolichen coccophorus,» *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, nº 40, pp. 465-467, 1993.
- [104] J. Garbarino, M. Chamy, y col., «Studies on Chilean lichens. X. The phenolic constituents of Protousnea magellanica,» *Journal of Natural Products*, nº 50, pp. 745-747, 1987.
- [105] J. Garbarino, M. Piovano, y col., «Estudios de líquenes chilenos. XXV. Metabolitos secundarios de Cladonia gracilis,» *Boletín de la sociedad de química del Perú*, nº 56, pp. 21-25, 1990.
- [106] W. Quilhot, J. Garbarino, y col., «Studies on Chilean lichens. XI. Secondary metabolites from antarctic lichens,» *Serie Científica Inach*, nº 39, pp. 75-89, 1989.
- [107] W. Quilhot, M. Hidalgo, y col., «Posible rol biológico de metabolitos secundarios de líquenes,» nº 42, pp. 53-59, 1992.
- [108] M. Piovano, W. Quilhot, y col., «Studies on Chilean lichens. XXI. Secondary metabolites from the antarctic species hypogymnia antarctica,» *Serie Científica Inach*, nº 43, pp. 81-85, 1993.

- [109] N. Nenadis, O. Lazaridou, y col., «Use of reference compounds in antioxidant activity assessment,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, nº 55, pp. 5452-5460, 2007.
- [110] W. Brand-Williams, M. Cuvelier, y col., «Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity,» *Resultados de búsqueda Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, nº 28, pp. 25-30, 1995.
- [111] B. Ou, M. Hampsch-Woodill, y col., «Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe,» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, nº 49, p. 4619-4626, 2001.
- [112] U. Laemmli, «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,» *Nature*, nº 227, pp. 680-185, 1970.
- [113] M. Hattori, K. Minoura, y col., «Different inhibitory response of cyanidin and methylene blue for filament formation of tau microtubule-binding domain,» *Biochemical and Biophysical Research Communications*, nº 12, pp. 158-163, 2008.