

ÍNDICE

	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Objetivos	4
3.1. Objetivo general	4
3.2. Objetivos específicos	4
4. Revisión bibliográfica	5
4.1. Líquen	5
4.1.1. Bioindicadores de contaminación atmosférica	8
4.1.2. Antimicrobianos	8
4.1.3. Antiparasitarios	9
4.1.4. Antiinflamatorios	9
4.1.5. Otras propiedades	10
4.1.6. Inhibición de la agregación plaquetaria	10
4.2. Hemostasia	12
4.2.1. Enfermedades cardiovasculares	12
4.2.2. Plaquetas	13
4.2.2.1. Estructura y función plaquetaria	14
4.2.3. Antiagregantes plaquetarios.	15
4.2.3.1. Inhibidores de enzimas plaquetarias	15
4.2.3.1.1. Inhibidores de la ciclooxigenasa	15
4.2.3.1.2. Inhibidor de fosfodiesterasa	17
4.2.3.2. Inhibidores de receptores plaquetarios	17
4.2.3.2.1. Inhibidores de receptores de ADP	17
4.2.3.2.2. Inhibidores de GPIIb-IIIa	18

4.2.3.2.3. Inhibidor del receptor de tromboxano	19
4.2.3.2.4. Inhibidor de receptor de trombina	19
4.2.3.3. Otros antiagregantes	19
5. Materiales y Métodos	21
5.1. Soluciones	21
5.2. Procesamiento de especies liquénicas	22
5.2.1. Colecta	22
5.2.2. Conservación	23
5.2.3. Determinación taxonómica de las especies	24
5.2.4. Extracción de metabolitos	24
5.2.5. Preparación de estándares de extractos liquénicos	28
5.3. Efecto antiagregante plaquetario	28
5.3.1. Preparación de Plasma rico en plaquetas	28
5.3.2. Preparación de Plasma pobre en plaquetas	29
5.3.3. Agonistas	29
5.3.4. Medición de la agregación plaquetaria	30
5.3.5. Cálculo del porcentaje de agregación	31
5.3.6. Determinación aproximada de la concentración mínima inhibitoria	32
5.4. Obtención fracciones	32
5.4.1. Cromatografía de capa fina preparativa	32
5.4.2. Medición de la agregación plaquetaria de fracciones	33
5.4.3. Espectrometría de Masas con Ionización por Electro spray (ESI- MS)	34
5.5. Análisis estadístico	34
6. Resultados	35
6.1. Obtención de extractos crudos	35
6.2. Obtención de fracciones desde los extractos crudos	36
6.3. Efecto antiagregante plaquetario	36

6.3.1. Medición de la inhibición de la agregación plaquetaria de extractos metanólicos crudos	36
6.2.2. Medición de la inhibición de la agregación plaquetaria de fracciones	40
6.4. Determinación aproximada de la concentración mínima inhibitoria	44
6.5. Espectrometría de Masas con Ionización por Electrospray (ESI-MS)	45
7. Discusión	47
8. Conclusión	49
9. Bibliografía	50
10. Anexo	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Especie liquénica <i>Ramalina lacera</i> .	7
Figura 2. Fragmentación del citoplasma del megacariocito. (A) Megacariocito. (B) Plaquetas.	14
Figura 3. Estructura de inhibidores de receptores plaquetarios de ADP: (A) ticlopidina, (B) clopidogrel y (C) prasugrel.	18
Figura 4. Especies liquénicas saxícolas. (A) <i>Umbilicaria sp.</i> (B) <i>Rhizoplaca melanophthalma</i> .	22
Figura 5. Localización de la Laguna del Maule. [Extraído de: < ">http://200.27.126.222:8399/mapa_geo_chile_igm/mapviewer.jsf?width=461&eight=372#>].	23
Figura 6. (A) Limpieza de material liquénico. (B) Molienda de material liquénico. (C) Pesaje de material liquénico. (D) Matraz Erlenmeyer rotulado para <i>Umbilicaria deusta</i> . (E) Matraz Erlenmeyer rotulado para <i>Rhizoplaca melanophthalma</i> .	25
Figura 7. (A) Especies liquénicas suspendidas en solvente. (B) Matraces en sonicador. (C) Balón de vidrio con solvente y extracto. (D) Balón conectado a rotavapor. (E) Extracto resuspendido en cloroformo y dispensado en viales rotulados y pesados previamente.	27
Figura 8. Espectrofotómetro Cecil, CE1021 acondicionado.	30
Figura 9. Placa de sílica gel con su fase móvil acetato de etilo y metanol (9:1).	33
Figura 10. Efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria <i>in vitro</i> inducida por ADP 8 µm en PRP tratado con concentración de DMSO 0,5 % (control negativo, CN), extracto metanólico de <i>Rhizoplaca melanophthalma</i> 1 mg/ml (R) y <i>Umbilicaria deusta</i> 1 mg/ml (U) (concentraciones expresadas en volumen final de reacción).	39

Figura 11. Efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria *in vitro* inducida por ADP 8 μm de las fracciones de extractos metanólicos crudos de *U. deusta* en PRP. U0,5: extracto metanólico crudo de *U. deusta*, FU1: fracción 1, FU2: fracción 2, FU3: fracción 3 de, FU4: fracción 4, fu5: fracción 5, CN: control negativo (DMSO 0,5%). 42

Figura 12. Efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria *in vitro* inducida por ADP 8 μm en PRP de las fracciones de extractos metanólicos crudos de *Rhizoplaca melanophthalma*. R0,5: extracto metanólico crudo de *R. melanophthalma*, FR1: fracción 1, FR2: fracción 2, FR3: fracción 3, CN: control negativo (DMSO 0,5%). 43

Figura 13. Curva de inhibición de la agregación plaquetaria *in vitro* inducida por ADP 8 μm en PRP. 44

Figura 14. Espectro de masa de fracciones de extractos metanólicos crudos. (A) Fracción 1 de *R. melanophthalma*, (B) Fracción 2 de *R. melanophthalma*, (C) fracción 3 de *R. melanophthalma*, (D) fracción 1 de *U. deusta*.

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Peso de extractos obtenidos con solventes de distinta polaridad y porcentaje de rendimiento total de cada especie.	35
Tabla 2. Efecto antiagregante de extractos metanólicos crudos de dos especies liquénicas de la Región del Maule activadas por TRAP-6 30µM.	37
Tabla 3. Efecto antiagregante de extractos metanólicos crudos de dos especies liquénicas de la Región del Maule activadas por ADP 8µM.	38
Tabla 4. Efecto antiagregante de fracciones de extractos metanólicos de dos especies liquénicas de la Región del Maule activadas por ADP 8 µM.	41