

## ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN MUSGOS

### RESUMEN

Los musgos no poseen las mismas barreras anatómicas que las plantas vasculares, por lo que se ha sugerido que la acumulación de ciertos compuestos, como flavonoides, tiene un rol fundamental en su defensa y adaptación a condiciones causantes de estrés oxidativo. Se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos totales de seis especies de musgos por los métodos DPPH, ABTS y FRAP. De las especies evaluadas, *Sphagnum* sp. presentó actividades significativas por los tres métodos, mientras que *Leptodontium luteum* y *Dicranum frigidum* presentaron actividad relevante en al menos uno de los métodos.

**PALABRAS CLAVES:** Musgos, actividad antioxidante, DPPH, ABTS, FRAP, flavonoides

### ABSTRACT

*Mosses do not have the same anatomical barriers as vascular plants, so it has been suggested that the accumulation of certain compounds, such as flavonoids, have a fundamental role in its defense and adaptation to conditions causing oxidative stress. The antioxidant potential of six crude extracts of moss species was evaluated by the DPPH, ABTS, and FRAP methods. Of the evaluated species, Sphagnum sp. exhibited significant activity in the three methods tested, while Leptodontium luteum and Dicranum frigidum presented a relevant activity in at least one of the methods.*

**KEYWORDS:** Mosses, antioxidant activity, DPPH, ABTS, FRAP, flavonoids

### 1. INTRODUCCION

Por la capacidad de detener o retardar procesos oxidativos, los cuales pueden causar daños en las células o afectar la preservación de productos, los compuestos con actividad antioxidante tienen una gran aplicación en el campo de los alimentos, la industria, la medicina, la cosmética, entre otros [1-3]. En la búsqueda de nuevos compuestos con dicha actividad nos enfocamos en un grupo de plantas poco estudiado a nivel fitoquímico y que presenta ciertas características que le confieren especial interés. Es el caso de los musgos, los cuales hacen parte de las plantas no vasculares y por lo tanto no poseen las mismas adaptaciones o mecanismos de defensa que las plantas vasculares, que cuentan con una cutícula o paredes con depósitos de ceras. A pesar de no poseer estas barreras, para el grupo de los briofitos (musgos, hepáticas y antocerotes) no se reportan ataques causados por hongos, bacterias o virus y muchos presentan una buena resistencia a la desecación, lo que ha llevado a sugerir que han desarrollado un metabolismo químico complejo como estrategia de defensa y adaptación, con gran potencial para su exploración [4,5].

Hasta el momento no se había evaluado la capacidad antioxidante de extractos de musgos, aunque se ha

reportado para este tipo de plantas estructuras químicas que pueden presentar dicha actividad. [4,6]. Entre estas se encuentran los flavonoides, que han demostrado ser los responsables de la actividad antioxidante en muchos extractos de plantas [7]. Para este estudio se evaluó la capacidad captadora de radicales libres de seis especies de musgos por los métodos espectrofotométricos DPPH, ABTS y FRAP y se llevó a cabo la prueba cualitativa de Shinoda para la detección de flavonoides, con el fin de relacionar la actividad antioxidante con la presencia de dichos compuestos.

### 2. MATERIALES Y METODOS

**2.1. Material vegetal.** Las especies de musgos evaluadas fueron seleccionadas por ser las más explotadas por los campesinos de la zona de estudio con fines ornamentales. Dichas especies fueron colectadas en julio de 2005, en el Corregimiento de Santa Elena, municipio de Medellín, Colombia. Fueron identificadas como *Breutelia chrysea* (Bartramiaceae), *Dicranum frigidum* (Dicranaceae), *Hypnum amabile* (Hypnaceae), *Leptodontium luteum* (Pottiaceae), *Sphagnum* sp. (Sphagnaceae) y *Thuidium peruvianum* (Thuidiaceae). Un espécimen testigo de cada especie fue depositado en el Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA).

### PILAR AUBAD LOPEZ

Bióloga  
Estudiante de Maestría en  
Ciencias-Química. Universidad  
Nacional de Colombia, Medellín  
pilaraubad@yahoo.com

### BENJAMIN A. ROJANO

Químico, MSc., PhD.  
Profesor Asociado  
Escuela de Química  
Universidad Nacional de  
Colombia, Medellín  
brojano@unalmed.edu.co

### TATIANA LOBO ECHEVERRI

Bióloga, PhD.  
Profesora Asistente  
Escuela de Química  
Universidad Nacional de  
Colombia, Medellín  
tloboech@unalmed.edu.co

**2.2. Reactivos.** DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, free radical), ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chromane-2-carboxylic acid), TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine) y ácido gálico (3,4,5-Trihydroxybenzoic acid) de marca Sigma-Aldrich Chem. Co. (USA). Persulfato de potasio, ácido L-ascórbico y solventes de grado analítico DMSO (Dimetil Sulfóxido), metanol, éter de petróleo y acetato de etilo de Merck (Darmstadt, Germany). Cloruro de hierro hexahidratado de J.T Baker (NJ, USA).

**2.3. Extracción y fraccionamiento.** El material vegetal seco se extrajo con etanol (1L x 100 g), se filtró y evaporó a sequedad. Los extractos crudos se redisolvieron en metanol o DMSO, según su solubilidad, y fueron sometidos a evaluación biológica. El extracto más promisorio (*Sphagnum* sp) fue posteriormente fraccionado por medio de solventes orgánicos de diferentes polaridades, obteniéndose la fracción 1, soluble en éter de petróleo y la fracción 2 soluble en acetato de etilo. Ambas fracciones fueron sometidas a evaluación biológica en DMSO.

**2.4. Evaluación de la actividad antioxidante.** Se emplearon tres métodos espectrofotométricos para evaluar la capacidad reductora de las muestras al actuar sobre radicales preformados en diferentes fases [2]. Se usó un espectrofotómetro Jenway 6405UV/Visible. En todas las técnicas cada muestra se evaluó por cuadruplicado.

**2.4.1. Capacidad atrapadora del radical libre DPPH<sup>•</sup>.** Se empleó el método de Brand-Williams et al. [8], con algunas modificaciones. Se midió la capacidad de las muestras para atrapar el radical DPPH a una longitud de onda de 515-517nm, luego de 30 minutos de reacción. Para el ensayo se usaron 10 µL de muestra y 990 µL de la solución de DPPH. Para cada extracto se calculó el porcentaje de inhibición del radical y a los más promisorios se les determinó la concentración inhibitoria del 50% (IC<sub>50</sub>) [9].

**2.4.2. Ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS<sup>•+</sup>.** El radical se generó por una reacción de oxidación del ABTS con persulfato de potasio. En la evaluación se utilizaron 20 µl de muestra y 980 µl de la solución de ABTS<sup>•+</sup> en buffer fosfato a un pH de 7.4. Luego de 30 minutos se leyó la absorbancia (734 nm). La curva de calibración se realizó usando Trolox como estándar y se expresaron los resultados como capacidad antioxidante en equivalentes Trolox (TEAC en µmol Trolox/g muestra) [10]. Para las muestras con valores TEAC más altos se determinó el IC<sub>50</sub>.

**2.4.3. Prueba FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power).** Este método se llevó a cabo según Benzie y Strain [11]. Se utilizaron 900 µl de una solución de TPTZ

y FeCl<sub>3</sub> en buffer acético-acetato de sodio (pH 3.4), 50 µl de muestra y 50 µl de agua destilada. Luego de 30 minutos se leyó la absorbancia (593nm) y se construyó la curva de referencia usando ácido ascórbico. Las actividades de los extractos crudos se expresaron como AEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Acido Ascórbico: µmol ácido ascórbico /g muestra).

**2.5. Prueba Shinoda y cromatografías en papel.** Para esta prueba los extractos crudos fueron sometidos a una partición inicial con éter de petróleo. La fracción insoluble en este solvente fue reextraída con una mezcla de etanol-agua (1:7) a 60° C. La solución se sometió a la prueba colorimétrica de Shinoda, utilizándose como control positivo la quercetina. Adicionalmente se agregó alcohol isoamílico a la reacción anterior para confirmar el cambio de coloración de las muestras que exhibieron resultados positivos [12]. Como prueba de apoyo se realizaron también cromatografías bidimensionales en papel Whatman #3 MM. Como primer sistema de solventes se usó *tert*-butanol – ácido acético – agua (3:1:1) y como segundo disolvente, ácido acético glacial (100%). La presencia de bandas cafés al revelar con vapores de amoníaco se consideró como positiva para flavonoides [13].

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la literatura se encuentra ampliamente referenciada la necesidad de utilizar más de un método cuando se evalúa la capacidad antioxidante de extractos vegetales, debido a que los antioxidantes pueden actuar por mecanismos diferentes, dependiendo del sistema de reacción o la fuente radicalaria [2]. En este estudio los tres ensayos utilizados evalúan la capacidad reductora de las muestras al actuar sobre radicales preformados en diferentes fases, obteniéndose una evaluación de un amplio rango del perfil metabólico de las plantas [14,15].

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la actividad antioxidante de los seis extractos. Las IC<sub>50</sub> se calcularon únicamente para los más promisorios por los métodos DPPH y ABTS.

De las seis especies el extracto de *Sphagnum* sp exhibió el potencial más promisorio, presentando actividad significativa en las tres técnicas evaluadas. Si se considera que en cada método las condiciones de reacción y solubilidad son diferentes, dicho extracto podría presentar varios compuestos con potencial antioxidante en un amplio rango de su perfil metabólico. Debido a estos resultados, se fraccionó este extracto con solventes de diferentes polaridades, lo cual permitió reconocer en la fracción 2 (soluble en acetato de etilo) un aumento de la actividad con respecto al extracto crudo, especialmente en la prueba ABTS. Esto sugiere que los compuestos de polaridad media-alta están involucrados en la actividad de esta planta, pudiendo ser polifenoles.

En los casos de *Leptodontium luteum*, con actividad selectiva en el método DPPH, y *Dicranum frigidum*, con actividad en los métodos ABTS y FRAP, se sugiere que tanto el tipo de moléculas con actividad antioxidante, como la solubilidad de éstas, sean determinantes en la reacción. Infiriendo que la actividad mostrada se da por la presencia de flavonoides y otro tipo de polifenoles, se reporta en la literatura que flavonoides que no contengan grupos hidroxilo en el anillo B, así como compuestos que contengan ácidos aromáticos con 1 sólo grupo hidroxilo, no reaccionarían con el radical DPPH, pero sí lo harían con el radical ABTS [16]. Respecto a la solubilidad podría decirse que en *L. luteum* los metabolitos activos son de tipo lipofílico, mientras que para el extracto de *D. frigidum* podría tratarse de metabolitos hidrofílicos, con una polaridad alta. Lo anterior es relevante ya que da pautas para proseguir con el proceso de fraccionamiento biodirigido.

Muestras	DPPH IC <sub>50</sub> (mg/L)	ABTS		FRAP AEAC (µmol/g)
		TEAC (µmol/g)	IC <sub>50</sub> (mg/L)	
<i>Breutelia chrysea</i>	158.0	386.8	-	238.17
<i>Dicranum frigidum</i>	-	454.5	256.1	267.5
<i>Hypnum amabile</i>	-	200.5	-	180.7
<i>Leptodontium luteum</i>	60.6	284.63	-	182.4
<i>Thuidium peruvianum</i>	-	315.73	-	207.7
<i>Sphagnum</i> sp.	132.4	598.0	32.7	307.4
<i>Sphagnum</i> sp. Fracción 1	-	103.9	-	-
<i>Sphagnum</i> sp. Fracción 2	103.1	639.6	15.0	-

Tabla 1. Actividad antioxidante de los extractos de seis especies de musgos por los métodos DPPH, ABTS y FRAP y de fracciones 1 y 2 de *Sphagnum* sp. (métodos DPPH y ABTS)

Respecto a la correlación entre los métodos empleados observamos una relación directa entre los métodos ABTS y FRAP ( $r^2 = 0,9886$ ). Si bien en la literatura no hay un consenso respecto a esta correlación, algunas de sus características podrían explicar el resultado. Por un lado, el potencial redox del  $Fe^{3+}$ -TPTZ es cercano al del  $ABTS^{*+}$  ( $\sim 0.7$  V) y compuestos similares podrían reaccionar en ambos métodos. Se llevan a cabo además en soluciones acuosas y compuestos con polaridad alta podrían tener una buena reactividad por los dos métodos [14,17].

Para el caso del DPPH los resultados no se correlacionan con los obtenidos por los métodos ABTS y FRAP. Al contrario de estos últimos, el DPPH se realiza en un solvente orgánico y compuestos de menor polaridad podrían reaccionar mejor en este método. Otro factor importante en el caso del DPPH es la accesibilidad

estérica y por ello el tamaño de las moléculas puede afectar la reacción [14,15]. Adicionalmente, el DPPH es más selectivo que el método ABTS y se ha visto que en el caso de los polifenoles la capacidad antioxidante cambia significativamente entre un método y otro [16].

Los seis extractos presentaron resultados positivos para flavonoides en la Prueba Shinoda, lo cual se corroboró con las cromatografías en papel. Con estos resultados no se podría concluir sobre la influencia de la actividad antioxidante por la presencia de flavonoides y habría que continuar con procesos de aislamiento e identificación de los metabolitos activos. Sin embargo, aun consideramos este tipo de compuestos como los más promisorios en los extractos evaluados, por ser reportados en musgos con una función fotoprotectora, actuando como atrapadores de radicales libres [7,18].

#### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El extracto de *Sphagnum* sp. fue el más promisorio, ya que en las tres técnicas evaluadas presentó actividades significativas. Un fraccionamiento de dicho extracto permitió incrementar la actividad en una fase con una polaridad media-alta. *Leptodontium luteum* presentó una actividad captadora del radical DPPH y *Dicranum frigidum* presentó actividad promisoriosa por los métodos ABTS y FRAP. Teniendo en cuenta que se evaluaron extractos crudos o fracciones complejas (en el caso de *Sphagnum* sp.), consideramos que estas tres especies podrían ser fuente importante de metabolitos con capacidad antioxidante y ameritan un proceso de aislamiento e identificación de los metabolitos activos.

Con este trabajo, en el cual tres de las seis especies evaluadas presentan actividades promisorias, y por los compuestos hasta ahora reportados en musgos, consideramos que este grupo de plantas presenta un potencial químico importante, poco estudiado hasta el momento.

#### 5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CORANTIOQUIA y a las Empresas Públicas de Medellín por la financiación de esta investigación enmarcada en el proyecto "Producción con proyección social: Hacia un modelo de cosecha sostenible de musgos en el área del embalse Piedras Blancas". Igualmente a la Corporación Académica Ambiental de la Universidad de Antioquia por la administración del proyecto. Agradecemos especialmente al Dr. Jaime Uribe, Adriana Corrales y Víctor Londoño por la identificación de las especies y a Nancy Vanegas por la asesoría con la Prueba de Shinoda.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] LACHANCE, P.A.; NAKAT, Z. y JEONG, W.S. 2001. Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition* 17: 835–838.
- [2] SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M. y BRUNI, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobial foods. *Food Chemistry* 91: 621-632.
- [3] WISEMAN, A. 2005. Functional-food protected by biomonitoring of reactive oxygen species? (ROS) *Trends in Food Science & Technology*. 16: 166-168.
- [4] ASAKAWA Y. 2001. Recent advances in phytochemistry of bryophytes-acetogenins, terpenoids and bis (bibenzyl) from selected Japanese, Taiwanese, New Zealand, Argentinean and European liverworts. *Phytochemistry* 56: 297-312.
- [5] ZINSMEISTER, H.D.; BECKERT, H.D y EICHER, T.1991. Bryophytes, a source of biologically active, naturally occurring material? *Angewandte Chemie International Edition in English* 30: 130–147.
- [6] MUES, R. 2000. Chemical constituents and biochemistry. pp. 150-181. *En: Shaw AJ, Goffinet B (eds.) Bryophytes Biology*. Cambridge University Press.
- [7] PIETTA, P-G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63: 1035-1042.
- [8] BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E y BERSET, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* 28: 25-30.
- [9] SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A. y SAURA-CALIXTO, F.1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76: 270-276.
- [10] RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. y RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231–1237.
- [11] BENZIE, IFF. y STRAIN, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70-76.
- [12] MARCANO, D. y HASEGAWA, M. 2002. Fitoquímica Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Caracas, Venezuela. 588 pp.
- [13] RUIZ, E.; FUENTES, G.; BECERRA, J.; GONZÁLEZ, F. y SILVA, M. 2002. Flavonoids as chemosystematic markers in Chilean species of *Drimys* J.R. Forst. Et G. Forst. (Winteraceae).. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 47: 273-278.
- [14] PRIOR, R.L.; WU, X. y SCHAICH, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53: 4290-4302.
- [15] SCHLESIER, K.; HARWAT, M.; BÖHM, V. y BITSCH, R. 2002. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research* 36: 177–187.
- [16] ROGINSKY, V. y LISSI, E.A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92: 235–254
- [17] STRATIL, P.; KLEJDUS, B. y KUBÁN, V. 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables. Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54: 607-616.
- [18] HUTTUNEN, S.; LAPPALAINEN, N.M y TURUNEN J. 2005. UV-absorbing compounds in subarctic herbarium bryophytes. *Environmental Pollution* 133: 303–314.