

Actividad antioxidante de líquenes de la cuenca alta del río Bogotá

Antioxidant activity of lichens in the upper basin of the Bogotá river

Oscar E. Rodríguez A., Fabio E. Díaz L., William A. Andrade B., Bibiana Moncada

Resumen

Los líquenes son una asociación de un hongo y un alga, la utilidad más conocida es como fuente de alimento, pero también se sabe de los usos como colorantes, actividad antibiótica, como componente principal en pomadas para evitar infecciones en heridas superficiales y quemaduras. Algunos líquenes se utilizan para elaborar cosméticos y perfumería, otros son fuentes naturales de aceites esenciales. La tendencia actual es la búsqueda de productos de origen natural con actividad biológica, útil para la salud, por tal razón se seleccionaron las especies *Everniastrum columbiense*, *Flavopunctelia flaventor*, *Parmotrema simulans*, *Ramalina celsastri*, *Teloschistes exilis* y *Usnea sp.*, colectadas en el margen occidental del río Bogotá, cuenca alta (N 05° 07' 23,4" W 73° 39' 10,5"), estableciéndose la actividad antioxidante por el método de decoloración de radicales DPPH[•]. Para ello se utilizaron extractos de diferentes polaridades; en concentraciones de 250, 125, 25, 2,5 y 0,25 ppm. El porcentaje de captación de radicales por el método DPPH[•] se encontró en un intervalo de 28.5 ± 0.14 y 95.5 ± 0.38 a 250 ppm. El Coeficiente de Inhibición media (IC50) y la Actividad Antioxidante Relativa con respecto al ácido ascórbico (AAR) mostró que los Extractos totales de los líquenes *Ramalina celsastri*, *Flavopunctelia flaventor* y *Parmotrema simulans* presentaron mayor actividad antioxidante por el método DPPH[•].

Palabras Clave: Líquenes, Actividad Antioxidante, DPPH[•]

Abstract

Lichens are a combination of a fungus and an alga, the best known use is as a food source, but it is also known for its use as dyes, antibiotic activity, as the main component in ointments to prevent infections in superficial wounds and burns. Some lichens are used to make cosmetics and perfumery, others are natural sources of essential oils. The current trend is the search for natural products with biological activity, useful for health, for this reason the species *Everniastrum columbiense*, *Flavopunctelia flaventor*, *Parmotrema simulans*, *Ramalina celsastri*, *Teloschistes exilis* and *Usnea sp* were selected. Lichens were collected in the range Western Bogotá river, upstream (N 05 ° 07 '23.4 "W 73 ° 39' 10.5"), establishing the antioxidant activity by DPPH[•] discoloration method radicals. These extracts of different polarities are used; at concentrations of 250, 125, 25, 2.5 and 0.25 ppm. The percentage of radical scavenging by DPPH[•] method is found in a range of 28.5 ± 0.14 and 95.5 ± 0.38 to 250 ppm. The average coefficient of inhibition (IC50) and the Relative Antioxidant Activity (%AAR) compared to ascorbic acid showed that total extracts of the lichens *Ramalina celsastri*, *Flavopunctelia flaventor* and *Parmotrema simulans* showed higher antioxidant activity by the DPPH[•] method.

Keywords: Lichens, Antioxidant DPPH[•]

Recibido / Received: Junio 26 de 2014 Aprobado / Approved: Octubre 07 de 2014

Tipo de artículo / Type of paper: Artículo científico y Tecnológico.

Afiliación Institucional de los autores / Institutional Affiliation of authors: Grupo de Investigación: Productos Naturales y Contaminación Ambiental. Ingeniería Ambiental, Universidad El Bosque.; Curadora Herbario Forestal UDBC-Sección Criptógamas, Grupo Colombiano de Lichenología GCOL, Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Autor para comunicaciones / Author communications: Oscar E. Rodríguez A, rodriguezoscare@unbosque.edu.co

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Introducción

Por antioxidante se entiende toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas) retarda, inhibe o previene la oxidación de dicho sustrato y desde el punto de vista biológico es, todo compuesto que protege los sistemas vivos de los agentes que causan deterioro oxidativo [1]. Los antioxidantes son ampliamente utilizados como ingredientes en suplementos dietéticos con la esperanza de mantener la salud y de prevenir enfermedades tales como el cáncer y la cardiopatía isquémica.

Además de estas aplicaciones en medicina, los antioxidantes tienen muchas aplicaciones industriales tales como conservantes de alimentos, cosméticos y la prevención de la degradación del caucho y la gasolina [2] [3].

La acción de los antioxidantes fue investigada por primera vez cuando fue reconocido que una sustancia con actividad antioxidante se oxida a sí misma fácilmente [4]. Los niveles bajos de antioxidantes o la inhibición de las enzimas antioxidantes causan estrés oxidativo y pueden dañar o matar las células [5].

El estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, es por ello que el uso de antioxidantes en farmacología es estudiado de forma intensiva particularmente como tratamiento para accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas [6]. Sin embargo, se desconoce si el estrés oxidativo es la causa o la consecuencia de tales enfermedades.

Uno de los métodos para evaluar la actividad antioxidante es la decoloración del radical DPPH• (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), desarrollado por Brand-Williams 1995-1996 [7] medida a 517 nm, por acción de un compuesto antioxidante. (DPPH• + Antioxe → DPPH-H + Antioxe•). El ensayo de decoloración está basado en la capacidad, de la sustancia a probar, de capturar el electrón desapareado del radical o de liberar un protón.

El radical DPPH• es un radical nitrogenado orgánico y estable, posee un intenso color púrpura y se encuentra en forma de radical, no necesita generación previa. [8].

Muchas sustancias presentes en los líquenes exaltan el interés en la promoción de la salud, la conservación de alimentos, fármacos y cosméticos entre otros por poseer

una alta actividad antioxidante [9] [10]. Los líquenes son organismos que surgen de la simbiosis entre un hongo llamado micobionte y un alga o cianobacteria llamada ficobionte, son excepcionalmente resistentes a las condiciones ambientales adversas y capaces de colonizar muy diversos ecosistemas.

El objetivo del trabajo fue determinar cuáles especies presentan mayor actividad antioxidante por el método decoloración del radical DPPH•.

Metodología

Obtención de especies:

Los líquenes fueron colectados en el margen occidental del río Bogotá, cuenca alta (N 05° 07' 23,4" W 73° 39' 10,5"), un ejemplar de cada uno fue llevado a la Curadora del Herbario Forestal UDBC-Sección Criptógamas, Grupo Colombiano de Liquenología GCOL, Universidad Distrital Francisco José de Caldas y fueron determinados como: *Everniastrum columbiense*, *Flavopunctelia flaventor*, *Parmotrema simulans*, *Ramalina celastri*, *Telochistes exilis* y *Usnea sp.*,

Obtención de extractos: a los líquenes se les realizó un extracto etanólico total por Soxhlet y extractos consecutivos con diclorometano, acetona y metanol por Soxhlet.

Método de decoloración del radical DPPH*

El radical DPPH• (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132), fue preparado disolviendo 2 mg en 100 mL de metanol [11]. Alícuotas de 0.3 ml de la solución metanólica de cada muestra son añadidas a 0.9 mL de una solución metanólica de radicales libres DPPH•. La reacción monitorea por 10 min con intervalos de 30 segundos, midiendo la absorbancia a 517 nm realizando el mismo procedimiento para el control. Las diluciones evaluadas para los extractos y el patrón (ácido ascórbico), fueron de 250, 125, 25, 2,5 y 0,25 ppm. Se realizó por triplicado y se promedió.

Porcentaje de captación de radicales 50 (IC50): Es calculado mediante la siguiente fórmula [12] [13]: % DPPH = 100 x (A inicial – A final) / (A inicial). El IC50 es

calculado mediante regresión lineal o por medio de la ecuación de la recta de cada muestra o patrón de referencia analizado.

Actividad antioxidante relativa (%AAR), Es calculado mediante la siguiente fórmula [12]: $\%AAR = 100 \times (\text{IC}_{50} \text{ muestra}) / (\text{IC}_{50} \text{ patrón})$, (Tabla 1).

Resultados y Discusión

El método de decolorar el radical DPPH• sobre extractos de líquenes, mostró que el extractos etanólicos totales de *R. celsastri* y *F. flaventor*, el porcentaje de inhibición del radical DPPH• se encontró por encima del 50% a una

concentración de 125 ppm, mientras que los extractos metanólico y diclorometano de *R. celsastri* el porcentaje de inhibición del radical DPPH• se encontró por encima del 50% a 25 ppm. El resto de extractos el porcentaje de inhibición del radical DPPH• estaba por debajo del 50% a concentraciones de 250 ppm.

El %AAR fue calculada usando el IC₅₀ del patrón (ácido ascórbico). (Ver tabla 2), observándose que los extractos etanólicos totales de *R. celsastri* y *F. flaventor*, presentaron Actividad Antioxidante Relativa con respecto al patrón de un 64.6% y 69.8% respectivamente,

Los extractos diclorometano y metanólico de *R. celsastri* | presentaron %AAR de 95.7% y 92.6% respectivamente.

Tabla 1. Porcentaje de captación de radicales DPPH• de extractos de *Everniastrum columbiense*, *Flavopunctelia flaventor*, *Parmotrema simulans*, *Ramalina celsastri*, *Teloschistes exilis* y *Usnea sp.*

Porcentaje de captación de radicales DPPH•						
Especie	Extracto	250 ppm	125 ppm	25 ppm	2.5 ppm	0.25 ppm
<i>F. flaventor</i>	Total etanólico	78,3	62,9	37,9	25,4	23,1
<i>T. exilis</i>	Total etanólico	31,3	29,6	26,2	23,8	22,9
<i>E. columbiense</i>	Diclorometano	32,8	30,9	27,1	24,5	22,5
<i>E. columbiense</i>	Acetona	40,1	32,2	28,9	25,7	25,3
<i>E. columbiense</i>	Metanólico	33,5	30,6	28,7	25,1	21,3
<i>P. simulans</i>	Diclorometano	30,2	28,7	28,4	16,5	13,1
<i>P. simulans</i>	Acetona	36,6	31,3	30,6	24,8	23,8
<i>P. simulans</i>	Metanólico	31,9	30,8	27,0	24,9	22,7
<i>Usnea sp</i>	Diclorometano	28,5	27,7	26,1	19,6	18,3
<i>Usnea sp</i>	Acetona	34,7	31,2	27,0	26,9	21,0
<i>R. celsastri</i>	Diclorometano	95,5	93,8	67,3	33,0	27,9
<i>R. celsastri</i>	Total etanólico	71,3	54,2	31,7	24,0	26,1
<i>R. celsastri</i>	Metanólico	83,5	83,2	71,8	38,3	27,1
Ácido ascórbico	Metanólico	92,6	92,5	92,3	46,7	30,4

Tabla 2. Porcentaje de Actividad Antioxidante Relativa con respecto al ácido ascórbico (%AAR) de extractos de *Everniastrum columbiense*, *Flavopunctelia flaventor*, *Parmotrema simulans*, *Ramalina celastri*, *Teloschistes exilis* y *Usnea sp.*

Porcentaje de actividad antioxidante relativa con respecto al ácido ascórbico (%AAR)				
Especie	Extracto/ fracción	(IC 50)	Log (C50)	(AAR)
<i>F. flaventor</i>	Total etanólico	385	21.3	69.8
<i>T. exilis</i>	Total etanólico	25.7	23.3	46.6
<i>E. columbiense</i>	Diclorometano	26.2	23.5	47.6
<i>E. columbiense</i>	Acetona	28.7	23.9	52.0
<i>E. columbiense</i>	Metanólico	26.3	23.4	47.7
<i>P. simulans</i>	Diclorometano	20.3	15.8	36.8
<i>P. simulans</i>	Acetona	27.8	24.3	50.4
<i>P. simulans</i>	Metanólico	26.2	23.8	47.6
<i>U. sp</i>	Diclorometano	22.3	19.6	40.5
<i>U. sp</i>	Acetona	26.5	23.2	48.1
<i>R. celastri</i>	Diclorometano	52.7	33.0	95.7
<i>R. celastri</i>	Total etanólico	35.6	19.3	64.6
<i>R. celastri</i>	Metanólico	51.0	36.1	92.6

Figura 1. Actividad Antioxidante Relativa de extractos de líquenes con respecto al ácido ascórbico (AAR): *Flavopunctelia flaventor* E. EtOH Total (A), *Teloschistes exilis* E. EtOH Total (B), *Everniastrum columbiense* E. CH₂Cl₂ (C), *Everniastrum columbiense* E. (CH₃)₂CO (D), *Everniastrum columbiense* E. CH₃OH (E), *Parmotrema simulans* E. CH₂Cl₂ (F), *Parmotrema simulans* E. (CH₃)₂CO (G), *Parmotrema simulans* E. CH₃OH (H), *Usnea sp* E. CH₂Cl₂ (I), *Usnea sp* E. (CH₃)₂CO (J), *Ramalina celastri* E. CH₂Cl₂ (K), *Ramalina celastri* E. EtOH Total (L), *Ramalina celastri* E. EtOH Total (M).

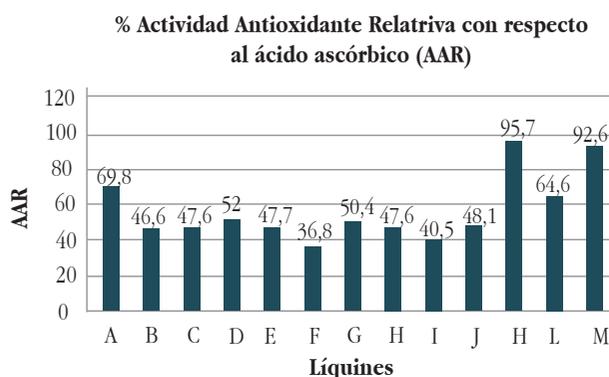
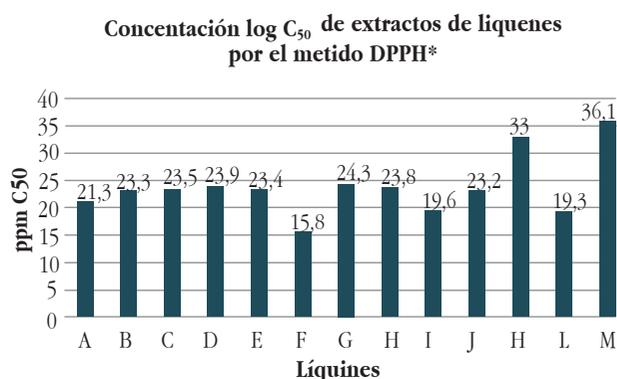


Figura 2. Concentración log C₅₀ de extractos de líquenes por el método DPPH*, *Flavopunctelia flaventor* E. EtOH Total (A), *Teloschistes exilis* E. EtOH Total (B), *Everniastrum columbiense* E. CH₂Cl₂ (C), *Everniastrum columbiense* E. (CH₃)₂CO (D), *Everniastrum columbiense* E. CH₃OH (E), *Parmotrema simulans* E. CH₂Cl₂ (F), *Parmotrema simulans* E. (CH₃)₂CO (G), *Parmotrema simulans* E. CH₃OH (H), *Usnea sp* E. CH₂Cl₂ (I), *Usnea sp* E. (CH₃)₂CO (J), *Ramalina celastri* E. CH₂Cl₂ (K), *Ramalina celastri* E. EtOH Total (L), *Ramalina celastri* E. EtOH Total (M).



Conclusiones

La evaluación de actividad antioxidante de extractos de *Flavopunctelia flaventor* y *Ramalina celastri*, a través del método que utiliza el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH[•]), presentaron de manera significativa actividad antioxidante; lo que no ocurrió con los extractos de *Everniastrum columbiense*, *Parmotrema simulans*, *Teloschistes exilis* y *Usnea sp.* Los extractos de líquenes fueron monitoreados en celda a cinco concentraciones diferentes: 250, 125, 25, 2.5 y 0.25 ppm, encontrando actividades entre el 13.1 y 95.5% de captación de radicales libres; los extractos de *Ramalina celastri* (extractos diclorometano y metanólico) presentaron a 25 ppm % de captación de 67,3 y 71,8 respectivamente y los extractos de *Ramalina celastri* (extracto total etanólico) y *Flavopunctelia flaventor* (extracto total etanólico) presentaron a 125 ppm % de captación de 54.2 y 62,9 respectivamente. A 250 ppm los extractos de *Teloschistes exilis* (extracto total etanólico), *Everniastrum columbiense* (extracto diclorometano, extracto Acetona y extracto Metanólico), *Parmotrema simulans* (extracto diclorometano, extracto Acetona y extracto Metanólico), *Usnea sp* (extracto diclorometano y extracto Acetona) presentaron % de captación inferiores a 40.1, las especies líquenicas *Flavopunctelia flaventor* y *Ramalina celastri* al presentar una actividad antioxidante tan destacada amerita profundizar en la purificación e identificación del o los principios responsable, ya que esta actividad se refiere a la presencia de una o varias sustancias reflejo de su concentración o de sus características químicas.

Agradecimientos

A la facultad de Ingeniería Ambiental de la Universidad el Bosque por el apoyo para el desarrollo de la investigación.

Referencias

- [1] Halliwell B, Gutteridge J.M.C., 2007, Free Radicals in Biology and Medicine. United Kingdom: Oxford University Press. 704 p
- [2] Castro T.N., Dantas M.S., Dantas A.A., D'Ornellas C.V., Queiroz L.R., 2003, Novel antioxidants from cashew nut shell liquid applied to gasoline stabilization, Fuel, V.82, I.12, P. 1465-1469
- [3] Huang D., Ou B., Prior R.L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, J Agric Food Chem, 23;53(6), p.1841-56.
- [4] Moreau and Dufraisse, (1922) Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie, 86, 321.
- [5] Ríos M., 2003, El Estrés Oxidativo y el destino celular, Revista Química Viva, V.2, N.1, p. 1-12 www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar,
- [6] Sies, H. 1997. Oxidative Stress: Oxidant and Antioxidants. Exp. Physiol. 82, (2) p.291-295.
- [7] Armstrong D., 2002, Methods in Molecular Biology. Oxidative stress Biomarkers and Antioxidant Protocols, Vol 186. Humana press Inc. Totowa. New Jersey. p 323
- [8] Prior R.L., Wu, X. and Schaich, K. 2005. Standardized Methods for Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, J. Agric. Food Chem. 53, p. 4290-4302.
- [9] Kosani M., Rankovi B., Stanojkovi T., Ranci A., Manojlovi N., 2014, *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents, IWT - Food Science and Technology 59, 518e525
- [10] Kosanic M. M., Seklic D. S., Markovic S. D., Rankovic B. R., 2014, Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Properties of Selected Lichens from Serbia, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, vol. 9 br. 1, str. 273-287
- [11] Arumugam P., Ramamurthy P.T. Santhiya. S., Ramesh A. 2006 Antioxidant activity measured in different solvent fractions obtained from *Mentha spicata* Linn. An analysis by ABTS. + decolorization assay, Asia Pac J Clin Nutr., p. 119-124
- [12] Parcker Lester. 1999, Methods in Enzimology. Oxidants and antioxidants, Part A. Academic Press, London. Vol. 299, p. 379- 389
- [13] Roginsky V, Lissi E.A. 2005, Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, Food Chemistry 92, p. 235- 254

Los Autores



Oscar E. Rodríguez A

Lic. Química y Biología Universidad INCCA de Colombia (1985), Magister en Biología, Pontificia Universidad Javeriana (1991), Doctor en Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Javeriana (2008).



Fabio E. Díaz L

Ingeniero Químico Universidad Nacional de Colombia (1998), Especialista en Docencia Universitaria Universidad El Bosque (2006), Magister en Ingeniería Civil área de Ingeniería Ambiental Universidad de Los Andes (2002).



William A. Andrade B

Ingeniero Químico, Universidad Nacional de Colombia (1995), Especialista en Educación Ambiental Universidad El Bosque (1998), Especialista en Docencia Universitaria, Universidad El Bosque (2004), candidato a Maestría en Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Javeriana (2015).



Bibiana Moncada C

Lic. En Biología Universidad Distrital Francisco José de Caldas (1998), Magister en Ciencias Universidad Nacional de Colombia (2005), Doctora en Ciencias Universidad Nacional de Colombia (2012).