

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**División de Ciencias Forestales**

**Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y  
ANTIBACTERIANA DE *Pilotrichella flexilis* (Hedw.) Angstr.**

**TESIS**

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES**

PRESENTA:

**BIOL. CINTHIA MEJÍA LARA**



DIRECCION GENERAL ACADÉMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
ORIGINA DE EXAMENES PROFESIONALES

DIRECTOR:

**DR. HOLBER ZULETA PRADA**

Chapingo, Estado de México, Marzo 2018



2018

**ESTUDIO FITOQUÍMICO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA  
DE *Pilotrichella flexilis***

Tesis realizada por **Cinthia Mejia Lara**, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES**

DIRECTOR:



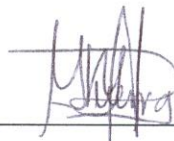
DR. HOLBER ZULETA PRADA

ASESOR:



DR. BENITO REYES TREJO

ASESORA:



DRA. DIANA GUERRA RAMÍREZ

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE CUADROS .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE ANEXOS .....</b>	<b>5</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>6</b>
<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>7</b>
<b>DATOS BIOGRÁFICOS.....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN GENERAL .....</b>	<b>9</b>
<b>GENERAL ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
1.1 Objetivos .....	13
1.1.1 Objetivo General.....	13
1.1.2 Objetivos particulares .....	13
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 Briófitas .....	14
2.2 Bryophyta (Musgo) .....	15
2.2.1 Pilotrichella flexilis (Hedw.) Angstr. ....	17
2.1 Fitoquímica.....	21
2.1 Capacidad Antioxidante.....	23
2.1 Actividad Antibacteriana .....	25
2.1 Referencias .....	26
<b>3. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE <i>Pilotrichella flexilis</i>.....</b>	<b>31</b>
3.1 Resumen .....	31
3.2 Abstract .....	32
3.3 Introducción.....	33
3.4 Materiales y Métodos .....	34
3.4.1 Obtención del material vegetal.....	34
3.4.2 Preparación de extractos .....	34
3.4.3 Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios .....	36
3.4.4 Análisis espectroscópico de los productos aislados .....	36
3.4.5 Caracterización completa del Lup-20(29)-eno (1).....	37
3.4.6 $\beta$ -sitosterol y Stigmasterol.....	42

3.5	Conclusiones.....	46
3.6	Referencias .....	46
<b>4.</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE CUATRO EXTRACTOS DE <i>Pilotrichella flexilis</i> (Hedw.) Angstr.....</b>	<b>48</b>
4.1	Resumen.....	48
4.2	Abstract .....	49
4.3	Introducción.....	50
4.4	Materiales y Métodos .....	52
4.4.1	Equipo.....	52
4.4.2	Reactivos .....	52
4.4.3	Material Vegetal .....	53
4.4.4	Actividad Antioxidante.....	53
4.4.5	Análisis estadístico .....	56
4.5	Resultados y Discusión .....	56
4.1	Conclusiones.....	62
4.2	Referencias .....	62
<b>5.</b>	<b>ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA <i>in vitro</i> DE LOS EXTRACTOS DE <i>P. flexilis</i> (Hedw.) Angstr. ....</b>	<b>66</b>
5.1	Resumen.....	66
5.2	Abstract .....	67
5.3	Introducción.....	68
5.4	Materiales y Métodos .....	69
5.4.1	Obtención del material vegetal.....	69
5.4.2	Preparación de los extractos.....	70
5.4.3	Suceptibilidad bacteriana por método colorimétrico usando Cloruro de 2,3,5.trifeniltetrazolio (TTC).....	70
5.4.4	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	72
5.4.5	Análisis Estadístico .....	72
5.5	Resultados .....	73
5.5.1	Actividad Antibacteriana .....	73
5.5.2	Concentración Mínima Inhibitoria.....	76
5.6	Discusión.....	78
5.7	Conclusiones.....	80

5.8 Referencias .....	80
-----------------------	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Clasificación de acuerdo con Troitsky et al. (2007). .....	16
Figura 2.2 Distribución de <i>P. flexilis</i> en México. ....	19
Figura 2.3 <i>Pilotrichella flexilis</i> . Ilustrador: Eliana Calzadilla (USZ) Trópicos 2017. A. Hábitat. B. Filidios (4). C. Células superiores y medias del filidio. D. Células alares del filidio (basal). E. Esporofito. ....	20
Figura 3.1 Esquema general de partición del extracto metanolico. ....	35
Figura 3.2 Compuestos aislados del extracto hexánico <i>P. flexilis</i> .....	37
Figura 3.3 Estructura propuesta para el compuesto 1 .....	38
Figura 3.4 Espectro de <sup>1</sup> H RMN de Lup-20(29)-eno.....	39
Figura 3.5 Espectros de <sup>13</sup> C RMN, DEPT procesados en la asignación de Lup-20(29)-eno .....	40
Figura 3.6 Espectros de Masas de Lup-20(29)-eno .....	42
Figura 3.7 CCD de la mezcla β-sitosterol y estigmasterol .....	44
Figura 3.8 Espectro <sup>1</sup> H RMN de β-sitosterol.....	44
Figura 4.1 Contenido Total de Fenoles y Flavonoides en los extractos de <i>P. flexilis</i> . ...	58
Figura 4.2 Comparaciones del contenido equivalente a TROLOX para los extractos estudiados. ....	60
Figura 4.3 Valores de CI <sub>50</sub> (mg/mL) de la actividad de los diferentes extractos para DPPH. (los valores del CI <sub>50</sub> se calcularon del análisis por regresión lineal). ....	61
Figura 5.1 Lugar de colecta. Zacualtipán de Ángeles. Estado de Hidalgo .....	69
Figura 5.2 Arreglo experimental del efecto antibacteriano. ....	71
Figura 5.3 Ensayo de los extractos sobre <i>Clavibacter</i> después de adicionar TTC.....	71
Figura 5.4 Promedios de formazan formado medido a una absorbancia de 540 nm, después del tratamiento sobre la bacteria <i>C. michiganensis</i> .....	73
Figura 5.5 Promedios de formazan formado medido a una absorbancia de 540 nm, después del tratamiento sobre la bacteria <i>Xanthomonas</i> spp. ....	74

Figura 5.6 Promedios de formazan formado medido a una absorbancia de 540 nm, después del tratamiento sobre la bacteria <i>E. coli</i> .....	75
Figura 5.7 Promedios de formazan formado medido a una absorbancia de 540 nm, después del tratamiento sobre la bacteria <i>M. luteus</i> .....	76
Figura 5.8 Microdilución en caldo para la determinación de CMI para C. del CMI sobre las bacterias <i>C. michiganensis</i> y <i>Xanthomonas</i> spp. ....	77
Figura 5.9 Microdilución en caldo para la determinación CMI para sobre las bacterias <i>E. coli</i> y <i>M. luteus</i> .....	78

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1 Biflavonoides aislados del género <i>Pilotrichella</i> .....	22
Cuadro 3.1 Datos de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz) y <sup>13</sup> C (100 MHz) del Lupeno .....	41
Cuadro 4.1 Cuantificación de la capacidad antioxidante con respecto a las pruebas ...	57
Cuadro 4.2 Correlación de Pearson entre los Fenoles y Flavonoides analizados y su actividad antioxidante (P=<0.001). ....	62

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Espectro COSY del compuesto 1 .....	83
Anexo 2 Espectro HSQC del compuesto 1 .....	84
Anexo 3 Espectro HMBC del compuesto 1 .....	84

## DEDICATORIA

A Felipa Ortiz Contreras con cariño y admiración a ti porque tu fuerza y tu amor me han dirigido por la vida y me han dado las alas que necesitaba para volar.



Muscinae  
Obra de Haeckel

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, y en particular al programa de Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales por brindarme la oportunidad de obtener un grado más.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por otorgarme la beca de estudios para la realización de mis estudios de la maestría, con la ayuda otorgada hizo posible cumplir los objetivos.

Al **Dr. Holber Zuleta Prada**, por compartir sus conocimientos y lo más importante por su extraordinaria disponibilidad para aclarar dudas, sus valiosas sugerencias en la investigación y antemano agradecer la dirección de la tesis.

Al **Dr. Benito Reyes Trejo** por la disponibilidad para realizar mejoras en el trabajo de investigación, sus comentarios constructivos ayudaron afinar detalles.

A la **Dra. Diana Guerra Ramírez**, por su ayuda en la obtención de los datos necesarios, además, por su disponibilidad y aporte de ideas para el desarrollo de la presente investigación.

A la **M. en C Priscila Guerra Ramírez** por sus conocimientos y participación en la actividad antibacteriana y sin ella esto no hubiera sido posible.

A la **Dra. Amparo Máxima Borja de la Rosa**, por todas atenciones y apoyo durante mi formación en la maestría.

A Magaly por todo el apoyo brindado, por su amistad.

A Margarito Maldonado Ortiz por ser un gran amigo y por sus valiosas sugerencias.

A mis amigos por los momentos compartidos.



## **DATOS BIOGRÁFICOS**

### **Datos personales**

Nombre: Cinthia Mejía Lara

Fecha de nacimiento: 03 de diciembre de 1991

Lugar de nacimiento: Ixmiquilpan, Hidalgo

CURP: MELC911203MHGJRN03

Profesión: Lic. En Biología

Cédula profesional: 9352986

### **Desarrollo académico**

Preparatoria Federal por Cooperación “Dr. José María Luis Mora” 2006-2009.

Universidad: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo 2009-2013

## RESUMEN GENERAL

### ESTUDIO FITOQUÍMICO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE *Pilotrichella flexilis* (Hedw.) Angstr.

En investigaciones recientes sobre briofitas, se han encontrado sustancias con alta actividad biológica. Los objetivos de este trabajo fueron aislar e identificar metabolitos secundarios del extracto hexánico y evaluar las propiedades antioxidantes (*in vitro*) y antimicrobianas de extractos de diferente polaridad de *Pilotrichella flexilis*, con el fin de tener un primer acercamiento sobre el tipo de sustancias y el potencial farmacológico de esta especie. La colecta del musgo se hizo en la localidad de La Mojonera, Zacualtipán de Ángeles, Hidalgo. El extracto metanólico de *P. flexilis*, fue fraccionado por extracción líq-líq en disolventes de diferente polaridad para obtener los extractos hexánico, de acetato de etilo y acuoso. El extracto hexánico fue separado por CC y las fracciones obtenidas fueron monitoreadas por CCD. Las fracciones aisladas se estudiaron por técnicas espectroscópicas de IR, <sup>1</sup>H RMN <sup>13</sup>C RMN, DEPT, COSY HMBC, HSQC y por EM. Las propiedades antioxidantes fueron evaluadas en los extractos acuoso, metanólico, de AcOEt y hexánico, mediante la cuantificación de fenoles y flavonoides totales y la evaluación de la capacidad antioxidantes por los ensayos DPPH, FRAP y ABTS. La actividad antimicrobiana de los extractos se evaluó sobre *Clavibacter michiganensis* (+), *Xanthomonas* spp (+), *Escherichia coli* (-) y *Micrococcus luteus* (+) por el método de microdilución usando TTC como indicador de viabilidad. Del extracto hexánico se aislaron e identificaron: Lup-20(29)-eno y una mezcla de β-sitosterol y estigmasterol. El extracto de acetato de etilo presentó el mayor contenido de fenoles y flavonoides totales (274 ± 19.00 mg EAG/g<sub>ext</sub> y 104.45 ± 0.47 mg EC/g<sub>ext</sub> respectivamente) así como la mayor capacidad antioxidante por los tres ensayos DPPH, FRAP, ABTS (765.94 ± 31.95, 331.01 ± 22.52 y 832.01 ± 21.37 μmol ET/g<sub>ext</sub>, respectivamente). Los extractos de AcOEt y metanólico presentaron actividad antimicrobiana a una concentración de 3.75 mg/mL, sobre *Xanthomonas*. Mientras que el extracto metanólico (3.75 mg/mL) también inhibió el crecimiento de *C. michiganensis*, *E. coli* y *M. luteus*. Los resultados muestran que *P. flexilis* contiene una diversidad de compuestos que pueden ser utilizados como antioxidantes naturales y agentes antimicrobianos para el control de diversas enfermedades humanas, animales y vegetales.

**Palabras clave:** Musgo, Fitoquímica, capacidad antioxidant, antibacterial activity, *Pilotrichella felxilis*.

---

Tesis: Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo.  
Autor: Cinthia Mejía Lara  
Director de Tesis: Dr. Holber Zuleta Prada

## GENERAL ABSTRACT

### PHYTOCHEMICAL STUDY, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Pilotrichella flexilis* (Hedw.) Angstr.

In recent research on bryophytes, substances with high biological activity have been found. The objectives of this work were to isolate and identify secondary metabolites of the hexane extract and evaluate the antioxidant (in vitro) and antimicrobial properties of different polarity extracts of *Pilotrichella flexilis*, in order to have a first approach on the type of substances and the potential pharmacological of this species. The collection of moss was made in the town of La Mojonera, Zacualtipán de Ángeles, Hidalgo. The methanolic extract of *P. flexilis* was fractionated by liq-liq extraction in solvents of different polarity to obtain the hexane, ethyl acetate (AcOEt) and aqueous extracts. The hexane extract was separated by CC and the fractions obtained were monitored by CCD. The isolated fractions were studied by IR, <sup>1</sup>H RMN and <sup>13</sup>C RMN, DEPT, COSY HMBC, HSQC and EM. The antioxidant properties were evaluated in the aqueous, methanolic, AcOEt and hexane extracts, by quantification of phenols and total flavonoids and the evaluation of antioxidant capacity by the DPPH, FRAP and ABTS assays. The antimicrobial activity of the extracts was evaluated on *Clavibacter michiganensis* (+), *Xanthomonas* spp (+), *Escherichia coli* (-) and *Micrococcus luteus* (+) by the microdilution method using TTC as an indicator of viability. From the hexane extract were isolated and identified: Lup-20 (29)-eno and a mixture of β-sitosterol and stigmasterol. The ethyl acetate extract had the highest total phenol and flavonoid content (274 ± 19.00 mg EAG / gext and 104.45 ± 0.47 mg EC / gext respectively) as well as the highest antioxidant capacity by the three DPPH, FRAP, ABTS assays (765.94 ± 31.95, 331.01 ± 22.52 and 832.01 ± 21.37 μmol ET / gext, respectively). The AcOEt and methanolic extracts showed antimicrobial activity at a concentration of 3.75 mg / mL, on *Xanthomonas*. While the methanolic extract (3.75 mg / mL) also inhibited the growth of *C. michiganensis*, *E. coli* and *M. luteus*. The results show that *P. flexilis* contains a variety of compounds that can be used as natural antioxidants and antimicrobial agents for the control of various human, animal and plant diseases.

**Key Words:** Moss, Phytochemistry, antioxidant activity, antibacterial, antibacteriana, *Pilotrichella felxilis*.

---

Thesis: Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo.  
Author: Cinthia Mejía Lara  
Advisor: Dr. Holber Zuleta Prada

# 1. INTRODUCCIÓN

Durante tiempos inmemoriales el hombre ha usado los recursos naturales para abastecer sus necesidades día a día, las plantas han sido un recurso importante para contrarrestar las enfermedades que el hombre ha desarrollado a lo largo del tiempo. Civilizaciones antiguas como: Mesopotámicos, Egipcios, Chinos, Griegos, Romanos, incluyen una lista de plantas diversas para el uso medicinal tradicional, que aún en día se utilizan en múltiples tratamientos, esto ha llevado al interés de estudios extensivos como fuentes de metabolitos secundarios, así como el desarrollo de fármacos de los productos naturales, pues son fuente de la mayoría de los compuestos activos en la industria farmacéutica, ya que poseen actividades biológicas altamente selectivas y específicas (Cragg & Newman, 2013).

Las propiedades medicinales que poseen las plantas se debe a que experimentan diversas presiones ambientales a lo largo de su desarrollo, esto ocasiona un estrés y en respuesta, se desencadena una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos (metabolitos secundarios) y moleculares generando efectos alérgicos, citotóxicos, citostáticos, cardiotónicos, carcinogénicos, antiinflamatorios, antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, antidepredación. Entre las fuentes de metabolitos se encuentran las plantas superiores, inferiores, organismos marinos, animales y artrópodos (Cordell, Beecher, & Pezzuto, 1991; Shu, 1998).

Entre el 5 y 15% de la diversidad vegetal (250,000 - 400, 000 especies) se ha estudiado, por lo que se sugiere que todavía son una fuente de productos naturales novedosos. En la búsqueda de nuevos compuestos existe un amplio campo de estudio en el grupo de las plantas más basales las briófitas (hepáticas, antoceros y musgos), las cuales son plantas inferiores muy antiguas, se encuentran distribuidas ampliamente en el mundo. Son un grupo parafilético que forman tres linajes diferenciados: Musgos [Div. Bryophyta, (*sensu stricto*)], Hepáticas (Div. Hepatophyta) y Antoceros (Div. Anthocerophyta) (Gradstein, 2001).

Las briófitas son considerados el segundo grupo más grande de plantas después de las angiospermas, representados con aproximadamente 24,000 especies; Bryophyta

(14,000 especies), Marchantiophyta (6000 especies) y Athocerophyta (300 especies) (Asakawa, Ludwiczuk, & Nagashima, 2013).

Los estudios más relevantes en briófitas son taxonómicos y sistemáticos, recientemente se han derivado estudios como atrapadores de metales pesados, el papel que desempeñan ecológicamente en los bosques, también ha despertado el interés sobre su composición química y los efectos que estos pueden ofrecer (Asakawa & Ludwiczuk, 2013; Gradstein, 2001).

Se ha comprobado la bioactividad de extractos crudos y compuestos aislados de las briófitas considerando su aroma característico, acritud y amargura, dermatitis alérgica de contacto, citotoxicidad, actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral. Así como insecticida y antiparasitos, actividad inhibitoria de la liberación de superóxido, lipoxigenasa, calmodulina, hialuronidasa, ciclooxigenasa, ADN polimerasa  $\beta$  y  $\alpha$ -glucosidasa, actividad neurotrófica, miorelajante y actividad inhibitoria del calcio, cardiotónico y antagonista de la vasopresina (VP), inhibición de la producción de óxido nítrico, actividad inhibitoria del crecimiento vegetal, inhibición de la polimerización de la tubulina, vasorelajación, lo que promete altas propiedades biológicas (Asakawa & Ludwiczuk, 2013).

Aunque existen numerosos trabajos fitoquímicos, de actividad antibacteriana y antioxidantes en plantas superiores, en el caso de los musgos, por su complejidad para la identificación, morfología muy pequeña y su dificultad para coleccionar, se registran pocos trabajos con respecto al número de especies, que determinen la fitoquímica, su actividad biológica y antioxidante (Asakawa et al., 2013a; Klavina et al., 2015).

De acuerdo con lo anterior en este trabajo se planteó, el estudio fitoquímico de *Pilotrichella flexilis* un musgo distribuido en el estado de Hidalgo, se pretendió la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios y la evaluación de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo General

Aislar e identificar metabolitos secundarios del extracto hexánico de *Pilotrichella flexilis* y evaluar sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas de cuatro extractos por métodos convencionales, para explorar su potencial farmacológico.

### 1.1.2 Objetivos particulares

- Preparar el extracto metanólico de *P. flexilis* y particionarlo para obtener extractos de hexano, acetato de etilo y acuoso
- Aislar los compuestos del extracto hexánico por cromatografía de columna y cromatografía de capa delgada.
- Caracterización de los compuestos aislados por técnicas espectroscópicas (UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR y EM).
- Determinar las propiedades antioxidantes de extractos de *P. flexilis* mediante la cuantificación de fenoles y flavonoides totales y la capacidad antioxidante por los ensayos DPPH, FRAP y ABTS.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos (acuoso, metanol, acetato de etilo, hexano) sobre las bacterias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas* sp, *Escherichia coli* K12, *Listeria innocua* ATCC33090, *Micrococcus luteus* CDBB1018 mediante un ensayo colorimétrico.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Briófitas

El interés en briófitas ha sufrido un resurgimiento en la última década. Este renovado enfoque en los musgos, hepáticas y antoceros, ha convergido desde diversos puntos dentro de la comunidad científica. Estudios indican que éstos son el segundo grupo más grande de plantas de la tierra después de angiospermas (Marko, Aneta, & Dragoljub, 2001).

Las briófitas se encuentran en todo el mundo, excepto en el mar, crecen en tierra mojada o en rocas, en los troncos de los árboles, en los lagos y ríos, e incluso en zonas gélidas. Los briófitas se colocan taxonómicamente entre las algas y el pteridófitos. Hay alrededor de 23 000 especies en todo el mundo, y se dividen en tres phyla, Bryophyta (musgos; 14 000 especies), Marchantiophyta (hepáticas; 6000 especies), y Anthocerotophyta (hornworts; 300 especies) (Asakawa & Ludwiczuk, 2013; Hallingbäck & Hodgetts, 2000)

Las briófitas desempeñan un papel notable en el mantenimiento de los ecosistemas porque proporcionan un sistema de amortiguación importante para otras plantas. Estas plantas son menos conocidas por la mayoría de las personas debido al pequeño tamaño, por lo tanto, la menor cantidad de biomasa en estas plantas las vuelve poco atractivas para su uso (Harris, 2008).

El uso de briófitas es variado por ejemplo: En el embalaje, para artículos frágiles; para las plantas que necesitan ser comerciadas, los musgos al tener un alto reservorio de humedad, sirven perfectamente el transporte de estas. Son usados como especies indicadoras del ambiente, controlan la erosión, se les considera como buenos fijadores de nitrógeno, son bioindicadores de metales pesados, bioindicadores acuáticos, indicadores de la radiactividad. También son usados para la fabrica de muebles como material para las camas y vestimenta al igual que en la construcción de viviendas. Estudios biotecnológicos han mostrado que los musgos son fuente de buenos combustibles naturales. Dependen de la síntesis de metabolitos secundarios para su supervivencia. Tienen propiedades medicinales y muy pocos son fuentes alimenticias, en

la industria se usan como tratamientos de residuos, en la agricultura para el acondicionamiento y cultivo de suelos, así como sustrato para plantulas en invernaderos (Glime, 2007; Saxena, 2004). La utilidad medicinal de los compuestos obtenidos de briófitas se manifiesta ampliamente como antibacteriano, antifúngico, citotóxico, antitumoral e insecticida (Asakawa, 2007; Üçüncü, Cansu, Özdemir, Karaoğlu, & Yayli, 2010) el hallazgo fitoquímico de briófitas exhiben una mayor gama de compuestos activos como carbohidratos, lípidos, proteínas, esteroides, polifenoles, terpenoides, ácidos orgánicos, alcoholes de azúcar, ácidos grasos, compuestos alifáticos, acetogeninas, fenilquinonas, y sustancias aromáticas y fenólicas que muestran significativa bioactividad.

## **2.2 Bryophyta (Musgo)**

Los musgos, el grupo más diverso de las briófitas cuenta con más de 10,000 especies en el mundo, México enlista 983 especies mientras que en el estado de Hidalgo se encuentran 420 especies y variedades (Delgadillo, Villaseñor, Cárdenas, & Ortiz, 2014). Son organismos pequeños, tienen un ciclo de vida de alternancia de generaciones: gametofito dominante (haploide) y esporofito dependiente (diploide), son pluricelulares, pueden ser o no ramificados, tienen rizoides, son exclusivamente foliados (Goffinet, Buck, & Shaw, 2009; Vanderpoorten & Goffinet, 2009).

La división se clasifica en ocho clases (Fig. 2.1), Bryopsida es la clase más abundante, la mayoría de las especies se encuentran en esta clase (Troitsky, Ignatov, Bobrova, & Milyutina, 2007)



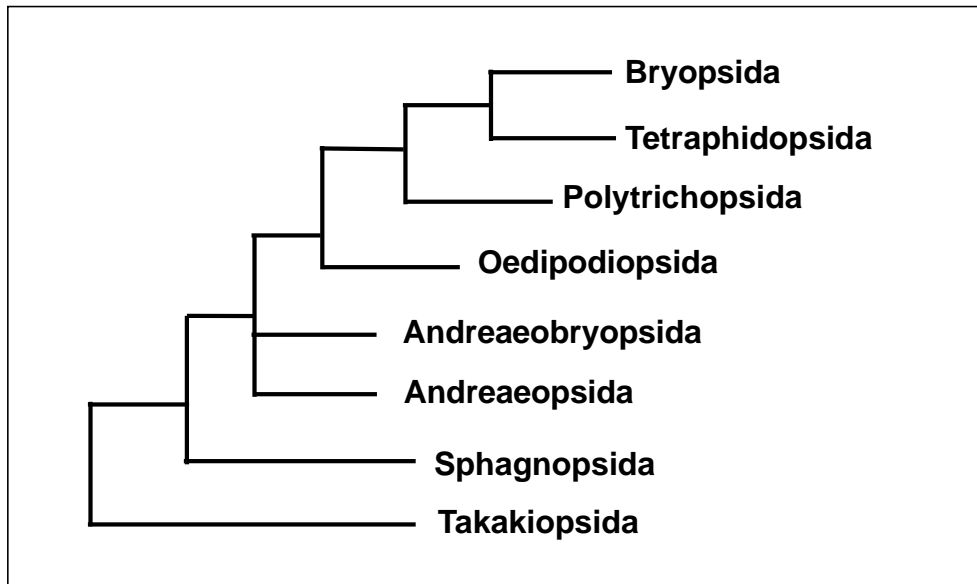


Figura 2.1 Clasificación de acuerdo con Troitsky et al. (2007).

La familia *Lembophyllaceae*. Broth. dentro de la clase Bryopsida, comprende aproximadamente 12 géneros, de ellos el género *Pilotrichella*, al que pertenece la especie del presente estudio, son plantas pleurocárpicas, de pequeñas a grandes, delgadas o robustas, que forman alfombrillas más o menos laxas o tramas, verdes, verdosas, amarillentas, parduscas o de un pardo rojizo, ocasionalmente brillantes. Con un crecimiento péndulo, estípite frondoso (Sharp, Crum, & Eckel, 1994).

El género se identifica por tener ramas delgadas a gruesas, en masas largas y colgantes, brillantes, amarillentas o de color marrón rojizo, a veces teñidas de negro. Ramas secundarias largas-flexuosas, pinnadas irregulares, tallos y hojas ramificadas similares, imbricadas para extenderse, a menudo con forma de espiral, profundamente cóncavas, lisas ampliamente oblongas a panduriformes, abruptamente apiculadas; márgenes inflexos en la parte superior, margen superior entero o serrulado; costa corta y doble o ausente; células romboidales a lineales, lisas, células basales más cortas, distintas o particularmente diferenciadas en las regiones alares. Seta corta; cápsulas exertas, oblongas-ovoides: diente-exostoma papiloso. Caliptra cucullate, escasamente pelosa (Sharp et al., 1994).

En el país solo existen dos especies del género: *Pilotrichella flexilis* y *Pilotrichella rigida* (Sharp et al., 1994).

## 2.2.1 *Pilotrichella flexilis* (Hedw.) Angstr.

### 2.2.1.1 Clasificación Botánica.

Reino: Plantae

División: Bryophyta

Class: *Bryopsida*

Subclase: *Bryidae* Engl.

Superorder hypnae

Orden: *hypnales*

Familia: *Lembophyllaceae*

Género: *Pilotrichella* (Mull. Hal.) Besch.

Epíteto específico: *flexilis*

Autor: (Hedw.) Angstr.

Especie: *Pilotrichella flexilis*

(Goffinet et al., 2009)

### 2.2.1.2 Sinónimos

\*\**Pilotrichum flexile* (Hedw.) Müll. Hal.

*Hookeria flexilis* (Hedw.) Sm.

*Hypnum flexile* (Hedw.) Sw. ex Brid.

*Hypnum thunbergii* Brid.

*Isothecium flexile* (Hedw.) Brid.

*Leskea flexilis* Hedw.

*Meteorium flexile* (Hedw.) Mitt.

*Meteorium orbifolium* Mitt.

*Neckera cochlearifolia* Müll. Hal.

*Neckera flexilis* (Hedw.) Müll. Hal.

*Neckera turgescens* Müll. Hal.

*Pilotrichella araucarieti* Müll. Hal.

*Pilotrichella araucarieti* var. *crassicaulis*  
Müll. Hal.

*Pilotrichella cochlearifolia* var. *flagellifera*  
Besch.

*Pilotrichella erecto-mucronata* Müll. Hal.  
ex Paris

*Pilotrichella eroso-mucronata* Müll. Hal.

*Pilotrichella flagellifera* Besch.

*Pilotrichella flexilis* var. *robusta* Broth.

*Pilotrichella pallidicaulis* Müll. Hal.

*Pilotrichella perrobusta* P. de la Varde

*Pilotrichella recurvo-mucronata* Müll. Hal.

*Pilotrichella rigens* Cardot

*Pilotrichella sediramea* Müll. Hal.

*Pilotrichella squarrulosa* Müll. Hal.

*Pilotrichum circinatum* Schimp.

*Pilotrichum cochlearifolium* Müll. Hal.

*Pilotrichum turgidum* Müll. Hal.

*Pterobryopsis subcochlearifolia* Thér.  
(Trópicos, 2017)

### 2.2.1.3 Descripción

Es un musgo pleurocárpico, crece en ambientes con alta humedad, de hábito epifito en su mayoría, ha sido usado en estudios ecológicos, atmosféricos y contaminación del ambiente (Mazzoni, Lanzer, Bordin, Schäfer, & Wasum, 2012).

Se considera una especie de amplia distribución a nivel mundial, en altas elevaciones, en México se distribuye en los estados de Chiapas, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz (Fig. 2.2) (Trópicos, 2017; Sharp *et al.*, 1994).

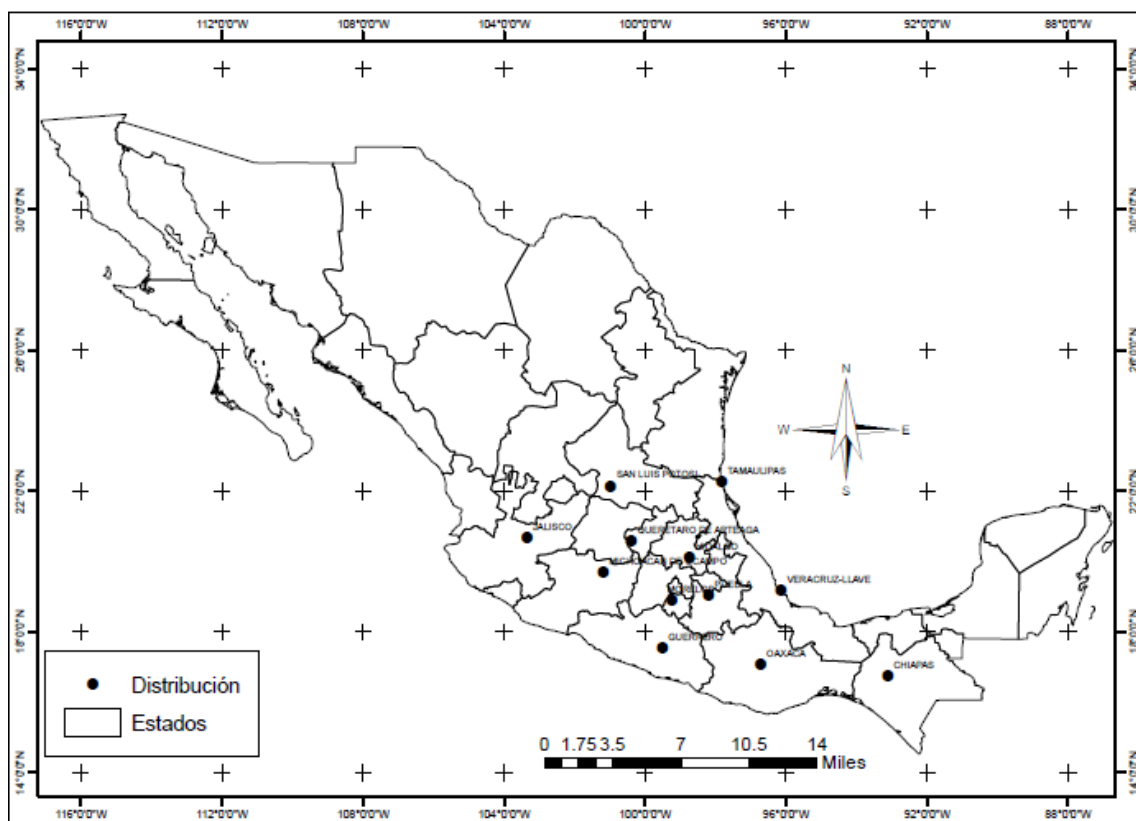


Figura 2.2 Distribución de *P. flexilis* en México.

Crece en masas colgantes; son de color verde-amarillosas o rojizas y prosperan en sustratos variados a diversas alturas.

Plantas robustas, de color verde pálido a amarillento o marrón rojizo, algunas de color negruzco. Tallos secundarios de hasta 30 cm de largo. Hojas del tallo holgadamente imbricadas para extenderse, 1.2-2 x 0.6-1mm, cuculato-cóncavo, ampliamente oblongo-

ovadas, auriculadas en ángulos basales; márgenes enteros; células apicales 4-11 X 1.5-4  $\mu\text{m}$ ; células medianas 11-21 X 1.5-2.5  $\mu\text{m}$ ; células basales perforadas, 7-20 X 3-5  $\mu\text{m}$ ; células alares cuadradas de pared gruesa, y de color marrón amarillento, las células de las aurículas son lineales, 9-18 X 1-1.5  $\mu\text{m}$ . Ramas, hasta 5 cm de largo. Hojas de la rama 1-2.5 X 0.5-1.2 mm; células apicales 4-13 X 1.5-4  $\mu\text{m}$ ; células medianas 9-25 x 1.5-2.5  $\mu\text{m}$ ; células basales 5- 20 x 1.5-4  $\mu\text{m}$ ; células auriculares 5-18 x 1-1.5  $\mu\text{m}$ . Seta de 5-11 mm de largo, rugosas arriba; cápsulas de 1.5 mm de largo (Fig.2.3) (Sharp *et al.*, 1994).

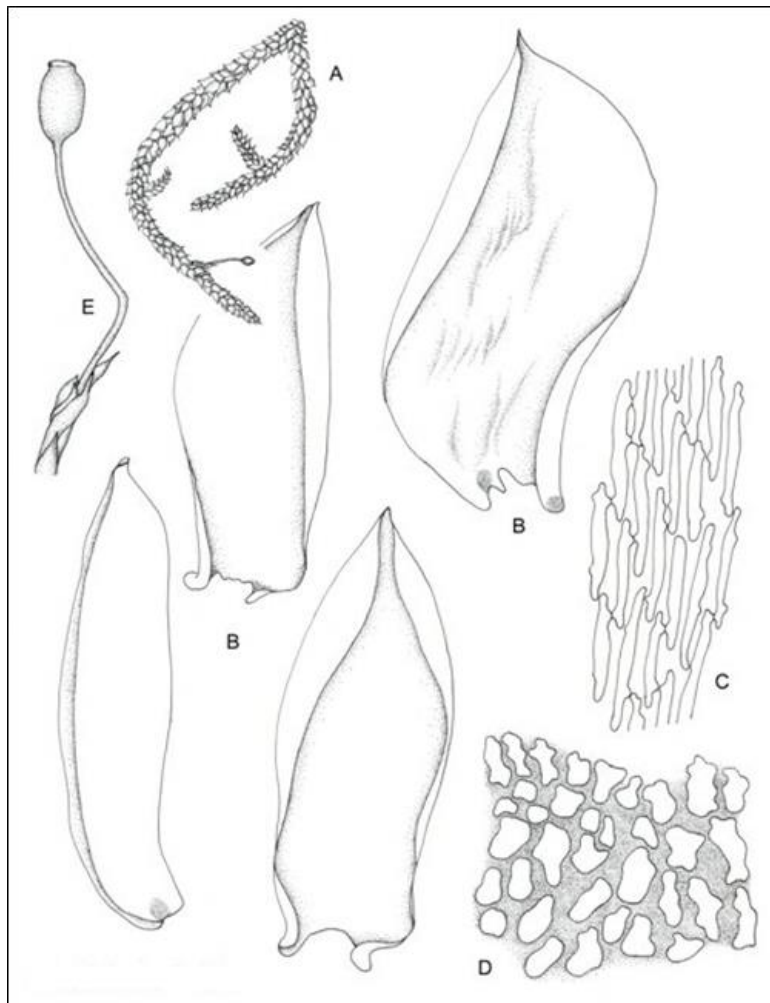


Figura 2.3 *Pilotrichella flexilis*. Ilustrador: Eliana Calzadilla (USZ) Trópicos 2017. A. Hábitat. B. Filidios (4). C. Células superiores y medias del filidio. D. Células alares del filidio (basal). E. Esporofito.

## 2.1 Fitoquímica

El estudio de los productos químicos o metabolitos secundarios que producen o forman parte de la estructura de las plantas es el objeto de la fitoquímica. Los metabolitos secundarios o productos naturales cambian de acuerdo con la especie que los sintetiza, varían entre grupos taxonómicos, brindando singularidad a cada especie y están relacionados principalmente con sistemas de defensa (Asakawa, 2007; Sanabria, 1983).

Numerosos compuestos se han aislado, purificado y estudiado su estructura química. Importantes productos naturales como quinina, teofilina, penicilina, morfina, paclitaxel, digoxina, vincristina, actualmente siguen siendo usados en la industria farmacéutica, dado el aumento de la demanda, se ha recurrido a la síntesis orgánica para abastecer las necesidades (Clark, 1996).

La primera publicación de química en briófitas fue de Lohmann (1903) quien reportó la presencia de aceites esenciales en los cuerpos olíferos de hepáticas, iniciando así la línea en un grupo fitoquímicamente desconocido, el trabajo continuó en hepáticas; aproximadamente 60 años después, se reportaron flavonoides para varias especies del género *Bryum* Hedw. (Bryophyta) (Bendz, Martensson & Terenius, 1962).

Asakawa & Ludwiczuk (2013) y Mues (2000) hacen una revisión de la última década sobre los compuestos aislados en las briófitas, las hepáticas son el grupo más estudiado, a pesar de que los musgos son el grupo más diverso de las briofitas, se ubican en segundo lugar comparado con las hepáticas, finalmente los antoceros tienen muy pocos estudios registrados acerca de su composición química.

Mues (2000) y Sabovljević et al. (2016) mencionan varios tipos de compuestos identificados en estudios fitoquímicos para briófitas, como lo son: oligo y polisacáridos, terpenoides, compuestos aromáticos, sustancias nitrogenadas, compuestos azufrados, clorados y hormonas.

Una de las familias de metabolitos secundarios que se han identificado en los tres grupos son los terpenos. En hepáticas aparecen en mayor abundancia: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y esteroides y en menor cantidad sesquiterpenos, triterpenos

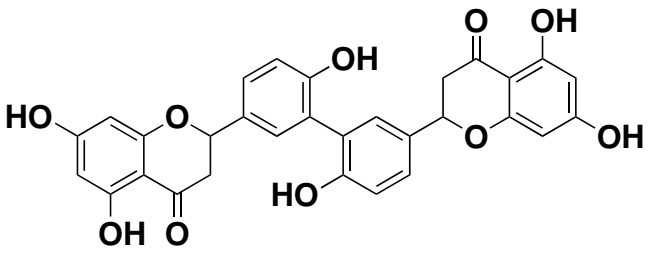
y esteroides. En el caso de los musgos estas dos últimas clases de terpenos son más abundantes. Mientras que en antoceros solo existe evidencia de triterpenos y tetraterpenos (Mues, 2000).

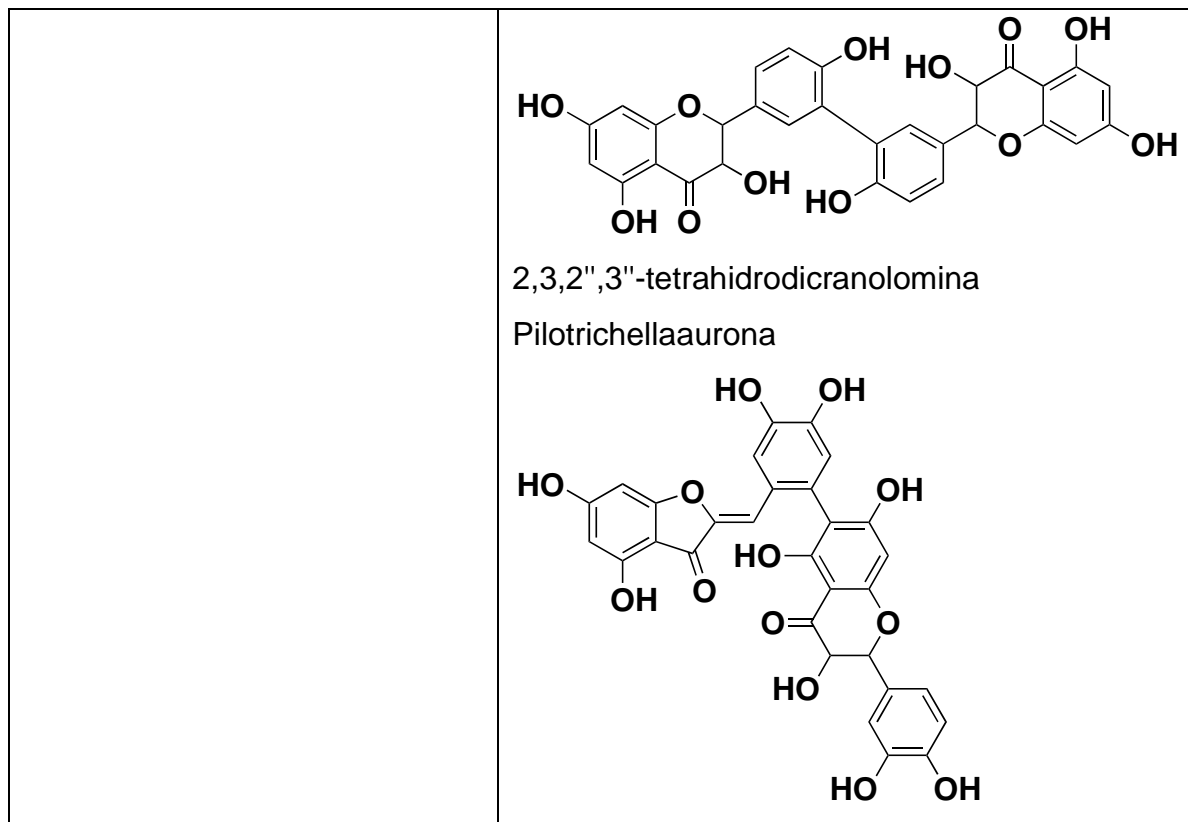
Compuestos aromáticos se han hallado en los tres grupos sin excepción: derivados benzoicos, ácido cinámico, fenoléteres, alcoholes, fenoles, bibenzilos, bisbibenzilos, dímeros de bisbibenzilos, estilbenos, fenantrenos, naftalenos, acetofenonas, lignanos, flavonoides, coumarinas, isocoumarinas, coumestanos (Saritas et al., 2001).

A diferencia de los terpenos y compuestos aromáticos, hasta el momento solo se han registrado flavonoides en hepáticas y musgos; en hepáticas se han encontrado compuestos glicosídicos, agliconas, flavonas, antocianinas y derivados, auronas, bioflavonoides, flavanonas; los musgos contienen los mismos grupos que sintetizan las hepáticas sin embargo en ellos podemos encontrar tres grupos exclusivos hasta ahora: dihidroflavonoles, isoflavonas, triflavonas (Mues, 2000).

Hasta la fecha solo existen dos estudios fitoquímicos del género, *Pilotrichella cuspidate* y *Pilotrichella flexilis*. En los cuales se describe el aislamiento y caracterización de biflavonoides (Cuadro 2.1) (Seeger et al., 1992; Brinkmeier et al., 2000).

Cuadro 2.1 Biflavonoides aislados del género *Pilotrichella*

Especie	Compuesto
<i>P. cuspidate</i> (Lembophyllaceae) (Seeger et al., 1992).	3',3'''-binaringenina 
<i>P. flexilis</i> (Lembophyllaceae) (Brinkmeier et al., 2000).	3',3'''-binaringenina Hipnogenol A



## 2.1 Capacidad Antioxidante

Los radicales libres orgánicos son especies, que a pesar de ser neutras, presentan en su estructura atómica un electrón desapareado o impar en el orbital externo, convirtiéndolos en especies muy reactivas. Para lograr una estabilidad captan un electrón de moléculas estables, dicha especie se convierte en un radical libre, iniciando así una reacción en cadena. (Thakur & Kapila, 2017).

A pesar del tiempo de vida media corto, en la naturaleza existen radicales libres, los cuales, causan efectos benéficos y dañinos en organismos, pueden dañar biomoléculas y afectar la membrana plasmática y los organelos. Para evitar el daño se activan mecanismos que contrarrestan sus efectos, pueden ser enzimáticos o no enzimáticos y los encontramos en todo tipo de organismos plantas, animales, hongos, bacterias, (Yanishlieva-Maslarova, Heinonen, 2001; Zapata, Gerard, Davies, & Schwab, 2007). La formación de radicales libres en sistemas biológicos se atribuyen a presión biótica o abiótica en el medio que se rodea (Basile et al., 2011; Garg & Manchanda, 2009).



La acción oxidativa causada por los radicales libres puede ser neutralizada o retrasada mediante el uso de antioxidantes naturales o sintetizados químicamente, el daño tóxico que presentan; ha incrementado el interés en la búsqueda de nuevos compuestos con capacidad antioxidante, principalmente de origen natural.

Los metabolitos secundarios también actúan como antioxidantes, estos son sustancias que dependiendo de su estructura química pueden inhibir o retardar la oxidación captando radicales libres, o por mecanismos diferentes a la captación de radicales libres (Zapata et al., 2007). Los antioxidantes tienen un amplio campo de aplicación en los alimentos, la industria de cosméticos, medicina, etc (Aubad & Rojano, 2007).

Los musgos como anteriormente se mencionó tienen una anatomía que los obliga a desarrollar sistemas de defensa como antioxidantes. Los estudios en musgos sobre capacidad antioxidante son recientes, los primeros trabajos publicados inician en la década de los 90's (Seel, Hendry, & Lee, 1992). Las investigaciones para evaluar estas propiedades incluyen pruebas con enzimas como superoxidasa dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (POD), guaiacol peroxidasa (GPX), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), compuestos Tiolicos (Dazy et al., 2008; Roy, Sen, & Hänninen, 1996; Singh, Govindarajan, Nath, Rawat, & Mehrotra, 2006; Sun, He, Wang, & Cao, 2011)

En su mayoría se han estudiado extractos crudos, principalmente extractos acuosos, acetónicos, etanólicos, metanólicos, de diclorometano y aceites esenciales, en cuanto a compuestos aislados solo se han hecho estudios en biflavonoides y en algunos compuestos fenólicos (Borel, Welti, Fernandez, & Colmenares, 1993; Vladimír. Chobot, Kubicová, Nabbout, Jahodář, & Vytlačilová, 2006; Aubad, Rojano, & Lobo, 2007; Bhattarai, Paudel, Lee, Lee, & Yim, 2008; Lopes-Lutz, Alviano, Alviano, & Kolodziejczyk, 2008; Vladimir Chobot, Kubicova, Nabbout, Jahodar, & Hadacek, 2008; Basile et al., 2011; Pejín, Bogdanovic-Pristov, Pejín, & Sabovljevic, 2013; Pejín & Kien-Thai, 2013; Ertürk et al., 2015; Shin, Choi, & Kim, 2016; Waterman et al., 2017).

Los musgos por su historia evolutiva y las cuestiones abióticas como: variaciones estacionales, cambios en temperatura y humedad relativa tienen un efecto significativo

en los componentes bioquímicos (Thakur & Kapila, 2017); se les atribuye la síntesis de compuestos fenólicos para establecerse en condiciones poco favorables como la alta exposición a rayos UV, actualmente las condiciones han cambiado, sin embargo los compuestos que en su momento diversificaron el grupo, han perdurado hasta nuestros tiempo (Basile et al., 2011).

## **2.1 Actividad Antibacteriana**

La actividad antibacteriana es la capacidad que posee un extracto o un compuesto, en este caso de origen vegetal, de inhibir el crecimiento de microorganismos; este proceso se comprueba mediante un antibiograma. La búsqueda de metabolitos secundarios con efecto antibacteriano ha incrementado en años recientes por la capacidad de estos microorganismos para evolucionar y comenzar a presentar resistencia a los antibióticos con los que son atacados (Nikolajeva et al., 2012).

La curiosidad por estudiar la bioactividad de los extractos crudos o fraccionados en briófitas surge de la evidencia de su uso en la medicina tradicional, en Europa, China, India, y el Norte de América, resaltando sus propiedades antibacterianas (Glime, 2007; Nikolajeva et al., 2012).

La presencia de sustancias antibióticas en plantas ha sido bien documentada, y en musgos se ha demostrado que poseen propiedades antibacterianas (Asakawa, Ludwiczuk, & Nagashima, 2013b; Mues, 2000).

Zhu, Wang, & Xu (2006) sugieren a este grupo como fuente prometedora de recursos con actividad antibiótica y biológica. Las familias de compuestos con bioactividad más reconocidos hasta ahora son: carbohidratos, lípidos, proteínas, esteroides, polifenoles, terpenoides, ácidos orgánicos, ácidos grasos, acetofenoles, arilbenzofuranos, compuestos alifáticos, acetogeninas fenilquinones, aromáticos y sustancias fenólicas. (Chandra et al., 2016; Veljić et al., 2009)

Se estima que han estudiado cerca de 1,000 especies de briófitas comparado con las 24,000 que posiblemente haya alrededor del mundo, esto indica menos del 1% de total aproximado, lo que sugiere pocos estudios en musgos en búsqueda de actividad

antibacteriana. La actividad antibacteriana dependerá de la composición química específica, configuración estructural de los compuestos, grupos funcionales así como las interacciones entre los compuestos (Bukvički, Veljić, Soković, Grujić, & Marin, 2012; Nikolajeva et al., 2012).

## 2.1 Referencias

- Asakawa, Y. (2007). Biologically active compounds from bryophytes. *Pure and Applied Chemistry*, 79(4), 557–580.
- Asakawa, Y., & Ludwiczuk, A. (2013). Chapter 1 Bryophytes : Liverworts , Mosses , and Hornworts : Extraction and Isolation Procedures, 1055. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-577-4>
- Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., & Nagashima, F. (2013a). Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry*, 91, 52–80. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.04.012>
- Asakawa, Y., Ludwiczuk, A., & Nagashima, F. (2013b). Phytochemical and biological studies of bryophytes. *Phytochemistry*, 91, 52–80.
- Aubad, P., & Rojano, B. (2007). Actividad antioxidante en musgos. *Scientia Et Technica*, 33(33), 23–26.
- Aubad, P., Rojano, B., & Lobo, T. E. (2007). Actividad antioxidante en musgos. *Scientia Et Technica*, 33(33), 23–26.
- Basile, A., Sorbo, S., Conte, B., Golia, B., Montanari, S., Cobianchi, R., ... Esposito, S. (2011). Antioxidant activity in extracts from *Leptodictyum riparium* (Bryophyta), stressed by heavy metals, heat shock, and salinity. *Plant Biosystems*, 145(1), 77–80. <https://doi.org/10.1080/11263504.2010.509935>
- Bendz, G., Martensson, O., & Terenius, L. (1962). Moss Pigments. *Acta Chemica Scandinavica*, 16(5), 1183–1190.
- Bhattacharai, H. D., Paudel, B., Lee, H. S., Lee, Y. K., & Yim, J. H. (2008). Antioxidant Activity of *Sanionia uncinata*, a Polar Moss Species from King George Island, Antarctica. *Phytotherapy Research*, 22(April 2008), 1635–1639. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Borel, C., Welti, D. H., Fernandez, I., & Colmenares, M. (1993). Dicranin, an antimicrobial and 15-lipoxygenase inhibitor from the moss *Dicranum scoparium*. *Journal of Natural Products*, 56(7), 1071–1077. <https://doi.org/10.1021/np50097a010>
- Brinkmeier, E., Geiger, H., & Zinsmeister, H. D. (2000). The Cooccurrence of Different Biflavonoid Types in *Pilotrichella flexilis*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 55(11–

12), 866–869.

- Bukvički, D., Veljić, M., Soković, M., Grujić, S., & Marin, P. D. (2012). Antimicrobial activity of methanol extracts of *Abietinella Abietina*, *Neckera Crispa*, *Platyhypnidium Riparoides*, *Cratoneuron Filicinum* and *Campylium Protensum* mosses. *Archives of Biological Sciences*, *64*(3), 911–916. <https://doi.org/10.2298/ABS1203911B>
- Chandra, S., Chandra, D., Barh, A., Pankaj, Pandey, R. K., & Sharma, I. P. (2016). Bryophytes: Hoard of remedies, an ethno-medicinal review. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.01.007>
- Chobot, V., Kubicova, L., Nabbout, S., Jahodar, L., & Hadacek, F. (2008). Evaluation of antioxidant activity of some common mosses. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C- A Journal of Biosciences*, *63*, 476–482.
- Chobot, V., Kubicová, L., Nabbout, S., Jahodář, L., & Vytlačilová, J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of five moss species. *Fitoterapia*, *77*(7–8), 598–600. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.06.010>
- Clark, A. M. (1996). Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.1023/A:1016091631721>
- Cordell, G. A., Beecher, C. W. W., & Pezzuto, J. M. (1991). Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, *32*(1–3), 117–133.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products : A continuing source of novel drug leads ☆. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1830*, 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- Dazy, M., Béraud, E., Cotelle, S., Meux, E., Masfaraud, J. F., & Féraud, J. F. (2008). Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere*, *73*(3), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.06.044>
- Delgadillo, C., Villaseñor, J. L., Cárdenas, Á., & Ortiz, E. (2014). Diversity and distribution of mosses in the state of Hidalgo, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *85*(1), 84–97. <https://doi.org/10.7550/rmb.35761>
- Ertürk, Ö., Sahin, H., Ertürk, E. Y., Hotaman, H. E., Koz, B., & Özdemir, Ö. (2015). The antimicrobial and antioxidant activities of extracts obtained from some moss species in Turkey, *61*(4), 52–65. <https://doi.org/10.1515/hepo-2015-0031>
- Garg, N., & Manchanda, G. (2009). ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosystems*, *143*(1), 81–96.
- Glime, J. M. (2007). Economic and ethnic uses of bryophytes. *Flora of North America*, *27*, 14–41.
- Goffinet, B., Buck, W. R., & Shaw, A. J. (2009). Morphology, anatomy, and classification

- of the Bryophyta. *Bryophyte Biology. Edition, 2*, 55–138.
- Gradstein, S. R. (2001). Guide to the Bryophytes of tropical America/. *Memoirs of the New York Botanical Garden*;
- Hallingbäck, T., & Hodgetts, N. (2000). *Mosses, liverworts, and hornworts: status survey and conservation action plan for bryophytes*. Citeseer.
- Harris, E. S. J. (2008). Ethnobryology: traditional uses and folk classification of bryophytes. *The Bryologist*, 111(2), 169–217.
- Klavina, L., Springe, G., Nikolajeva, V., Martsinkevich, I., Nakurte, I., Dzabijeva, D., & Steinberga, I. (2015). Chemical composition analysis, antimicrobial activity and cytotoxicity screening of moss extracts (Moss Phytochemistry). *Molecules*, 20(9), 17221–17243. <https://doi.org/10.3390/molecules200917221>
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., & Kolodziejczyk, P. P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry*, 69, 1732–1738. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.014>
- Marko, S., Aneta, B., & Dragoljub, G. (2001). Bryophytes as a potential source of medicinal compounds. *Pregl Rev*, 21(1).
- Mazzoni, A. C., Lanzer, R., Bordin, J., Schäfer, A., & Wasum, R. (2012). Mosses as indicators of atmospheric metal deposition in an industrial area of southern Brazil. *Acta Botanica Brasílica*, 26(3), 553–558. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062012000300005>
- Mues, R. (2000). Chemical constituents and biochemistry. *Bryophyte Biology*, 150–181.
- Nikolajeva, V., Liepina, L., Petrina, Z., Krumina, G., Grube, M., & Muiznieks, I. (2012). Antibacterial Activity of Extracts from Some Bryophytes. *Advances in Microbiology*, 2(3), 345–353. <https://doi.org/10.4236/aim.2012.23042>
- Roy, S., Sen, C. K., & Hänninen, O. (1996). Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using “moss bags”: Bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere*, 32(12), 2305–2315. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(96\)00139-7](https://doi.org/10.1016/0045-6535(96)00139-7)
- Sabovljević, M. S., Sabovljević, A. D., Ikram, N. K. K., Peramuna, A., Bae, H., & Simonsen, H. T. (2016). Bryophytes - An emerging source for herbal remedies and chemical production. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*, 14(4), 314–327. <https://doi.org/10.1017/S1479262116000320>
- Sanabria Galindo, A. (1983). Análisis fitoquímico preliminar: Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae.
- Saritas, Y., Sonwa, M. M., Iznaguen, H., König, W. A., Muhle, H., & Mues, R. (2001). Volatile constituents in mosses (Musci). *Phytochemistry*, 57(3), 443–457.

[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00069-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00069-3)

- Saxena, D. K. (2004). Uses of bryophytes. *Resonance*, 9(6), 56–65.
- Seeger, T., G. H., D., Z. H., & W., R. (1993). Biflavonoids from the moss *Homalothecium lutescens*. *Phytochemistry*, 34(1), 295–296. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90823-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90823-9)
- Seeger, T., Geiger, H., Zinsmeister, H. D., Frahm, J.-P., & Witte, L. (1992). 3', 3''-Binaringenin, a New Biflavonoid from *Pilotrichella cuspidata* (Meteoriaceae, Musci). *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 47(9–10), 667–669.
- Seel, W. E., Hendry, G. A. F., & Lee, J. A. (1992). Effects of desiccation on some activated oxygen processing enzymes and anti-oxidants in mosses. *Journal of Experimental Botany*, 43(253), 1031–1037. <https://doi.org/10.1093/jxb/43.8.1031>
- Sharp, A. J., Crum, H., & Eckel, P. M. (Eds.). (1994). *The Moss Flora of México*. Memoirs of The New York Botanical Garden.
- Shu, Y.-Z. (1998). Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. *Journal of Natural Products*, 61, 1053–1071. <https://doi.org/10.1021/np9800102>
- Singh, M., Govindarajan, R., Nath, V., Rawat, A. K. S., & Mehrotra, S. (2006). Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.02.007>
- Sun, S. Q., He, M., Wang, G. X., & Cao, T. (2011). Heavy Metal-Induced Physiological Alterations and Oxidative Stress in the Moss *Brachythecium piligerum* Chad. *Environmental Toxicology*, 26, 453–458. <https://doi.org/10.1002/tox.20571>
- Thakur, S., & Kapila, S. (2017). Seasonal changes in antioxidant enzymes , polyphenol oxidase enzyme , flavonoids and phenolic content in three leafy liverworts, (June), 39–44.
- Troitsky, a V, Ignatov, M. S., Bobrova, V. K., & Milyutina, I. a. (2007). Contribution of genosystematics to current concepts of phylogeny and classification of bryophytes. *Biochemistry. Biokhimiia*, 72(12), 1368–1376. <https://doi.org/10.1134/S0006297907120115>
- Üçüncü, O., Cansu, T. B., Özdemir, T., Karaoğlu, Ş. A., & Yayli, N. (2010). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of mosses (*Tortula muralis* Hedw., *Homalothecium lutescens* (Hedw.) H. Rob., *Hypnum cupressiforme* Hedw., and *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb.) from Turkey. *Turkish Journal of Chemistry*, 34(5), 825–834.
- Vanderpoorten, A., & Goffinet, B. (2009). *Introduction to bryophytes*. Cambridge University Press.

- Veljić, M., Đuric, A., Soković, M., Ćirić, A., Glamočlija, J., & Marin, P. . (2009). ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF METHANOL EXTRACTS OF FONTINALIS ANTIPYRETICA, HYPNUM CUPRESSIFORME, AND CTENIDIUM MOLLUSCUM. *Archives of Biological Sciences*, 61(2), 225–229. <https://doi.org/10.2298/ABS0901225V>
- Yanishlieva-Maslarova, N.V. Heinonen, I. M. (2001). Origen de los antioxidantes naturales: verduras, frutas, hierbas, especias y tés. In N. YANISHLIEVA & M. GORDON (Eds.), *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas*. (pp. 219–247).
- Zapata, L. M., Gerard, L., Davies, C., & Schvab, M. C. (2007). Study of antioxidants compounds and antioxidant activity in tomatoes. *Ciencia, Docencia Y Tecnología*, 35, 173–193.
- Zhu, R.-L., Wang, D., & Xu, L. (2006). Antibacterial activity in extracts of some bryophytes from China and Mongolia (Papers to Commemorate the 100th Issue of the Journal of the Hattori Botanical Laboratory)--(Bryology). *Journal of the*

### 3. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *Pilotrichella flexilis*

#### 3.1 Resumen

Los productos naturales o metabolitos secundarios representan una parte medular en el estudio de la química orgánica, de hecho, los orígenes de esta ciencia pueden remitirse en parte al interés por conocer la composición química de las plantas. En el presente trabajo, el objetivo principal consistió en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios del extracto hexánico de *P. flexilis*, para contribuir al conocimiento fitoquímico de la especie. El aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios del extracto hexánico se llevó a cabo por CC y CCD, la asignación de la estructura química se basó en las técnicas espectroscópicas de IR,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  RMN, DEPT, COSY HMBC, HSQC y en la espectrometría de masas. Del extracto hexánico se aislaron y caracterizaron el triterpeno: Lup-20(29)-eno, cuya fórmula molecular es  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$ , además de una mezcla  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol. El triterpeno aislado, se reporta por primera vez para esta especie. Las propiedades ecológicas que el musgo posee, ha despertado el interés por llevar a cabo el estudio fitoquímico de las briófitas.

**Palabras Clave:** Fitoquímica, *Pilotrichella*, Musgos, Triterpeno

---

Tesis: Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Cinthia Mejía Lara

Director de Tesis: Dr. Holber Zuleta Prada



## PHYTOCHEMICAL STUDY OF *Pilotrichella flexilis*

### 3.2 Abstract

The natural products or secondary metabolites represent a core part in the study of organic chemistry, in fact, the origins of this science may be partly related to the interest in knowing the chemical composition of plants. In the present work, the main objective consisted in the search of new secondary metabolites of the hexane extract of *P. flexilis*, to contribute to the phytochemical knowledge of the species. The isolation and purification of the secondary metabolites of the hexanic extract was carried out by CC and CCD, the assignment of the chemical structure was based on the spectroscopic techniques of IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, DEPT, COZY HMBC, HSQC and in the spectrometry of masses. From the hexanic extract, triterpene was isolated and characterized: Lup-20 (29) -eno, whose molecular formula was C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>, in addition to a mixture of β-sitosterol and stigmasterol. Isolated triterpene, is reported for the first time for this species of moss. The ecological properties that the moss possesses, has awakened the interest to carry out the phytochemical study of the bryophytes. **Key word:** Phytochemistry, *Pilotrichella*, Moss, Triterpene

---

Thesis: Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo.  
Author: Cinthia Mejía Lara  
Advisor: Dr. Holber Zuleta Prada

### 3.3 Introducción

La demanda de nuevos compuestos bio-activos que contribuyan al tratamiento de enfermedades, ha estimulado una búsqueda continua de compuestos derivados de plantas. Muchos de estos compuestos obtenidos en años recientes, han servido de base a la industria farmacéutica, para desarrollar nuevas moléculas farmacológicamente activas.

Ante esta demanda, los briófitas son candidatos atractivos para la búsqueda de nuevos compuestos. Hay 23 000 especies taxonómicamente descritas de briófitas, pero sólo un porcentaje de este grupo de diminutas plantas fotosintetizadores terrestres y formadoras de esporas verdes han sido estudiadas químicamente desde 1903, existen cerca de mil referencias disponibles. Un excelente review aportado por Asakawa y Ludwiczuk (2017) es un ejemplo de la cantidad de compuestos con bioactividad aislados de briófitas, entre los briófitas, las hepáticas son estudiados más exhaustivamente en términos de la química y la biología molecular que los otros dos phyla, los musgos y antoceros. Los últimos organismos carecen de los cuerpos de aceite, al contrario de las hepáticas, de las cuales se han aislado más de 1000 metabolitos secundarios. Algunos musgos producen la vitamina B2 y muchos tipos de ácidos grasos insaturados y lípidos (triglicéridos). Así, otras estrategias se han enfocado en metabolitos secundarios que podrían aplicarse a las dietas de bovinos y cultivo de peces. Los metabolitos de hepáticas tienen un uso potencial de drogas porque poseen algunos compuestos biológicamente importantes. En los últimos años los musgos han sido estudiados, logrando aislar compuestos de diferentes grupos (Terpenos, Flavonoides), postulándolos como plantas posibles para la obtención de compuestos de interés (bioactivos) (Geiger, 1990)

La mayor dificultad por la cual estas especies no se han estudiado en intensidad se debe a su pequeño tamaño y problemas de identificación. recientemente se han publicado trabajos sobresalientes en identificación, caracterización de metabolitos secundarios de musgos, además de su evaluación de bioactividad de un gran número de compuestos biológicamente activos (Asakawa & Ludwiczuk, 2017).

La distribución de los musgos (Bryophyta) es amplia, incluye una gran variedad de hábitats. Son principalmente usados en propósitos domésticos, horticultura, productos farmacéuticos y como indicadores de buenas condiciones ambientales, también son ecológicamente significativos. Estudios han demostrado la amplia variedad de compuestos que poseen los musgos, terpenoides, flavonoides, lignanos, lípidos, esteroides polyfenoles, las investigaciones sugieren que poseen compuestos prometedores o de interés específico esto motiva a seguir en el estudio fitoquímico en este grupo de plantas para lograr el aislamiento de compuestos aun no registrados en ellos. A pesar de que ya existe un estudio fitoquímico de *P. flexilis* (Brinkmeier et al., 2000). Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue analizar el extracto hexánico de *P. flexilis* y lograr aislar compuestos de interés no registrados en la especie.

### **3.4 Materiales y Métodos**

#### **3.4.1 Obtención del material vegetal**

El material fue colectado en la localidad “La Mojonera” municipio de Zacualtipán de Ángeles, Estado de Hidalgo, durante el mes de septiembre de 2016, en las coordenadas geográficas: 20° 38' 0.33" N, 98°35'51.8" E. A una altitud que oscila entre los 1,780-1,950 msnm. El material fue identificado como *P. flexilis* (Anexo 1) por la Biol. Cinthia Mejía Lara. Un ejemplar fue depositado en el Herbario de Preparatoria Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) Número de registro 34591).

#### **3.4.2 Preparación de extractos**

El material se dejó secar, y se retiró toda basura posible, se pulverizó mecánicamente mediante un procesador “Nutribuller”. Obteniéndose 211 g de material seco, se le adicionaron 1.5 litros de metanol y se dejó macerar por tres días, se decantó el metanol y se concentró en un evaporador rotatorio, esta misma operación se repitió cuatro veces para obtener el extracto metanólico. El extracto libre metanol fue sometido a particiones líquido-líquido (Fig. 3.1). Primero el extracto metanólico se redisolvió una mezcla de metanol-agua (3:2 v/v), posteriormente el metanol se evaporó y a la mezcla resultante y la fracción remanente se le agrego hexano, que se adicionó por 4 veces más.

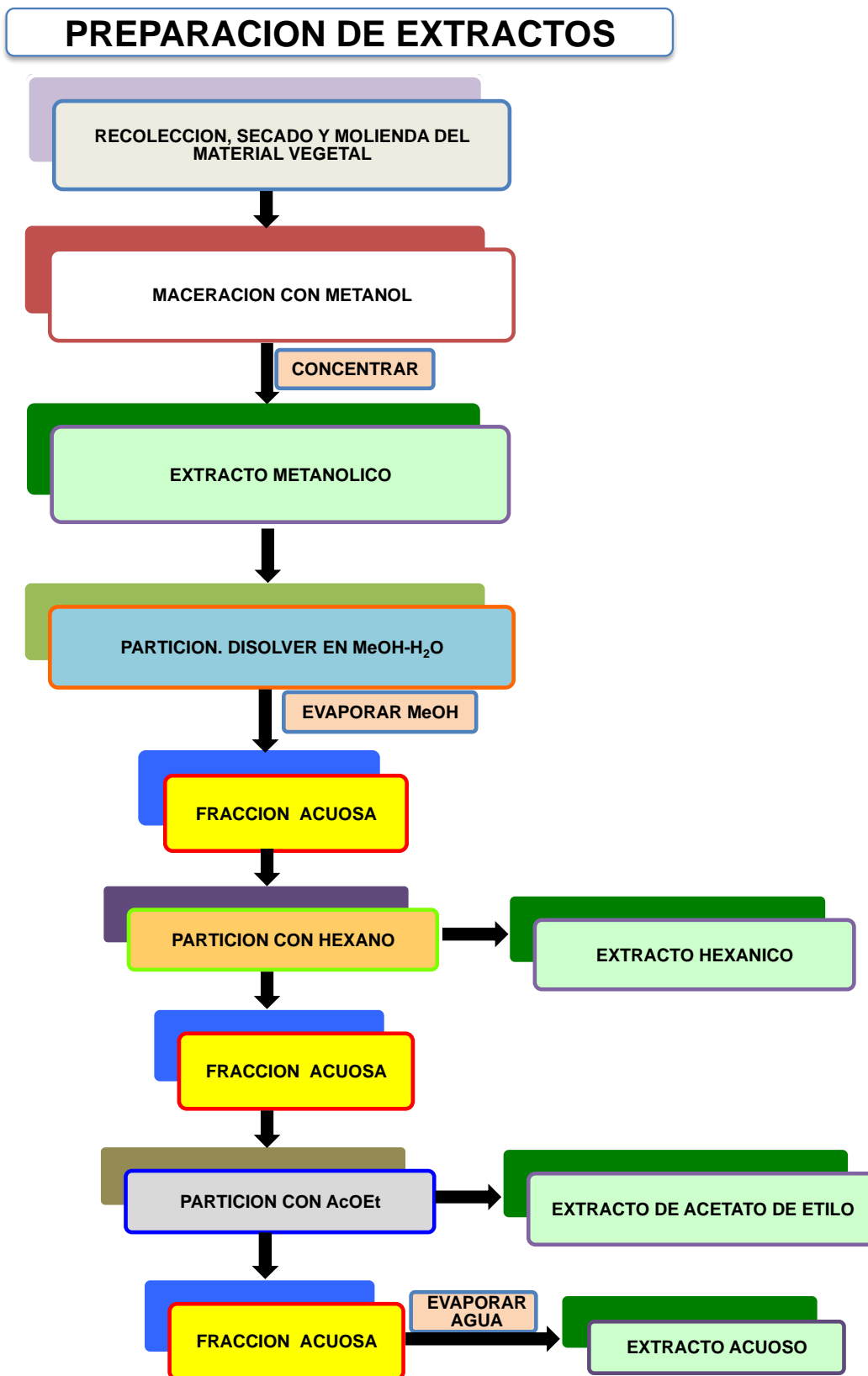


Figura 3.1 Esquema general de partición del extracto metanolico.

### 3.4.3 Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios

El estudio se inicio con el extracto hexanico, el cual se fraccionó mediante cromatografía por columna a gravedad empacada con gel de sílice 60 (0.040-0.063mm., malla 230-400 ASTM) como fase estacionaria. Se eluyó inicialmente con hexano y se aumentó la polaridad con acetato de etilo en una proporción 1:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1. Se colectaron fracciones de 30 mL. Se dejaron evaporar, cada una de ellas y se evaluó el perfil cromatográfico por cromatografía de capa delgada (CCD) en cromatoplasmas de gel de sílice 60. Se usaron como reveladores, luz ultravioleta en lampara UV Mineral Light, ácido fosfomolibdico (calentamiento de cromoplasmas).

### 3.4.4 Análisis espectroscópico de los productos aislados

Los espectros Resonancia Magnética Nuclear de protón y carbono ( $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN) se determinaron mediante un espectrómetro a 400 MHz modelo 400 MR DD2 Agilent y usando cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como disolvente, y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. El desplazamiento químico se reportó en escala delta ( $\delta$ ) en unidades por partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz (Hz). Los espectros de infrarrojo se tomaron en un equipo IR Cary630 Agilent.

Se obtuvo 5.2 g del extracto hexánico lo que corresponde al 2.46% del rendimiento con respecto al peso de la muestra seca del material vegetal. En total se obtuvieron 1023 fracciones. De las fracciones 1-64 eluidas con hexano al 100 %, después de purificar por cromatografía de columna flash (CCF), se obtuvo el hidrocarburo tipo triterpeno Lup-20(29)-eno (**1**), como sólido amorfo de color blanco. De las fracciones 28-60 eluidas con mezcla hexano-acetato de etilo (95-5) se obtuvieron los esteroides  $\beta$ -sitosterol (**2**) y estigmasterol (**3**) (Fig. 3.2). Estos compuestos se identificaron de acuerdo con sus datos espectroscópicos, CCD, y por comparación con los datos de la literatura.

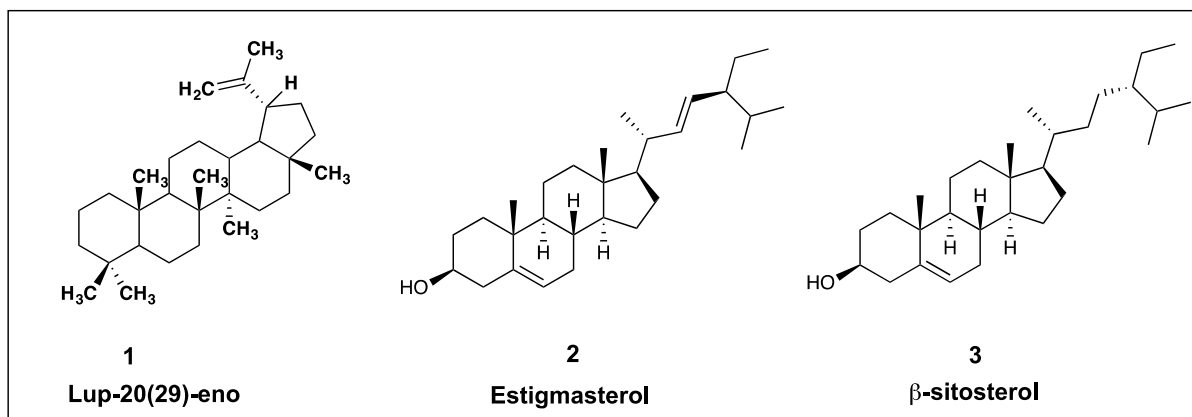


Figura 3.2 Compuestos aislados del extracto hexánico *P. flexilis*

### 3.4.5 Caracterización completa del Lup-20(29)-eno (1)

El compuesto (1) (Fig. 3.3) reportado en este trabajo se identificó por el análisis de los datos obtenidos en los espectros de IR, RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ . Complementado con los datos espectroscópicos de DEPT, COSY HMBC, HSQC y EM. Es importante, resaltar que se hicieron experimentos de detección directa de  $^{13}\text{C}$  RMN cuantitativos, variando el tiempo de relajación longitudinal de toda la serie, además de los tiempos de adquisición y otros parámetros de adquisición. Por otro lado, la asignación completa de las señales en los espectros mono y bidimensionales, se soportó en el uso de sistemas de procesamiento de datos NMRPIPE, Sparky y TOPSPIN versión 3.1.

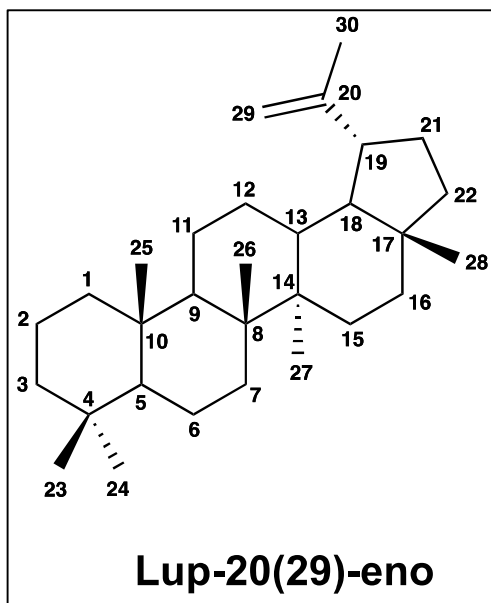


Figura 3.3 Estructura propuesta para el compuesto 1

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 3.4) las señales importantes corresponden a :  $\delta$  1.72 (3H), para los protones del metilo sobre un doble enlace; otro desplazamiento es  $\delta$  2.65 (1H, ddd,  $J = 8.0, 6.3, 4.7$  Hz) la señal es de un hidrogeno terciario, que está sobre un carbono terciario, e integra para 1H ,  $\delta$  4.95-4.97 (2H, 4.96 (d,  $J = 1.3$  Hz), 4.96 (d,  $J = 1.3$  Hz)) característica de un metileno ( $\text{CH}_2$ ) de un doble enlace. Los protones que están entre  $\delta$  0.89-1.56 son señales de  $\text{CH}_2$  y CH de varios protones de los ciclos, además de cinco metilos terciarios  $\delta$  0.69,  $\delta$  0.76,  $\delta$  0.81,  $\delta$  0.91,  $\delta$  0.92.

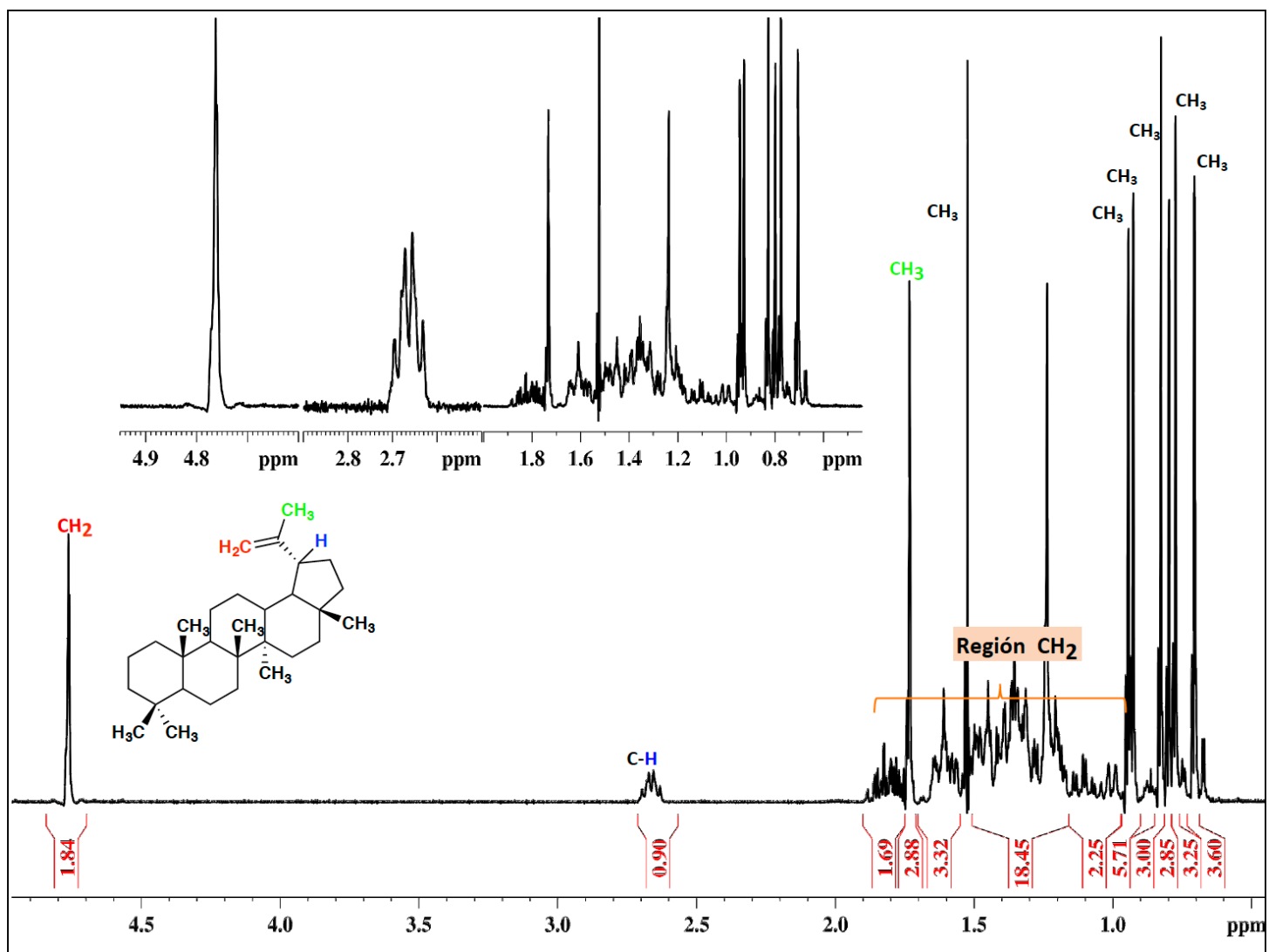


Figura 3.4 Espectro de  $^1\text{H}$  RMN de Lup-20(29)-eno



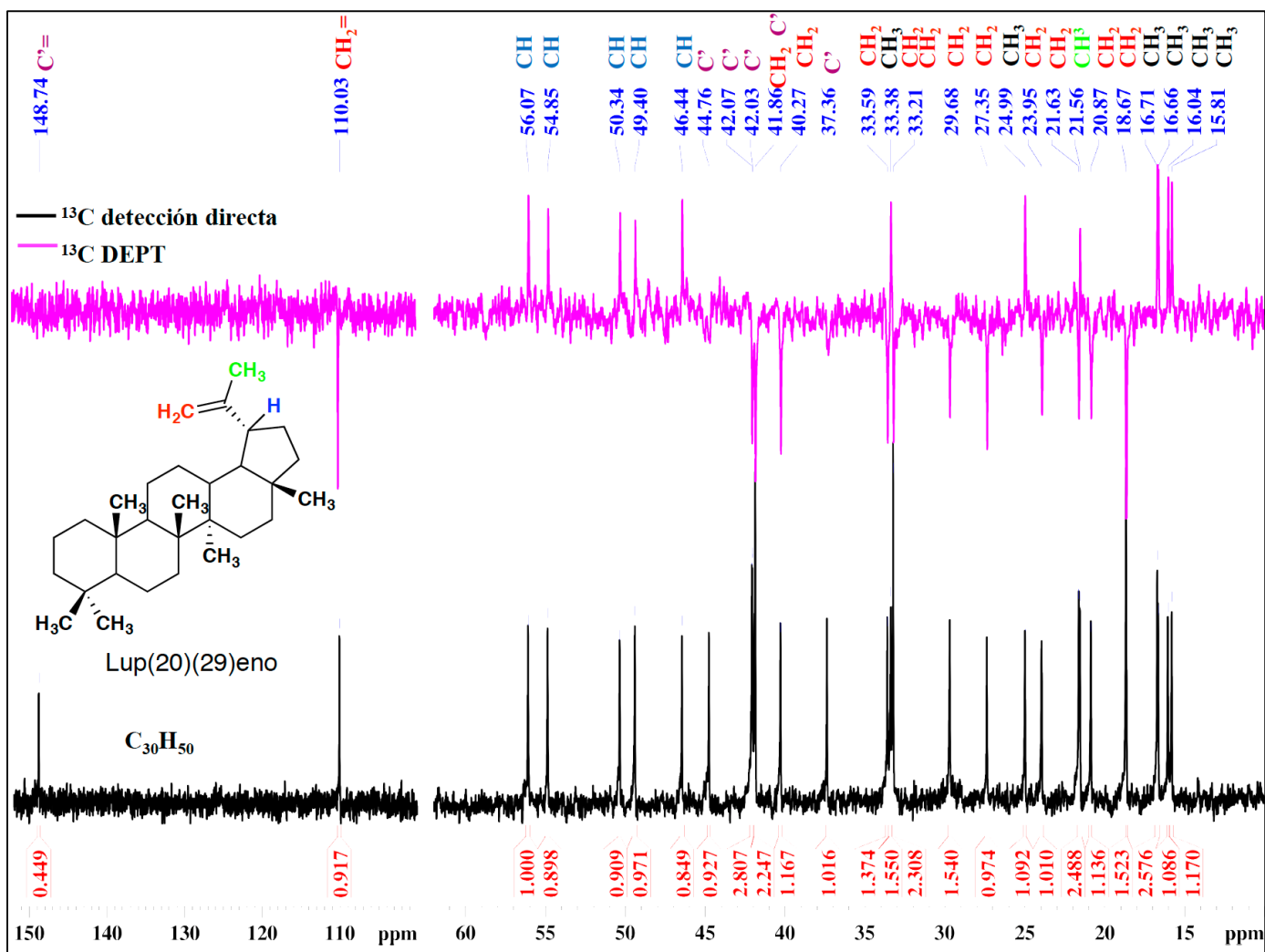


Figura 3.5 Espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN, DEPT procesados en la asignación de Lup-20(29)-eno

Los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  y DEPT (Fig. 3.5) indican que el compuesto tiene 11 metilenos en su estructura ( $\delta$ 110.03,  $\delta$ 41.86,  $\delta$ 40.27,  $\delta$ 33.59,  $\delta$ 33.21,  $\delta$ 29.68,  $\delta$ 27.35,  $\delta$ 23.95,  $\delta$ 21.63,  $\delta$ 20.87,  $\delta$ 18.67), cinco carbonos metinos ( $\delta$ 56.07,  $\delta$ 54.85,  $\delta$ 50.34,  $\delta$ 49.40,  $\delta$ 46.44) siete carbonos cuaternarios ( $\delta$ 148.74,  $\delta$ 44.76,  $\delta$ 42.07,  $\delta$ 42.03,  $\delta$ 42.03,  $\delta$ 41.86,  $\delta$  37.36), y siete metilos ( $\delta$  33.38,  $\delta$  24.99,  $\delta$ 21.56,  $\delta$ 16.71,  $\delta$ 16.66,  $\delta$ 16.04,  $\delta$ 15.81) Mediante este análisis se comprueba que la fórmula molecular del compuesto es  $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$ .

Para confirmar la asignación de los átomos de carbono e hidrogeno se realizo un analisis detallado por expermentos Bidimensionales Tabla 3.1 (anexos).

Cuadro 3.1 Datos de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) del Lupeno

No	HSQC		HMBC ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$ )
	$\delta$ (C)	$\delta$ (H)	
C-1	40.2 t	1.07 (m), 1.48 (m)	CH2(2), Me (25)
C-2	27.3 t	1.89 (m), 1.58 (m)	
C-3	46.4 t	1.62 (m)	H-5, Me(23), C-24
C-4	44.7 s		Me(23), CH2-3, C-24
C-5	54.8 d	1.45 (1H, m)	Me(23), C-24
C-6	18.6 t	1.82 (m), 1.61 (m)	CH2(7)
C-7	40.2 t	1.64 (m), 1.35 (m)	
C-8	42.0 s		CH(9), Me(26), Me(27)
C-9	56.0 d	1.38 (1H,d, J=11.2 Hz)	Me(27)
C-10	37.3 s		
C-11	20.8 t	1.41 (m), 1.21 (m)	
C-12	23.9 t	1.06 (m), 1.62 (m)	
C-13	39.90 d	1.64 (1H.ddd, J=11.2, 11.2, 2.8 Hz)	Me(26), Me(27)
C-14	41.8 s		
C-15	29.6 t	1.02 (m), 1.6 (m)	
C-16	33.2 t	1.46 (m)	
C-17	33.4 s		Me(28)
C-18	49.4 d	1.44	Me(25)
C-19	50.3 d	2.38 (1H, ddd, J=11.2, 11.2, 3.6 Hz)	C(20), Me(30)
C-20	148.7s		Me(30)
C-21	33.3 t	1.38 (m), 1.98 (m)	
C-22	21.5 t	1.17 (m), 1.37 (m)	
C-23	33.3 q	1.34 (3H, s)	CH(5)
C-24	21.5 q		CH2(3), CH(5), Me(23)
C-25	15.8 q	0.77 (3H, s)	CH2(1)
C-26	16.0 q	1.04 (3H, s)	CH(9), CH2(7)
C-27	16.7 q	0.96 (3H, s)	CH2(15)
C-28	16.6 q	0.79 (3H, s)	CH2(16), CH2(22)
C-29	110.0 t	4.57 (1H, brs, J=2.0 Hz), 469 (1H, brs, J=2.0 Hz)	Me(30), CH(19)
C-30	21.6 q	1.75 (3H, s)	CH-19, CH2-29

El espectro de masas, para el compuesto (1) muestra un ion molecular 410 m/z analizado para la fórmula molecular  $C_{30}H_{50}$  (Fig 3.5). Aunque se han reportado el aislamiento de diversos metabolitos en estas especies, es la primera vez que se reporta este derivado de lupeno en esta especie.

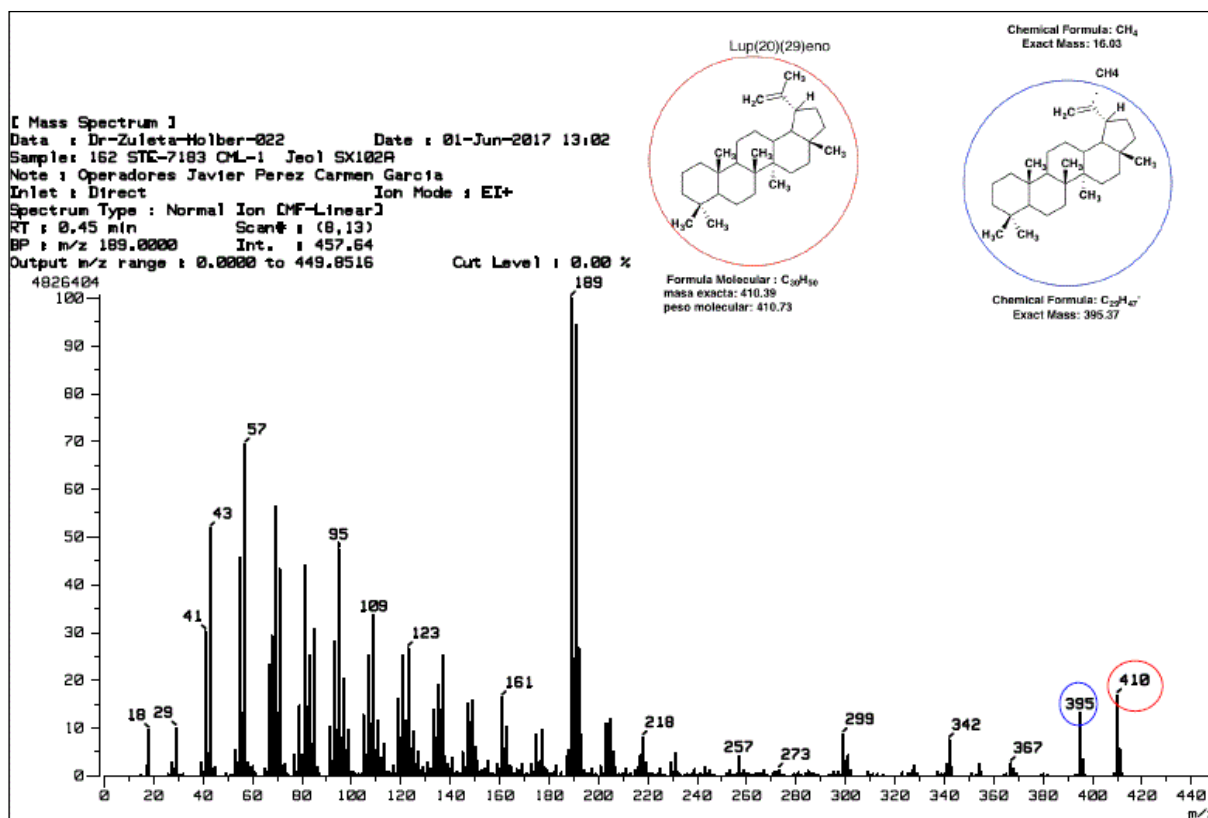


Figura 3.6 Espectros de Masas de Lup-20(29)-eno

### 3.4.6 $\beta$ -sitosterol y Estigmasterol

De las fracciones 212-260 (95:5-Hex-AcO) de la columna original, se hizo una segunda separación cromatográfica que permitió la purificación de un sólido blanco cristalino en las fracciones 28-60, en la mezcla de elución hexano-AcOEt 95:5, cuyo  $R_f$  fue de: 0.54. El sólido se comparó por cromatografía en capa fina con una muestra aislada e identificada ya en laboratorio (Fig. 3.6) el perfil cromatográfico de las fracciones coincidió con la referencia aislada anteriormente. Para confirmar se analizaron las señales del espectro de RMN  $^1H$ . En el espectro RMN  $^1H$  (Fig. 3.7)

se observó un perfil característico para esteroides. Las señales desplazadas en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se asocian a la presencia de seis metilos:  $\delta$ 1.01 singulete (3H, CH<sub>3</sub>, H-19),  $\delta$  0.92 doblete (3H, CH<sub>3</sub>, J=6.4 Hz, H-21), dos señales a  $\delta$  0.86 doblete, pero que integra con J=0 Hz para dos hidrógenos se deduce que se trata de dos singuletes superpuestos (6H, 2CH<sub>3</sub>, H-26 y H-27),  $\delta$  0.82 triplete (3H, H<sub>29</sub>) y  $\delta$  0.68 singulete (3H, H-18) El protón del carbono enlazado a un grupo carboxílico resuena en  $\delta$  3.52 (1H, ddd, J=15.4, 10.5, 4.8 Hz) que corresponde al protón de un carbono enlazado al grupo hidroxilo, esta es una señal característica para el hidrógeno ubicado en posición 3 del anillo esteroidal, que de acuerdo a las constantes de acoplamiento permite ubicar el grupo hidroxilo en posición  $\beta$ . Las señales en  $\delta$ 5.02 (1H, dd, J=15.2, 8.4 Hz) y  $\delta$ 5.16 (1H, dd, J=15.2, 8.5 Hz) son características para los protones vinílicos sobre C-22 y C-23 del estigmasterol.

Otra señal característica para los esteroides es la observada en el espectro en  $\delta$ 5.35 (1H, d, J=4.9 Hz) correspondiente al protón oleofínico en posición 6 del núcleo esteroidal.

Con esta información se dedujo que el compuesto correspondía a un esteroide. Considerando, el perfil espectroscópico del grupo vinílico y el carbono base de oxígeno se toma en cuenta que son característicos de triterpenos de tipo lupano. Se compararon los datos obtenidos por RMN  $^1\text{H}$  con los informados previamente en la literatura para  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol. (Patiño, Prieto, Lozano, Lesmes, & Cuca, 2011). Se observaron que los datos espectrales experimentales coinciden con los datos espectrales de la literatura para el  $\beta$ -sitosterol y para el estigmasterol, por lo que se revisó estudios anteriores sobre esteroides extraídos de plantas y se observó que el  $\beta$ -sitosterol y el estigmasterol son isómeros que comúnmente se encuentran en mezcla en la naturaleza y son muy difíciles de separar (Chaturvedula & Prakash, 2012).

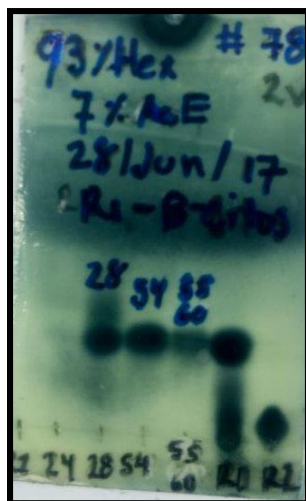


Figura 3.7 CCD de la mezcla  $\beta$ -sitosterol y estigmasterol

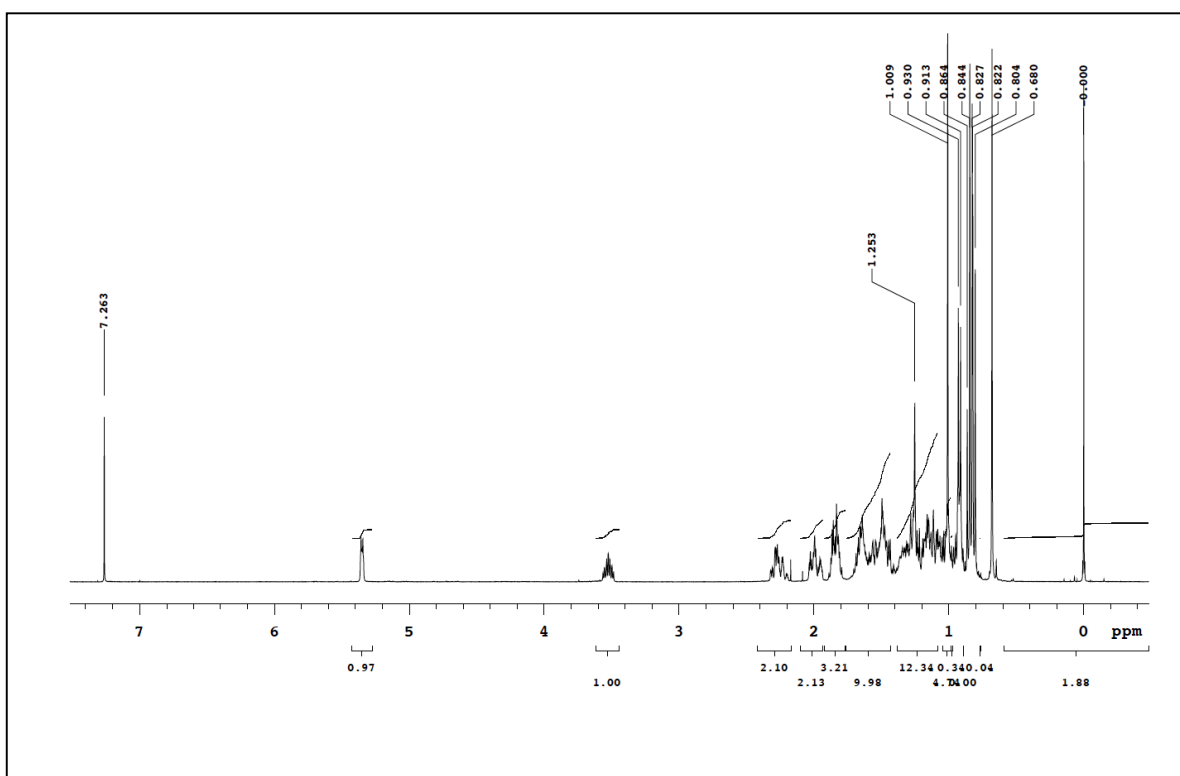


Figura 3.8 Espectro  $^1\text{H}$  RMN de  $\beta$ -sitosterol

Cabe mencionar que no se profundizará en el análisis del espectro del carbono  $^{13}\text{C}$  RMN para el  $\beta$ -sitosterol dado que ya es una estructura conocida y con muchos

estudios de este tipo. Por lo tanto, con los datos de punto de fusión, Rf y  $^1\text{H}$  RMN, se considera suficiente para no tener duda de la estructura propuesta.

Los triterpenos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, encontrándolos en diferentes partes de las plantas, además se les atribuyen actividades biológicas (Dewick, 2002).

En las briófitas los terpenoides son bien representados se distribuyen en los tres grupos y existe por lo menos un compuesto perteneciente a las diferentes clases de terpenoides que se conocen como: Monoterpenos, Sesquiterpenos, Diterpenos, Triterpenos, Esteroides y Tetraterpenos. Existen reportes de compuestos aislados en *P. flexilis* de tipo biblflavonoide, en la presente investigación se reportan tres compuestos entre ellos un triterpeno (Lup-(20)(29)-eno), aunque este compuesto es el primer registro para el grupo y sobre todo la especie no es de extrañarse pues los triterpenos se encuentran en especies de las tres clases de briófitas, se registran aproximadamente 40 triterpenos conocidos en briófitas distribuidos solamente 20 en musgos (Mues, 2000).

Los triterpenos más representativos aislados en musgos son: diplopteno, 22-hidroxi-29-metilhopanoato, 20-hidroxi-22(29)-hopeno, 22(30)-hopeno-29-oico ácido, adianton, tetrahimenol, así como el betulin (20(29)-lupen-3 $\beta$ , 28-diol) aislado de *Pellia epiphylla* y *Lepidozia reptans* (Grammes, Burkhardt, & Becker, 1994; Asakawa, 1995; Sanders, 1996; Cullmann & Becker, 1998) este último es el compuesto más parecido a el Lup-(20)(29)-eno aislado de *P. flexilis*.

Otro grupo de los terpenos son los esteroides, los principales fitoesteroides como el campesterol, sitosterol y estigmasterol son encontrados en la mayoría de las briófitas (Mues, 2000), en *P. flexilis* se logró aislar la mezcla de fitosteroles  $\beta$ -sitosterol y Estigmasterol, se conoce que ambos compuestos poseen actividades biológicas importantes como actividades antimicótica, antibacteriana, antihierlipoproteínica, así como inhibidores de líneas celulares de tumores *in vitro* e *in vivo*. El estigmasterol ha demostrado tener propiedades inhibitorias en tumores en carcinogénesis además también se ha mostrado una marcada inhibición sobre la transcriptasa reversa del VIH (Marín, Porto, Alarcón, & Lavín, 2008). Por lo tanto,

la presencia de estos esteroides en *P. flexilis* es de una relevante importancia desde el punto de vista farmacológico.

### 3.5 Conclusiones

El extracto hexánico de *P. flexilis*, contiene Lup-20(29)-eno (1), Stigmasterol (2) y  $\beta$ -sitosterol (3). En el caso del lupeno, la asignación fue posible por la implementación de experimentos en la adquisición de datos de RMN y el uso de programas de asignación como herramienta novedosa en la caracterización de estructuras de alta complejidad como lo es el caso del Lup20(29)-eno.

### 3.6 Referencias

- Asakawa, Y. (1995). Chemical constituents of the bryophytes. In *Progress in the chemistry of organic natural products* (pp. 1–562). Springer.
- Asakawa, Y., & Ludwiczuk, A. (2017). Chemical Constituents of Bryophytes: Structures and Biological Activity. *Journal of Natural Products*, acs.jnatprod.6b01046. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01046>
- Brinkmeier, E., Geiger, H., & Zinsmeister, H. D. (2000). The Cooccurrence of Different Biflavonoid Types in *Pilotrichella flexilis*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 55(11–12), 866–869.
- Chaturvedula, V. S. P., & Prakash, I. (2012). Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*.
- Cullmann, F., & Becker, H. (1998). Terpenoid constituents of *Pellia epiphylla*. *Phytochemistry*, 47(2), 237–245.
- Dewick, P. M. (2002). The biosynthesis of C 5–C 25 terpenoid compounds. *Natural Product Reports*, 19(2), 181–222.
- Geiger, H. (1990). Biflavonoids in bryophytes. *Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy*, 161–170.
- Grammes, C., Burkhardt, G., & Becker, H. (1994). Triterpenes from *Fossombronia liverworts*. *Phytochemistry*, 35(5), 1293–1296.
- Marín, R. M., Porto, R. M. O., Alarcón, A. B., & Lavín, A. N. V. (2008). Caracterización por cromatografía de gases/espectrometría de masas del extracto apolar de las hojas de *Clusia minor* L. *Lat. Am. J. Pharm*, 27(5), 747–751.
- Mues, R. (2000). Chemical constituents and biochemistry. *Bryophyte Biology*, 150–

181.

- Patiño, O. J., Prieto, J. A., Lozano, J. M., Lesmes, L., & Cuca, L. E. (2011). Propiedades antibacterianas in vitro de metabolitos secundarios aislados de dos especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae). *Revista Cubana de Farmacia*, 45(3), 431–438.
- Sanders, S. (1996). Phytochemische Untersuchungen der Lebermoose *Jamesoniella rubricaulis* (Nees) Grolle und *Lepidozia reptans* (L.) Dum.
- Wenkert, E., Baddeley, G. V., Burfitt, I. R., & Moreno, L. N. (1978). Carbon- 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally- occurring substances- LVII Triterpenes related to lupane and hopane. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 11(7), 337–343.
- Wilson, A. D., & Kent, B. E. (1972). A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. *British Dental Journal*, 132(4), 133–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4501690>



## 4. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE CUATRO EXTRACTOS DE *Pilotrichella flexilis* (Hedw.) Angstr.

### 4.1 Resumen

Los organismos están expuestos a eventos que generan una oxidación que produce una reacción en cadena causando daños en diversos sistemas, entre los productos naturales existen compuestos que actúan como antioxidantes por lo que en el presente trabajo se dan a conocer los resultados del estudio de capacidad antioxidante de *Pilotrichella flexilis* una especie que pertenece a los musgos (Bryophyta). La colecta de *P. flexilis*, se hizo en la localidad de La mojonera, Zacualtipán de Ángeles, Hidalgo. La capacidad antioxidante de cuatro extractos de diferente polaridad de *P. flexilis* se determinó mediante la cuantificación de fenoles y flavonoides, utilizando ácido gálico y catequina como referencia, respectivamente. Asimismo se evaluó la capacidad antioxidante por los ensayos estandarizados DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power) y ABTS (2,2'-azino-bis(3 etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) adecuados a microplacas. Los resultados demostraron que el extracto de acetato de etilo presentó el mayor contenido de fenoles y flavonoides totales ( $274 \pm 19.00$ ,  $104.45 \pm 0.47$ , mg EAG/g<sub>ext</sub> y mg EC/g<sub>ext</sub>, respectivamente) así como la mayor capacidad antioxidante por los tres ensayos DPPH, FRAP, ABTS ( $765.94 \pm 31.95$ ,  $331.01 \pm 22.52$  y  $832.01 \pm 21.37$   $\mu\text{mol ET/g}_{\text{ext}}$ , respectivamente) además se encontró que la concentración de extracto de AcOEt que inhibe el 50 % del radical libre DPPH (CI<sub>50</sub>) fue 0.028 mg/mL. Los resultados obtenidos muestran que la especie contienen compuestos que pueden ser utilizados como posibles antioxidantes naturales.

**Palabras Clave:** Musgos, capacidad antioxidante, Fenoles Totales, *Pilotrichella felxilis*

---

Tesis: Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo.  
Autor: Cinthia Mejía Lara  
Director de Tesis: Dr. Holber Zuleta Prada

## EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY OF FOUR EXTRACTS OF *Pilotrichella flexilis* (Hedw.) Angstr.

### 4.2 Abstract

The organisms are exposed to events that generate an oxidation that produces a chain reaction causing damage in various systems, among the natural products there are compounds that act as antioxidants, so in this work the results of the study of antioxidant capacity are made known. of *Pilotrichella flexilis* a species belonging to mosses (Bryophyta). The *P. flexilis* collection was made in the town of La Mojonera, Zacualtipán de Ángeles, Hidalgo. The antioxidant capacity of four extracts of different polarity of *P. flexilis* was determined by quantification of phenols and flavonoids, using gallic acid and catechin as a reference, respectively. Likewise, the antioxidant capacity was evaluated by standardized assays DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (Ferric Reducing / Antioxidant Power) and ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) ) suitable for microplates. The results showed that the ethyl acetate extract had the highest total phenol and flavonoid content ( $274 \pm 19.00$ ,  $104.45 \pm 0.47$ , mg EAG / gext and mg EC / gext respectively) as well as the highest antioxidant capacity by the three tests DPPH, FRAP, ABTS ( $765.94 \pm 31.95$ ,  $331.01 \pm 22.52$  and  $832.01 \pm 21.37$   $\mu\text{mol ET / gext}$ , respectively) it was also found that the concentration of AcOEt extract that inhibits 50% of the free radical DPPH ( $\text{IC}_{50}$ ) was 0.028 mg / mL. The results obtained show that the species contains compounds that can be used as possible natural antioxidants.

**Key word:** Moss, antioxidant activitie, Phenols Total, *Pilotrichella felxilis*

---

Thesis: Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Cinthia Mejía Lara

Advisor: Dr. Holber Zuleta Prada

### 4.3 Introducción

Las plantas son un recurso de un amplio grupo de metabolitos secundarios, los diferentes grupos taxonómicos difieren dentro de sus compuestos, las briófitas por sus características primitivas y las presiones ambientales a las que se exponen, son estimulados para sintetizar compuestos para su protección contra patógenos como las bacterias y factores abióticos como la desecación, ante esto es necesaria su protección antioxidante (Goffinet et al., 2009). Este grupo de plantas posee una fuerte maquinaria de compuestos antioxidantes que les ayuda a hacer frente a los extremos climas y tensiones. En México, aunque los briófitos sean plantas muy comunes, sus propiedades no han sido completamente explotadas con fines medicinales importantes.

Los organismos están expuestos a un conjunto de radicales libres que tienen la capacidad de producir daños oxidativos, a estos se les denomina Especies Reactivas del Oxígeno (ERO). Estos tienen orígenes distintos, desde mitocondrial hasta factores exógenos (ionización, contaminación, estrés). Estas especies se forman de manera natural como producto del metabolismo del oxígeno, tienen un rol importante en las señales celulares. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) no se pueden evitar pues son producto del metabolismo celular. Algunas por mencionar o las más comunes incluyen peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el ion superóxido ( $O_2^-$ ), radicales hidroxilo ( $\cdot OH$ ), óxido nítrico y el anión peroxinitrilo ( $ONOO^-$ ). Estas especies son causantes del estrés oxidativo, fenómeno que está asociado con el desarrollo de enfermedades como cáncer, enfermedades. Por lo tanto los organismos desarrollan defensas para poder contrarrestar los daños que las ERO provocan a nivel celular, como posibles está la síntesis de compuestos para la protección misma como los compuestos fenólicos (Gill & Tuteja, 2010).

Los componentes fenólicos constituyen uno de los grupos presentes en el reino vegetal. Dentro de la clasificación general se encuentran los fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides, que constituyen un amplio grupo de sustancias químicas consideradas metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y propiedades (Cheynier, Comte, Davies, Lattanzio, & Martens, 2013).

Estos compuestos absorben radiación en la región UV del espectro electromagnético protegiendo de la radiación solar a los tejidos vegetales más sensibles. Los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo oxhidrilo (Bedascarrasbure, Maldonado, Álvarez, & Rodríguez, 2004). Mientras que los flavonoides están conformados por una estructura básica que consiste en 2 anillos bencénicos en los extremos de la molécula, unidos por un anillo de 3 átomos de carbono a la que se le pueden adicionar grupos tales como oxhidrilos, metilos, azúcares, etc., generándose de esta manera diferentes tipos de flavonoides tales como flavonoles, flavanonas, flavonas, catequinas, antocianinas e isoflavonoides (Bedascarrasbure et al., 2004).

Para determinar la capacidad antioxidante existen diversos métodos que prueban dicho fenómeno en los extractos vegetales los más comunes son DPPH y FRAP. El ensayo ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonato de amonio) se basa en la capacidad para atrapar radicales presentes en el medio. El radical catiónico de color verde azulado  $ABTS^{\bullet+}$  se genera por la interacción del ABTS con persulfato de potasio. El radical  $ABTS^{\bullet+}$  es un compuesto estable y soluble en metanol. Por lo tanto, se evalúa la capacidad antioxidante de la muestra en función de la habilidad para disminuir la concentración del radical (Re et al., 1999).

DPPH $\bullet$  se caracteriza por ser un radical libre estable, que en disolución metanólica presenta un color violeta intenso con una fuerte absorción a 515 nm. Cuando la solución de DPPH $\bullet$  se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno (antioxidante), reduce al radical DPPH $\bullet$  con la pérdida del color violeta, el cual es estequiométrico con respecto al número de electrones que capture, tornándose de violeta a un amarillo pálido (Molyneux, 2004).

El ensayo FRAP fue desarrollado originalmente por Benzie & Strain (1996) para medir el poder reductor en muestras de plasma, sin embargo, también se ha adaptado y utilizado para el ensayo de antioxidantes en productos botánicos (Drake et al., 2014). La reacción mide la reducción del complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), en la cual el hierro férrico ( $Fe^{3+}$  - TPTZ) se reduce a ión ferroso a bajo pH, causando la formación de un complejo ferroso-tripiridil-triazina coloreado

(Fe<sup>2+</sup> - TPTZ), que absorbe a una longitud de onda de 593 nm (Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008) .

En los últimos años la demanda de nuevos compuestos con actividad antioxidante, ha estimulado una búsqueda continua de compuestos derivados de plantas. Por lo tanto, el desarrollo de antioxidantes eficaces de origen natural es de gran interés. Investigaciones farmacológicas recientes de briófitas (musgos) han probado que los principios activos presentes en estas plantas son absolutamente únicos y tienen usos terapéuticos potenciales como antimicrobianos, antioxidantes, antitumorales, antidotales, antipiréticos, diuréticos y antisépticos, entre otras (Asakawa & Ludwiczuk, 2017).

En este trabajo se ha analizado por primera vez, la actividad antioxidante de cuatro extractos (hexánico, metanólico, acetato de etilo y acuoso) del musgo *Pilotrichella flexilis*, colectado en un bosque de *Fagus*, en el estado de Hidalgo y los datos han indicado su potencialidad para ser utilizado como una posible fuente para el desarrollo de antioxidantes.

#### **4.4 Materiales y Métodos**

##### **4.4.1 Equipo**

La medición de absorbancias para cuantificar fenoles totales y flavonoides totales, así como la evaluación de la capacidad antioxidante, se llevó a cabo en un lector de microplacas equipado con bombas de inyección automática y el software de análisis de datos Gen5™ data (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA).

##### **4.4.2 Reactivos**

Reactivo de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2,2-Difenyl-1-picrilhidrazilo (DPPH), 6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchomane-2-carboxylic acid (Trolox), nitrito de sodio al 5%, cloruro de aluminio hexahidratado, hidróxido de sodio al 5%, catequina, [2,2-azinobis (3-ethyl- benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), persulfato de sodio, acetato de sodio trihidratado, 2,4,6 Tripiridil-s triazina (TPTZ),

ácido clorhídrico (HCl) y el cloruro férrico hexahidratado  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20mM (Iron (III)), fueron adquiridos de Sigma Aldrich.

#### **4.4.3 Material Vegetal**

El material identificado como *P. flexilis* se colectó en la localidad “La Mojonera” municipio de Zacualtipán de Ángeles, Estado de Hidalgo, durante el mes de septiembre de 2016, en las coordenadas geográficas: 20° 38' 0.33" N, 98°35'51.8" E. A una altitud que oscila entre los 1,780-1,950 msnm. Un ejemplar fue depositado en el Herbario del departamento de Preparatoria Agrícola, Área de Biología en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) No.34591. El material seco se pulverizó mecánicamente mediante un procesador “Nutribuller”, se le adicionaron 1.5 litros de metanol y se dejó macerar por tres días, se decantó el metanol y se concentró en un evaporador rotatorio, esta misma operación se repitió cuatro veces para obtener el extracto metanólico. El extracto obtenido de la maceración se llevó a sequedad. El extracto de metanol se le hizo partición, adicionando mezcla de metanol-agua (3:2) para diluir, se evaporó el metanol y a la fracción remanente se le agregó hexano, que se adicionó por 4 veces más. De igual manera se le agregó acetato de etilo para finalmente obtener los cuatro extractos, Acuoso, metanol, acetato de etilo y hexano.

#### **4.4.4 Actividad Antioxidante**

Los extractos se diluyeron a una concentración adecuada de acuerdo con cada una de las pruebas aplicadas (CFT, FT, DPPH, ABTS, FRAP), de tal manera que se obtuviesen datos dentro del intervalo de cada una de las curvas de calibración.

##### Contenido de Fenoles Totales (CFT)

Los fenoles totales fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu adaptado a microplacas (Singleton & Rossi, 1965). En una microplaca de 96 pozos se mezclaron, en cada pozo, el extracto a evaluar (25  $\mu\text{L}$ ), agua destilada (125  $\mu\text{L}$ ) y reactivo de Folin-Ciocalteu (1:10) (20  $\mu\text{L}$ ) y  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20 % (30  $\mu\text{L}$ ). La mezcla de reacción se agitó y se dejó reposar durante 30 min en ausencia de luz, las absorbancias frente al blanco fueron medidas a 765 nm. Por otro lado, se preparó

una curva de calibración en un rango de concentración de 0.001 a 0.01 mg mL<sup>-1</sup> de ácido gálico. La ecuación obtenida de la curva fue utilizada para determinar la concentración de fenoles totales en la muestra. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg EAG/g<sub>ext</sub>).

#### Flavonoides Totales (FT)

El contenido de flavonoides fue determinado por el método de Kubola & Siriamornpun (2011). En un tubo falcón se mezclaron 0.5 mL del extracto, 2.5 mL de agua destilada, 0.15 mL de NaNO<sub>2</sub> al 5 %, después de 6 minutos se adicionaron 0.3 mL de AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O. La mezcla se dejó reposar durante 5 min y enseguida se agregó 1 mL de NaOH (5 %); las muestras fueron agitadas en vortex (3,000 rpm, 3 min). Finalmente se transfirieron 200 µL de cada muestra a los pozos de la microplaca y se midió la absorbancia a 510 nm.. Por otro lado se preparó una curva de calibración de catequina en el rango de concentraciones 5 a 29.5 µg de catequina / mL. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de catequina por gramo de extracto (mg EC/g<sub>ext</sub>).

#### *Ensayo de decoloración del catión radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).*

La actividad antioxidante de los extractos se evaluó de acuerdo con la metodología de Cheng, Moore, & Yu (2006) adaptado a microplacas. En los pozos de una microplaca fueron mezclados 200 µL de una serie de diluciones de los extractos a diferentes concentraciones y 50 µL de disolución de DPPH (0.099 mM). Como blanco se empleó metanol al 80 % (250 µL) y como control una mezcla de metanol al 80 % (200 µL) y DPPH 0.099 mM (50 µL). La curva estándar de Trolox se preparó a concentraciones entre 7.37 y 34.51 µM. La microplaca fue agitada y conservada en oscuridad durante 30 min y las absorbancias se midieron a 515 nm. El porcentaje de DPPH degradado fue determinado de acuerdo a la siguiente ecuación. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto (µmol ET/g<sub>ext</sub>).

$$\% \text{ DPPH}^{\cdot} \text{ degradado} = \left( 1 - \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{A_{\text{control}} - A_{\text{blanco}}} \right) \times 100$$

Donde  $A_{\text{muestra}}$ ,  $A_{\text{blanco}}$ ,  $A_{\text{control}}$  representa la absorbancia del antioxidante de referencia o de la muestra, blanco y el control.

El porcentaje de reducción del DPPH fue graficado contra las concentraciones de las muestras y la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) fue calculada de la ecuación de regresión obtenida. Las determinaciones fueron llevadas a cabo por cuadruplicado.

#### *Ensayo FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power)*

El ensayo FRAP se llevó a cabo de acuerdo con el método de Benzie & Strain (1996) adaptado a microplacas. Se prepararon las siguientes disoluciones: buffer pH 3.6 (4.624 g de  $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$  y 18.2 mL  $C_2H_4O_2$ ), TPTZ (2, 4, 6 Tripiridil-s-triazina) 10 mM en HCl 40 mM y disolución  $FeCl_3 \cdot 3H_2O$  20 mM. La disolución FRAP fue preparada al momento de su uso mezclando en proporción 10:1:1 la solución buffer, solución TPTZ y  $FeCl_3 \cdot 3H_2O$ . En una microplaca de 96 pozos se colocaron 20  $\mu$ L de extracto o de la curva de Trolox, 180  $\mu$ L de la disolución FRAP y 60  $\mu$ L de agua destilada, como blanco fueron inyectados 200  $\mu$ L de la disolución FRAP y 60  $\mu$ L de agua destilada,. Después de 30 s se midió la absorbancia a 595 nm. . El intervalo de concentraciones de la curva de calibración de Trolox fue de 3.8-46.1  $\mu$ M.. Los resultaos se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto ( $\mu$ mol ET/ $g_{\text{ext}}$ ).

#### *Ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS $^{\cdot+}$ (2,2'-azino-bis(3 etilbenzotiazolina-6-sulfónico))*

Se empleó el método de Re et al. (1999), adaptado a microplacas. La disolución ABTS $^{\cdot+}$  se generó por la reacción entre una disolución de ABTS (40.6 mg ABTS/10 mL de agua destilada) y una disolución de persulfato de potasio (15.47 mg/ 25 mL de agua destilada). La mezcla de dichas disoluciones en una proporción 1:1, se dejó reposar durante 16 h. Posteriormente se tomó una alícuota de 600  $\mu$ L y se aforó a 10 mL con metanol 80%. Una alícuota de cada extracto (20  $\mu$ L) fue mezclada con la disolución ABTS $^{\cdot+}$  (180  $\mu$ L). La curva de referencia se construyó con el



reactivo Trolox en un rango de 4.99-59.30  $\mu\text{M}$ . La mezcla de reacción se dejó reposar durante 10 min protegida de la luz. La lectura de las absorbancias se hizo a 734 nm. Se utilizó como blanco 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de ABTS. Los resultados se expresaron como micromoles equivalentes de Trolox por gramo de extracto ( $\mu\text{mol ET/g}_{\text{ext}}$ ).

#### 4.4.5 Análisis estadístico

Las datos obtenidos en las diferentes pruebas de cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales así como para la capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP), se analizaron con independencia entre los extractos y se contrastaron con una prueba no paramétrica ANOVA de Kuskall-Wallis debido a que no se ajustaron a la normalidad. Los experimentos se llevaron a cabo usando un bloque de diseño al azar. Dentro de cada bloque cada tratamiento se hizo por triplicado. Estos análisis se llevaron a cabo con el programa STATISTICA v.10 (StatSoft, 2011).

### 4.5 Resultados y Discusión

#### *CFT y FT*

Los resultados de los ensayos colorimétricos basados en los valores de absorbancia demostraron que existen diferencias significativas en la concentración de Fenoles Totales entre los extractos de *P. flexilis* de diferente polaridad ( $N = 48$ ,  $gl = 3$ ,  $H = 44.08$ ,  $p < 0.001$ , Figura 4.1). El contenido de fenoles totales más alto fue encontrado en los extractos de acetato de etilo ( $274.46 \pm 19 \text{ mg EAG}_{\text{ext}}$ ) y metanol ( $162.02 \pm 7.56 \text{ mg EAG/g}_{\text{ext}}$ ). En los extractos acuoso y hexánico el contenido fenólico fue significativamente inferior ( $4.87 \pm 0.33$  y  $23.47 \pm 1.51 \text{ mg EAG/g}_{\text{ext}}$ ). En la prueba de flavonoides totales, solo tres extractos presentaron resultados positivos, ver Cuadro 4.1. El extracto de acetato de etilo también mostró el mayor contenido de Flavonoides Totales ( $104.45 \text{ c} \pm 3.47 \text{ mg EC/g}_{\text{ext}}$ ).

Cuadro 4.1 Cuantificación de la capacidad antioxidante con respecto a las pruebas

Extracto	CTF (mg EAG/g <sub>ext</sub> )	FT (mg EC/g <sub>ext</sub> )	ABTS (μmol ET/g <sub>ext</sub> )	DPPH (μmol ET/g <sub>ext</sub> )	FRAP (μmol ET/g <sub>ext</sub> )
Acuoso	4.87 a ± 0.34	4.14 a ± 0.06	23.46 a ± 1.30	10.99 a ± 0.52	6.30 a ± 0.71
Metanol	162.02 b ± 7.56	89.23 b ± 2.31	430.31 b ± 21.93	536.28 b ± 56.63	193.07 b ± 16.32
AcEtO	274.46 c ± 19	104.45 c ± 3.47	832.01 c ± 21.37	765.94 c ± 31.95	331.01 c ± 21.56
Hexano	23.47 d ± 1.51		89.21 d ± 6.51	37.68 d ± 6.10	37.87 d ± 2.14

Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Kruskal-Wallis ( $P \leq 0.01$ ). (±) Desviación estándar.

Los compuestos bioactivos encontrados en los musgos tienen diferente origen biosintético y son fenólicos, terpenoides y constituyentes volátiles (Saritas et al., 2001; Basile et al., 2011). Estos metabolitos secundarios influyen en diversas funciones dentro de la planta, como la asimilación de nutrientes, síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la alelopatía etc. (Stalikas, 2007; Khoddami, Wilkes, & Roberts, 2013).

Aunque la constitución química de *P. flexilis* no ha sido estudiada, en otras especies de musgos como *Atrichum*, *Dicranum*, *Mnium*, *Polytrichum* y *Sphagnum* sp, se han aislado polifenoles (Vladimír. Chobot et al., 2006). En los bosques de *Fagus*, lugar de colecta de *P. flexilis*, el clima es templado húmedo y la exposición a las radiaciones radiaciones UV es mínima, por lo tanto la producción de compuestos fenólicos podría estar asociada a las variaciones de temperatura a lo largo del año (-10 a 12 °C) (Rodríguez-Ramírez, Sánchez-González, & Ángeles-Pérez, 2013)

La influencia de la polaridad en los disolventes para la extracción de los compuestos afines a ellos puede estar relacionada con la diferencia significativa entre el contenido de compuestos fenólicos en los extractos (Sreejith et al., 2013).

En este trabajo se encontró que el contenido de fenoles totales en los extractos metánolico y de acetato de etilo fue superior al descrito por Vladimir Chobot et al. (2008) para el extracto etanólico de las especies *Atrichum undulatum*, *Polytrichum*

*formosum* y *Thuidium tamariscinum*:  $8.72 \pm 0.803$ ,  $4.38 \pm 0.806$  y  $3.2 \pm 0.773$  % con base en el ácido gálico.

En otras investigaciones, el contenido de fenoles totales para diversas especies de musgos se encuentra en el intervalo de  $3.33 \pm 0.02$  a  $8.21 \pm .04$  % (Ertürk et al., 2015). Cabe mencionar que en este caso el contenido fenólico es menor debido a que se determinó en el material vegetal seco.

El contenido de flavonoides en los diferentes extractos de *P. flexilis* mostró variaciones significativas, encontrándose un mayor porcentaje, en relación al CFT, en el extracto de AcOEt, ver Figura 4.1. De acuerdo con datos de la literatura, los musgos tienen una alta producción de flavonoides con respecto a otros grupos de briófitas (48 % musgos, 40% hepáticas). Los flavonoides, juegan un rol significativo en estas plantas que fueron desplazadas del ambiente acuático a la terrestre (Buer, Imin, & Djordjevic, 2010; Liu, Ju, & Xia, 2014).

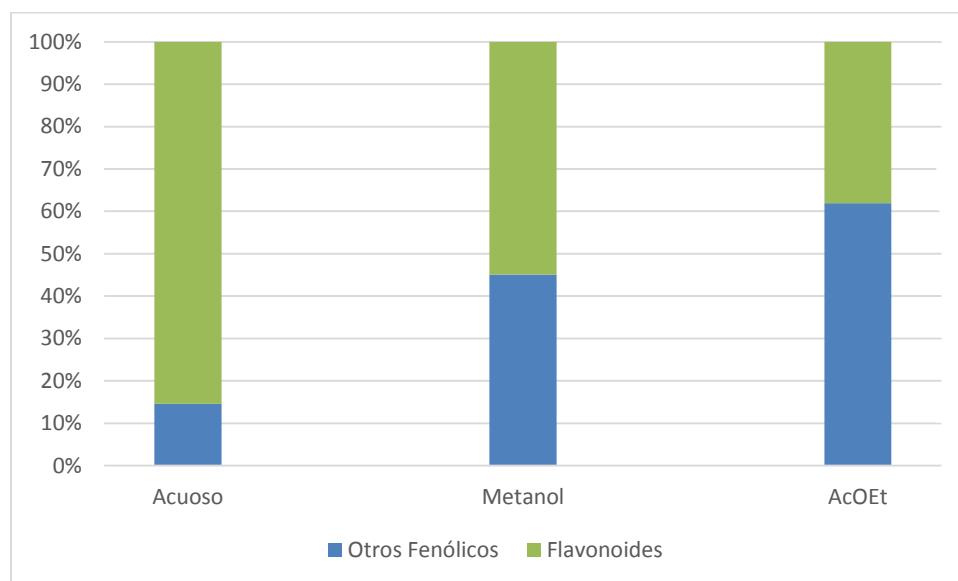


Figura 4.1 Contenido Total de Fenoles y Flavonoides en los extractos de *P. flexilis*.

En el presente estudio se usaron tres ensayos diferentes (ABTS, DPPH y FRAP) para evaluar la capacidad antioxidante, de acuerdo con la literatura es recomendable utilizar más de un método para la evaluación de la capacidad

antioxidante en los extractos vegetales, aquellos extractos que se comporten de la misma manera, al usar otras técnicas que actúan con mecanismos diferentes, reforzara la tendencia de los resultados para cada uno de los extractos. (Sacchetti et al., 2005).

Como se aprecia en el Cuadro 4.1, los extractos con mayor CFT, presentaron una mayor capacidad antioxidante, esto podría ser explicado considerando la estructura química de dichos compuestos, en la cual los anillos aromáticos unidos a grupos hidroxilo tiene la capacidad de atrapar radicales libres (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006; Khoddami et al., 2013).

Los cuatro extractos mostraron diferencias significativas con respecto a la capacidad antioxidante por los tres ensayos aplicados: ABTS (N = 48, gl = 3, H = 40.16, p < 0.001); DPPH (N = 60, gl = 3, H = 48.15, p < 0.001) y FRAP (N = 48, gl = 3, H = 44.09, p < 0.001). Los extractos con mayor capacidad antioxidante, respecto a las tres pruebas realizadas, fueron el de AcOEt y metanólico (Figura 4.2) mientras que los de menor eficiencia (p<0.001) proviene de los extractos acuoso y hexano. Los cuatro extractos evaluados exhibieron capacidad antioxidante, un hallazgo importante dada la falta de estudios que evalúan las propiedades antioxidantes de los extractos de los musgos.

De acuerdo con los resultados podemos deducir que los extractos son fuente de compuestos capaces de reducir el ión  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  (FRAP) por su capacidad de transferencia de electrones, además se puede inferir que en los extractos también contienen especies donantes de átomos de hidrógeno con respecto a la prueba (DPPH) (Magalhães et al., 2008).

Se sugiere el aislamiento de compuestos que estén involucrados en la bioactividad relacionada con las pruebas para antioxidantes; los musgos son plantas consideradas con alto potencial antioxidante, por ejemplo en especies como *Polytrichastrum alpinum* se aislaron los compuestos ohioensin F y G, los cuales inhibieron el 50% del radical libre DPPH a una concentración de 14,3  $\mu\text{g/mL}$ ,

resultando incluso más efectivos que la referencia (TROLOX,  $CI_{50} = 46,35 \mu\text{g/mL}$ ) (Bhattarai, Paudel, Lee, Oh, & Yim, 2009).

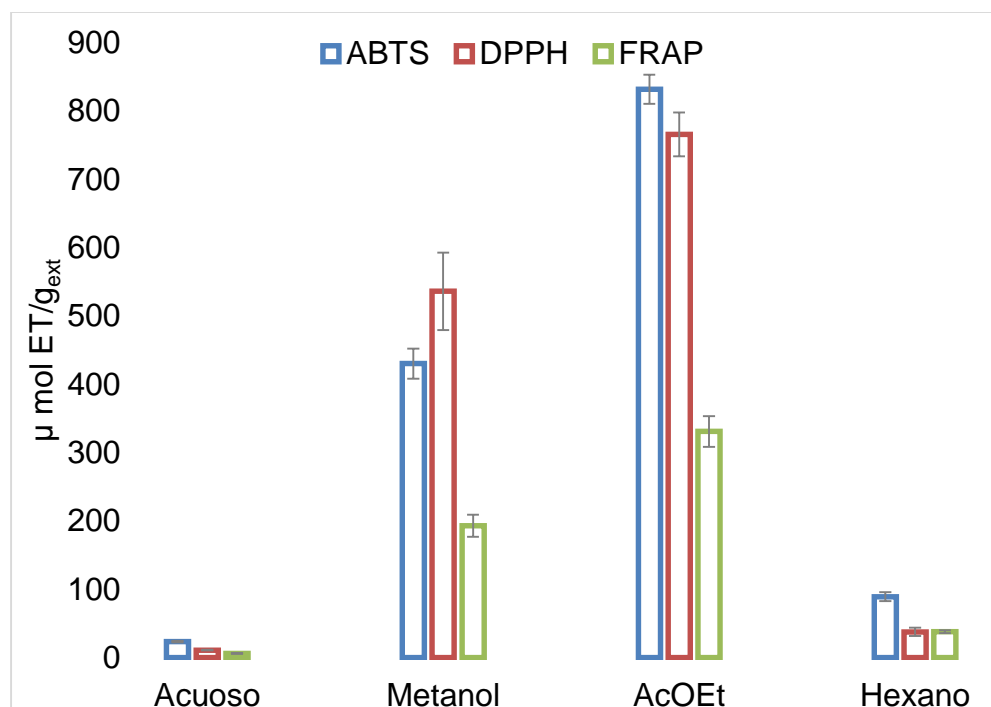


Figura 4.2 Comparaciones del contenido equivalente a TROLOX para los extractos estudiados.

Otro parámetro determinado por el ensayo DPPH fue la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) que representa la concentración necesaria para inhibir en un 50% el DPPH (Fig. 4.3). Un bajo valor indica una mayor capacidad antioxidante. Los extractos de AcOEt y metanólico poseen los valores más altos: 0.03 y 0.04 mg/mL respectivamente. De acuerdo con el análisis estadístico, la capacidad antioxidante entre los extractos de AcOEt y metanólico no presenta diferencias significativas entre ellas ( $N = 12$ ,  $gl = 3$ ,  $H = 10.38$ ,  $p < 0.001$ ; suma de rangos 5 y 2 respectivamente).

Aubad, Rojano, & Lobo (2007) estudiaron la capacidad antioxidante del extracto crudo de metanol en seis especies de musgos, el extracto del género *Sphagnum* spp obtuvo los mejores resultados en el ensayo ABTS con un  $CI_{50}$  32.7 mg/L Cl, por lo que se fraccionó en diferentes polaridades y encontraron un mejor resultado con polaridades de AcOET con un  $CI_{50}$  15 mg/L, estudios sobre la capacidad antioxidante han demostrado que el extracto de AcOEt resulta efectivo ante la capacidad antioxidante.

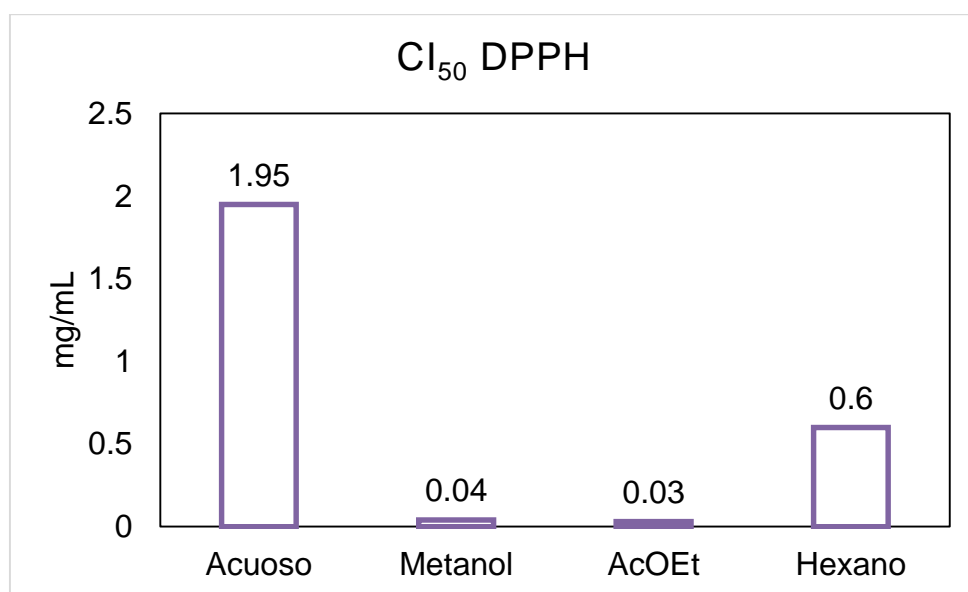


Figura 4.3 Valores de  $CI_{50}$  (mg/mL) de la actividad de los diferentes extractos para DPPH. (los valores del  $CI_{50}$  se calcularon del análisis por regresión lineal).

Adicionalmente se observa que los altos valores en CFT y FT también se presentan en las pruebas para ABTS, DPPH y FRAP lo que indica una correlación entre los compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante, en el cuadro 4.1 se muestra una relación directa para cada una de las pruebas, excepto para DPPH. La relación positiva de Fenoles y Flavonoides con antioxidantes podría darse por que los compuestos fenólicos por su estructura son considerados adecuados para ejercer una acción antioxidante, actuando como atrapadores de radicales libres (Ricco et al., 2010).

Cuadro 4.2 Correlación de Pearson entre los Fenoles y Flavonoides analizados y su actividad antioxidante ( $P < 0.001$ ).

	CFT	FT
ABTS	0.98	0.92
DPPH	-0.57	-0.54
FRAP	0.98	0.94

Los resultados indican el potencial de los extractos como agentes antioxidantes, por lo que podrían utilizarse medicinalmente para prevenir enfermedades. Por otro lado, un extracto consiste de una mezcla de compuestos que e juntos en conjunto podrían tener efectos sinérgicos o antagónicos. Por lo anterior, es complicado dar un resultado confiable de las reacciones reductoras de los antioxidantes presentes en el extracto, por lo tanto, sería de gran importancia separar las sustancias con capacidad antioxidante (Simić, Manojlović, Šegan, & Todorović, 2007). Los compuestos fenólicos de estos extractos podrían ser aislados, identificados y explorar su viabilidad como agentes antioxidantes.

#### 4.1 Conclusiones

El presente estudio demostró que los diferentes extractos de *P. flexilis* tiene una diferencia estadísticamente significativa con respecto a su capacidad atioxidante. El extracto de AcOEt fue el más promisorio ya que mostró mejores resultados por las diferentes técnicas probadas, por lo que sería recomendable separar e identificar los metabolitos secundarios de dicho extracto y aplicar bioensayos para determinar aquellos con actividad biológica.

#### 4.2 Referencias

Asakawa, Y., & Ludwiczuk, A. (2017). Chemical Constituents of Bryophytes: Structures and Biological Activity. *Journal of Natural Products*, acs.jnatprod.6b01046. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01046>

Aubad, P., Rojano, B., & Lobo, T. E. (2007). Actividad antioxidante en musgos. *Scientia Et Technica*, 33(33), 23–26.

Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants

- and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., & Rodríguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23, 369–372.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Bhattarai, H. D., Paudel, B., Lee, H. K., Oh, H., & Yim, J. H. (2009). In vitro antioxidant capacities of two benzonaphthoxanthones: Ohioensins F and G, isolated from the antarctic moss polytrichastrum alpinum. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 64(3–4), 197–200.
- Buer, C. S., Imin, N., & Djordjevic, M. A. (2010). Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 98–111.
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7429–7436.
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.009>
- Chobot, V., Kubicová, L., Nabbout, S., Jahodář, L., & Vytlačilová, J. (2006). Antioxidant and free radical scavenging activities of five moss species. *Fitoterapia*, 77(7–8), 598–600. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.06.010>
- Daniel, W. W. 2011. Bioestadística. 4a edición. Limusa Wiley, México.
- Drake, F. T., Mottey, N. E., Farrokhi, E. T., Florence, M. G., Johnson, M. G., Mock, C., ... Flum, D. R. (2014). Time to appendectomy and risk of perforation in acute appendicitis. *JAMA Surgery*, 149(8), 837–44. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2014.77>
- Ertürk, Ö., Sahin, H., Ertürk, E. Y., Hotaman, H. E., Koz, B., & Özdemir, Ö. (2015). The antimicrobial and antioxidant activities of extracts obtained from some moss species in Turkey, 61(4), 52–65. <https://doi.org/10.1515/hepo-2015-0031>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909–930.
- Goffinet, B., Buck, W. R., & Shaw, A. J. (2009). Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta. *Bryophyte Biology. Edition*, 2, 55–138.



- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, *18*(2), 2328–2375.
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, *127*(3), 1138–1145.
- Liu, S., Ju, J., & Xia, G. (2014). Identification of the flavonoid 3'-hydroxylase and flavonoid 3',5'-hydroxylase genes from Antarctic moss and their regulation during abiotic stress. *Gene*, *543*(1), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.03.026>
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, *613*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047>
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, *26*(2), 211–219.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9–10), 1231–1237.
- Ricco, R., Wagner, M., Portmann, E., Reides, C., Llesuy, S., Gurni, A., & Carballo, M. (2010). Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae). *Bol Latinoamer Caribe Plant Med Aromat*, *9*(5), 388–396.
- Rodríguez-Ramírez, E. C., Sánchez-González, A., & Ángeles-Pérez, G. (2013). Current distribution and coverage of Mexican beech forests *Fagus grandifolia* subsp. *mexicana* in Mexico. *Endangered Species Research*, *20*(3), 205–216. <https://doi.org/10.3354/esr00498>
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., & Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, *91*(4), 621–632.
- Saritas, Y., Sonwa, M. M., Iznaguen, H., König, W. A., Muhle, H., & Mues, R. (2001). Volatile constituents in mosses (Musci). *Phytochemistry*, *57*(3), 443–457. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00069-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00069-3)
- Simić, A., Manojlović, D., Šegan, D., & Todorović, M. (2007). Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, *12*(10), 2327–2340.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144–158.
- Sreejith, M., Kannappan, N., Santhiagu, A., Marathakam, A., Ajith, P. M., & Jasemine, S.

(2013). In vitro xanthine oxidase inhibitory and antioxidant activities of aerial parts of *Flacourtia sepiaria* Roxb. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 13(2), 113–120.

Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268–3295.

StatSoft. 2011 STATISTICA (data analysis software system), version 10.

[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

## 5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DE LOS EXTRACTOS DE *P. flexilis* (Hedw.) Angstr.

### 5.1 Resumen

El aumento a la resistencia antibacteriana, mundialmente se explora y valoran los productos naturales como recursos de nuevos y potentes agentes antimicrobianos. El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de *Pilotrichella flexilis* frente a patógenos bacterianos (*Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas* spp., *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*). La obtención de los extractos se realizó por particiones utilizando solventes de diferentes polaridades (acuoso, metanol, AcOEt y hexano). La evaluación de la sensibilidad bacteriana de los extractos se realizó mediante el método colorímetro de microdilución en caldo. Los resultados presentan que la mayor actividad antimicrobiana frente a los patógenos evaluados fue de los extractos metanolicos y AcOEt. En cuanto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) los resultados frente *Xanthomonas* spp. los extractos de metanol y AcOEt tuvieron una CMI de 4.5 mg/mL y contra *Micrococcus luteus* los mismos extractos presentaron una CMI de 4.25 mg/mL. Se concluye que las especies más sensibles fueron *Xanthomonas* y *Micrococcus* frente a los extractos de metanol y AcOEt.

Palabras clave: Antioxidante, musgo, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Escherichia*, *Listeria*

---

Tesis: Maestría en Ciencias en Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Cinthia Mejía Lara

Director de Tesis: Dr. Holber Zuleta Prada

## ANTIBIOTIC SUCCEPTIBILITY IN vitro OF FOUR EXTRACTS BY COLORIMETRIC TEST IN MICROPLATES

### 5.2 Abstract

The increase in antibacterial resistance, worldwide is explored and valued natural products as resources of new and powerful antimicrobial agents. The main objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of extracts of *Pilotrichella flexilis* against bacterial pathogens (*Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas* spp., *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*). The extracts were obtained by means of partitions using solvents of different polarities (aqueous, methanol, AcOEt and hexane). The evaluation of the bacterial sensitivity of the extracts was carried out using the broth microdilution colorimeter method. The results show that the highest antimicrobial activity against the pathogens evaluated was methanol extracts and AcOEt. Regarding the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) the results against *Xanthomonas* spp. The extracts of methanol and AcOEt had a MIC of 4.5 mg / mL and against *Micrococcus luteus* the same extracts presented a MIC of 4.25 mg / mL. It is concluded that the most sensitive species were *Xanthomonas* and *Micrococcus* versus the methanol and AcOEt extracts.

**Key Word:** Antioxidant, moss, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Escherichia*, *Listeria*

### 5.3 Introducción

La necesidad continua por contrarrestar la resistencia bacteriana a los antibióticos, ha impulsado la búsqueda de nuevos compuestos con mayor potencial antibacteriano, principalmente en plantas, las cuales poseen propiedades de defensa contra patógenos. De acuerdo a esto, el material vegetal se presenta como materia prima útil para la obtención de compuestos bioactivos, particularmente con actividad antimicrobiana (Ramirez & Marin Castaño, 2009).

A pesar de que las briófitas son un recurso vegetal diverso y abundante, los estudios enfocados a la búsqueda de sustancias con propiedades antibióticas, son de menor ocurrencia comparados con los de plantas vasculares. Por lo tanto es necesario seguir explorando a las briófitas, pues los estudios reportados presentan resultados positivos sugiriendo a este grupo como un recurso prometedor (Russell, 2010; Zhu et al., 2006).

Para poder evaluar la susceptibilidad de los microorganismos existen diversos métodos que nos pueden ayudar a tener respuestas sobre esta capacidad en los extractos o compuestos activos, se han propuesto métodos colorimétricos como prometedores alternativos para evaluar pruebas de susceptibilidad en microorganismos, estos métodos consisten en el uso de sales de tetrazolio como reductores indicadores de células metabólicamente activas, dando como resultado formazan soluble, este resultado puede ser fácilmente cuantificado en un equipo lector de placas medido a una absorbancia que dependerá del reactivo en uso (Li et al., 2010; Tunney, Ramage, Field, Moriarty, & Storey, 2004).

El Cloruro de 2,3,5-trifenil tetrazolio (TTC) es un ejemplo de estas sales, después de ser agregado en el ensayo para la prueba de susceptibilidad (0.02 % TTC) y una incubación de 30 minutos, el formazan producido puede ser medido a una absorbancia de 540 nm (Kim et al., 2010; Knezevic & Petrovic, 2008). La gran mayoría de las aplicaciones con sales de tetrazolio implican ensayos en microplacas que miden la proliferación celular. Además, se han utilizado en ensayos colorimétricos para la prueba de susceptibilidad

antimicrobiana de bacterias (Meletiadis et al., 2001; Tsukatani et al., 2008; Tunney et al., 2004).

El objetivo de este estudio fue determinar por primera vez la actividad antibacteriana sobre cuatro bacterias *Clavibacter michigalensis*, *Xanthomonas* spp, *Echerichia coli* K12 y *Micrococcus luteus* CDBB1018, de *P. flexilis* de los extractos acuoso, metanol, acetato de etilo y hexano por métodos colorimétricos adaptados a microplacas.

## 5.4 Materiales y Métodos

### 5.4.1 Obtención del material vegetal

El material fue colectado en la localidad “La Mojonera” municipio de Zacualtipán de Ángeles, Estado de Hidalgo (Fig. 5.1), durante el mes de septiembre de 2016, en las coordenadas geográficas: 20° 38' 0.33" N, 98°35'51.8" E. A una altitud que oscila entre los 1,780-1,950 msnm. El material fue identificado como *P. flexilis* por la Biol. Cinthia Mejía Lara. De acuerdo a la descripción indicada en The Moss Flora of Mexico (Sharp et al., 1994). Un ejemplar fue depositado en el Herbario del departamento de Preparatoria Agrícola, Área de Biología en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) No.34591.

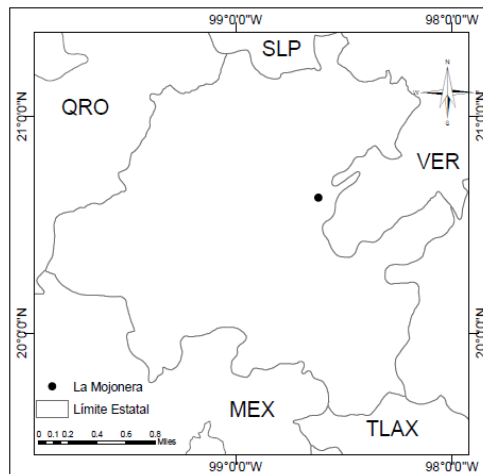


Figura 5.1 Lugar de colecta. Zacualtipán de Ángeles. Estado de Hidalgo

En este estudio se usaron cuatro bacterias, dos de importancia fitopatogena y dos homologas patógenas para el humano. *Clavibacter michigalensis*, *Xanthomonas* spp, *Echerichia coli* K12 y *Micrococcus luteus* CDBB1018. Para homogenizar el crecimiento

bacteriano se inocularon en medio de cultivo líquido [Caldo Nutritivo (*C. michiganensis*, *Xanthomonas*, *E. coli*) y Medio Cerebro-corazón (*Micrococcus*)] hasta lograr una turbidez estándar de 0.5 de McFarland, medida a una absorbancia de 600 nm en un espectrofotómetro, de acuerdo con la escala, la densidad de bacterias aproximada correspondiente es  $1 \times 10^8$ .

#### **5.4.2 Preparación de los extractos**

Se preparó una solución stock de los cuatro extractos (acuso, metanol, AcOEt y hexano), se pesaron 0.1 g y se diluyeron en 20 mL de DMSO al 10%. Para lograr una concentración de 5 mg/mL.

#### **5.4.3 Suceptibilidad bacteriana por método colorimétrico usando Cloruro de 2,3,5.trifeniltetrazolio (TTC)**

El ensayo se realizó por el método colorimétrico de óxido-reducción usando Cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio (TTC) que ha sido propuesto como un indicador de crecimiento bacteriano combinado con el método de microdiluciones, el ensayo se llevo a cabo en microplacas de 96 pozos con fondo en "U" (Eloff, 1998)

A partir de nuestra disolución stock se tomaron cinco alícuotas (150, 120, 90, 60, 30  $\mu$ L) de cada extracto. Se colocaron en cada uno de los pozos las diferentes alícuotas posteriormente se adicionó caldo nutritivo (0, 30, 60, 90, 120 respectivamente) finalmente se agrego 50  $\mu$ L de bacteria. Cada pozo tuvo un total de 200  $\mu$ L en cada pozo. Se usaron dos controles: Positivo (75  $\mu$ L de Etanol, 75  $\mu$ L medio de cultivo y 50  $\mu$ L bacteria) y Negativo (150  $\mu$ L medio de cultivo y 50  $\mu$ L bacteria).

Las microplacas se sellaron con papel parafilm para evitar contaminación y se colocaron en una incubadora con agitación orbital Marca SEV Prendo Modelo INO-650 M, dejando reposar a 120 rpm durante 24 horas a 37 °C. Arreglo experimental Figura 5.2.

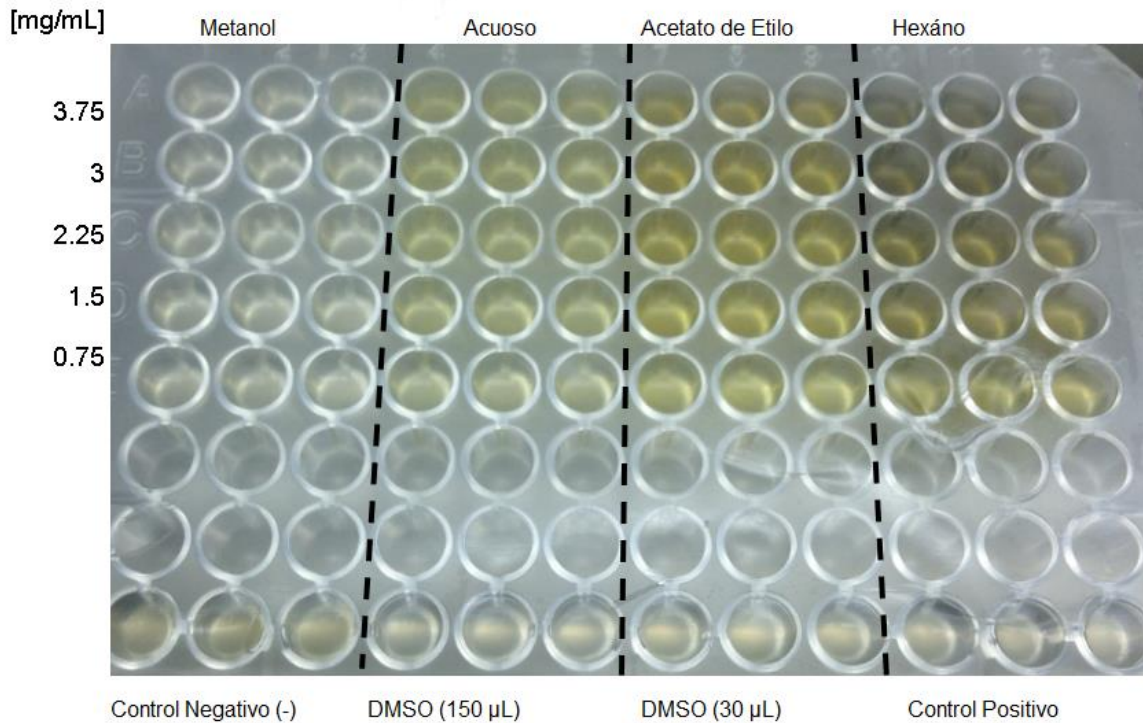


Figura 5.2 Arreglo experimental del efecto antibacteriano.

Una vez concluido el periodo de incubación se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de TTC (20 mg/ mL) se dejó reposar 30 minutos. Un cambio de color de blanco a rojo indica crecimiento del microorganismo evaluado (Fig 5.3).

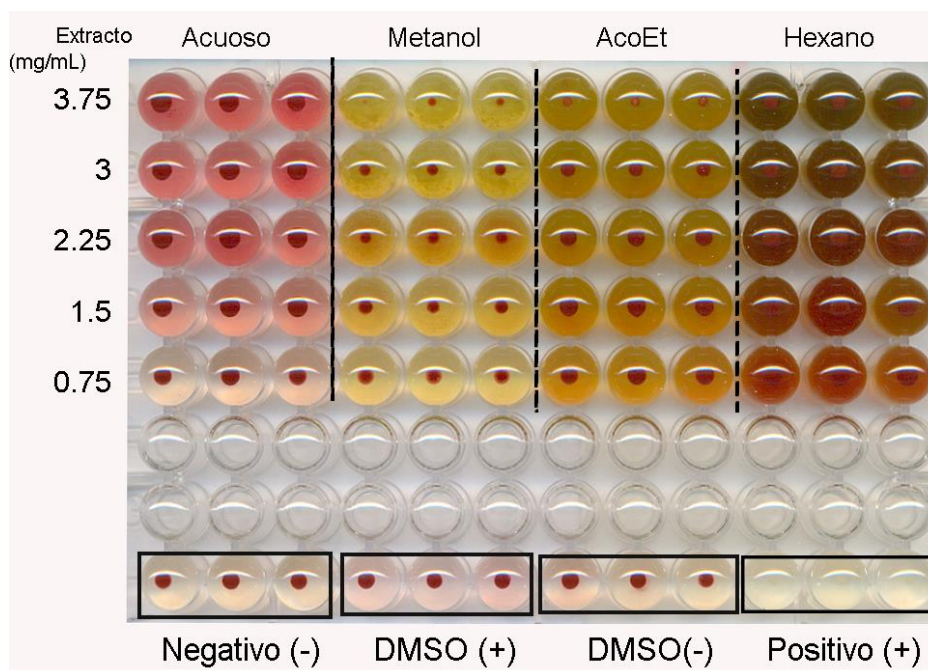


Figura 5.3 Ensayo de los extractos sobre *Clavibacter* después de adicionar TTC



La microplaca se escaneó y se leyó el pellet formado en los pozos a una absorbancia de 540 nm en un lector de microplacas Synergy 2 Marca Biotek para obtener datos cuantitativos de la inhibición de los extractos sobre las bacterias.

#### **5.4.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de agentes antimicrobianos (en unidades/mL) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas a 37 °C (Horna, Silva, Vicente, & Tamariz, 2012)

La CMI se determinó para aquellos extractos que de acuerdo con los ensayos evaluados tuvieron una inhibición con diferencia significativa respecto al control negativo, el ensayo se evaluó por microdiluciones aumentando las concentraciones hasta encontrar la CMI. De la misma manera que en el ensayo para la sensibilidad, se cultivaron las cepas en medio líquido hasta alcanzar una lectura de 0.5 a 600 nm en la escala de Mc Farland se incubaron a 37°C por 24 horas, al término de este tiempo se adicionó 10 µL TTC. El valor de CMI se tomó como la menor concentración del extracto que inhibió visiblemente el crecimiento bacteriano por la reacción de TTC después de la incubación.

#### **5.4.5 Análisis Estadístico**

Se compararon los tratamientos por separado para cada cepa bacteriana mediante una ANOVA no paramétrica de Friedman (Daniel, 2011) para muestras dependientes, considerando que los extractos provienen de una sola colecta (principio de dependencia) y que los valores de absorbancia obtenidos no se ajustan a una distribución normal.

Se señala, que a mayor absorbancia menor actividad antibacteriana. Una vez identificada la concentración con mayor actividad se compararon los extractos mediante una prueba de Kruskal-Wallis, considerando la independencia de las preparaciones. Los experimentos se llevaron a cabo usando tres bloques de diseño al azar. Dentro de cada tratamiento por bloque cada tratamiento se realizaron 3 réplicas. Estos análisis se realizaron con el programa STATISTICA v.10 (StatSoft, 2011).

## 5.5 Resultados

### 5.5.1 Actividad Antibacteriana

Los extractos evaluados presentaron diferencias significativas entre las concentraciones y los extractos sobre las cepas evaluadas en este estudio a continuación se describen los resultados estadísticos de los ensayos analizados.

#### *Clavibacter michiganensis*

Existen diferencias significativas en la actividad antibacteriana sobre *C. michiganensis* para los diferentes extractos y con respecto a los controles (N = 36, gl = 6, Friedman = 127.33,  $p < 0.001$ , Figura 5.4). En cuanto a los extractos, el de metanol y acetato de etilo (rango promedio = 16.44 y 5.55), tiene diferencias significativas contra el acuoso y hexano (rango promedio= 23.33 y 28.66) (H = 24, N = 36, gl = 3,  $p = 0.002$ ). La tendencia indica que a una concentración de 3.75 mg/mL, los extractos metanol y AcOEt tiene un rango de absorbancia menor y por lo tanto una mayor actividad.

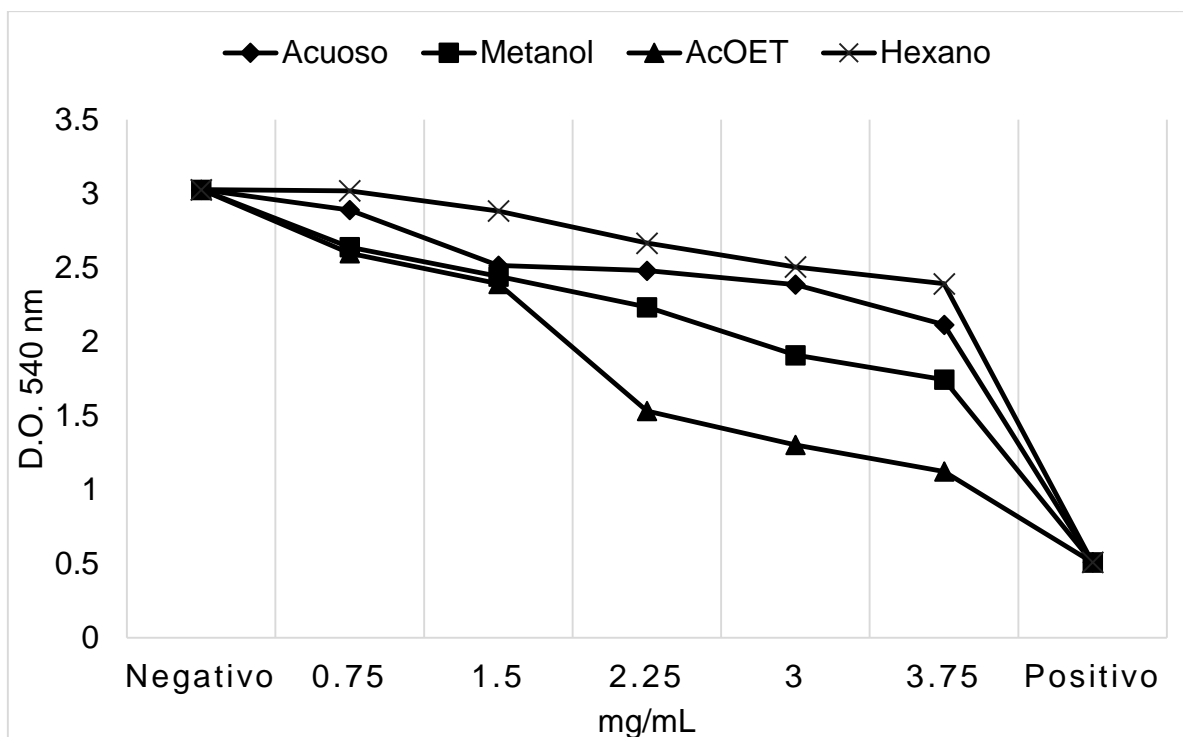


Figura 5.4 Promedios de formazan formado medido a una absorbancia de 540 nm, después del tratamiento sobre la bacteria *C. michiganensis*

### *Xanthomonas* spp.

Existen diferencias significativas en la actividad antibacteriana sobre *Xanthomonas* para los diferentes extractos y con respecto a los controles (N = 36, gl = 6, Friedman = 173.73,  $p < 0.001$ , Figura 5.5), el extracto de metanol y AcOEt tienen los rangos menores (suma de rangos = 7.2 y 11 respectivamente) y no difieren entre ellos. El extracto acuoso no tiene una actividad significativa con respecto al extracto hexánico (suma de rangos = 23 y 31,  $p = 0.4$ ) y el metanol (suma de rangos = 321  $p < 0.001$ ).

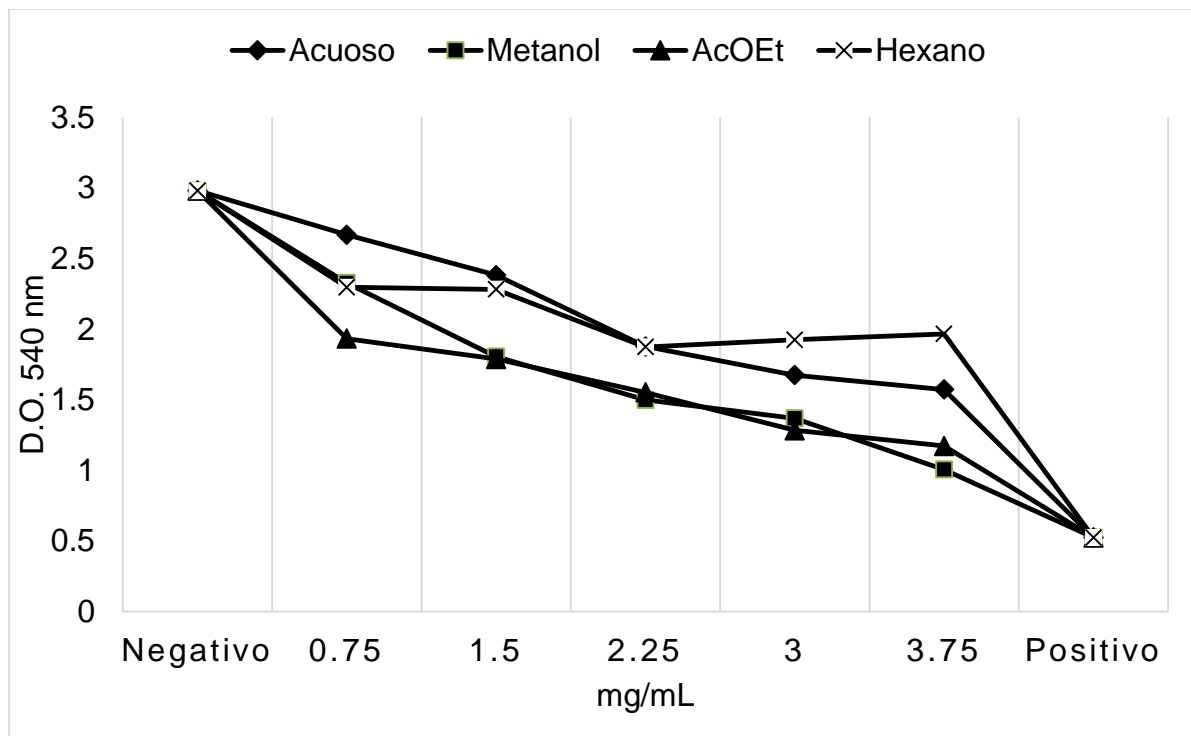


Figura 5.5 Promedios de formazan formado medido a una absorbancia de 540 nm, después del tratamiento sobre la bacteria *Xanthomonas* spp.

### *Escherichia coli* K12

Existen diferencias significativas en la actividad antibacteriana de las diluciones (N = 36, gl = 6, Friedman = 95.73,  $p < 0.001$ , Fig.5.6). No existe diferencia significativa entre los extractos acuoso, metanol y AcOEt (suma de rangos= 7, 16 y 18 respectivamente,  $p=0.001$ ), el extracto de hexano resulto ser el menos eficiente y significativamente diferente con respecto a los demás extractos (suma de rangos= 32,  $p < 0.01$ ).

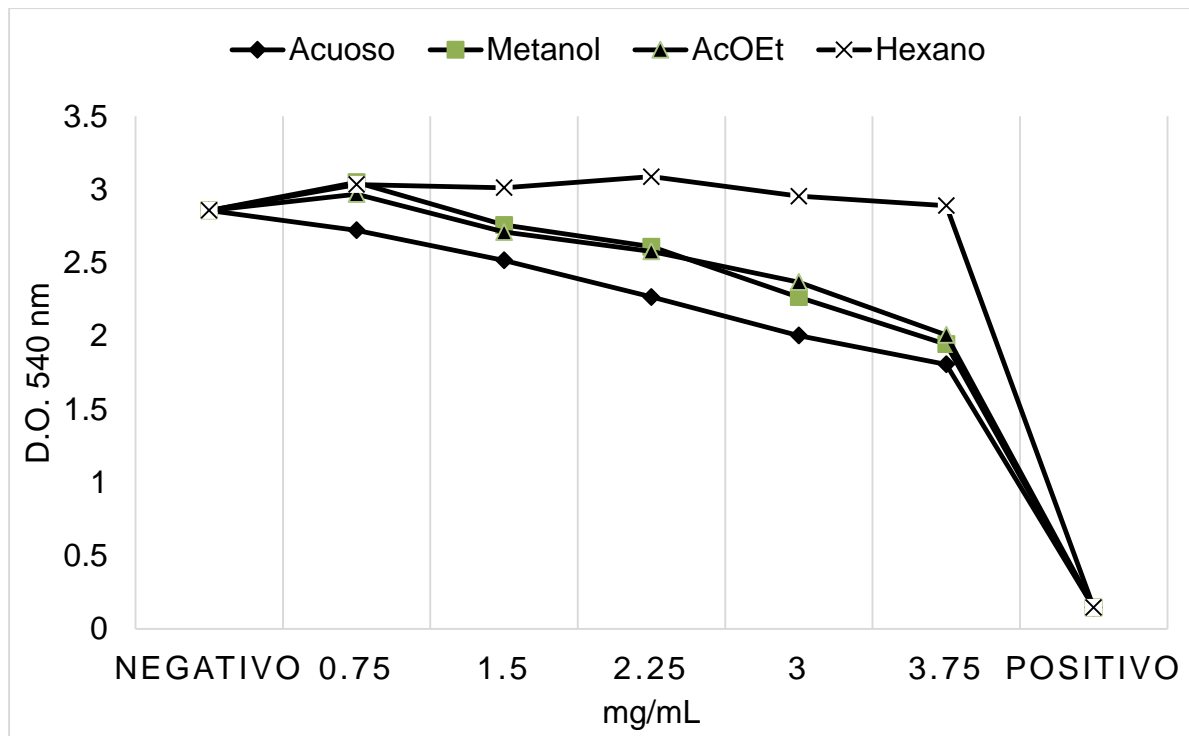


Figura 5.6 Promedios de formazan formado medido a una absorbancia de 540 nm, después del tratamiento sobre la bacteria *E. coli*

#### *Micrococcus luteus.*

Existen diferencias significativas en la actividad antibacteriana de las diluciones (N= 36, gl = 6, Friedman = 87.39,  $p < 0.001$ , Fig 5.7), pero solo con respecto al control negativo (Metanol, rango promedio = 1, Abs =  $0.16 \pm 0.03$ ). El resto de las diluciones no tiene actividad (rango promedio a  $150 \mu\text{l}$  = 4.21, Abs =  $2.14 \pm 0.71$ ; rango promedio a  $120 \mu\text{l}$  = 4.17, Abs =  $2.16 \pm 0.59$ ; rango promedio a  $90 \mu\text{l}$  = 5.17, Abs =  $2.32 \pm 0.45$ ; rango promedio a  $60 \mu\text{l}$  = 4.83, Abs =  $2.32 \pm 0.37$ ; rango promedio a  $30 \mu\text{l}$  = 4.29, Abs =  $2.32 \pm 0.23$ ), considerando el valor obtenido en el control positivo (rango promedio = 4.33, Abs =  $2.21 \pm 0.08$ ).

No obstante, aun cuando no existen diferencias entre diluciones, si hay diferencias entre extractos, siendo el metanol (suma de rangos 5) el que tiene mayor actividad con respecto al AcOEt (suma de rangos 23,  $p < 0.01$ ) y hexano (suma de rangos 32,  $p < 0.001$ ). El extracto acuoso (suma de rangos 14) solo resulta ser más eficiente con respecto al hexano.

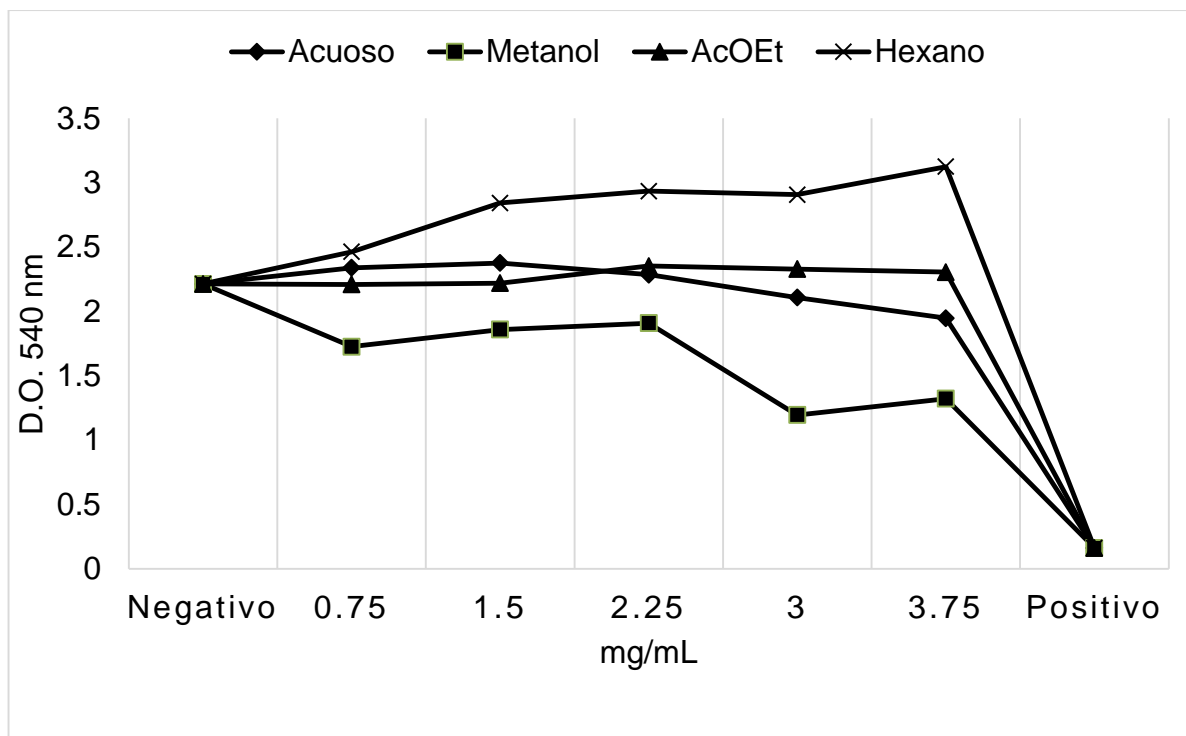


Figura 5.7 Promedios de formazan formado medido a una absorbancia de 540 nm, después del tratamiento sobre la bacteria *M. luteus*

### 5.5.2 Concentración Mínima Inhibitoria

Derivados del análisis de los datos estadísticos los extractos con mayor efecto inhibitorio sobre las bacterias estudiadas, fueron el extracto metanolico y de acetato de etilo, las concentraciones aplicadas sobre los microorganismos fueron 4.00, 4.25, 4.50, 4.75 y 5.00 mg/mL, de acuerdo a la definición de CMI las concentració que inhibió el crecimiento bacteriano visible para *Clavibacter* fue de 5 mg/mL para el extracto de AcOET, el extracto de metanol no inhibió a la concentración más alta probada, *Xanthomonas* resultó sensible a los dos extractos probados (metanol y AcOEt) la concentración mínima inhibitoria fue de 4.5 mg/mL para los dos extractos. (Fig. 5.8)

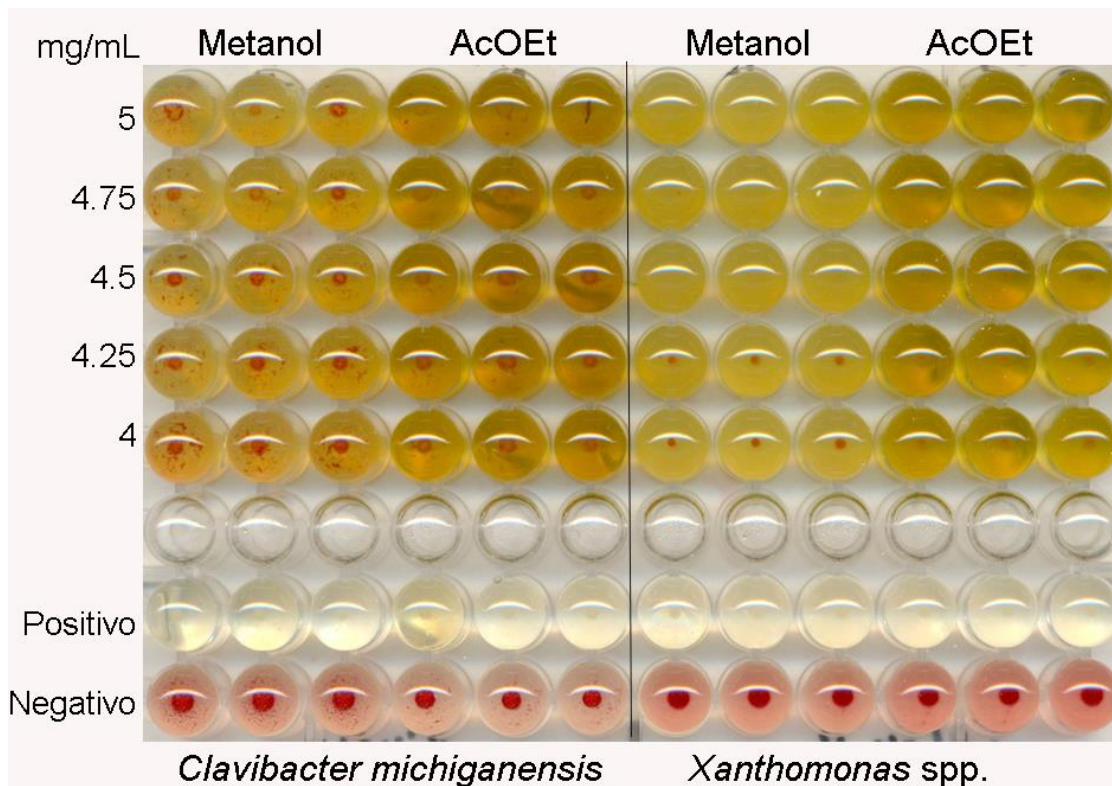


Figura 5.8 Microdilución en caldo para la determinación de CMI para C. del CMI sobre las bacterias *C. michiganensis* y *Xanthomonas* spp.

*Escherichia coli* fue sensible ante las concentraciones más altas probadas, sin embargo no presentó una inhibición visible, por lo que no se consideró una CMI para ninguna de las concentraciones evaluadas, *Micrococcus* presentó una alta sensibilidad con respecto a los extractos metanol y AcOEt al contrario de *E. coli* aquí si hubo una CMI de 4.25 mg/mL para los dos extractos (Fig 5.9).

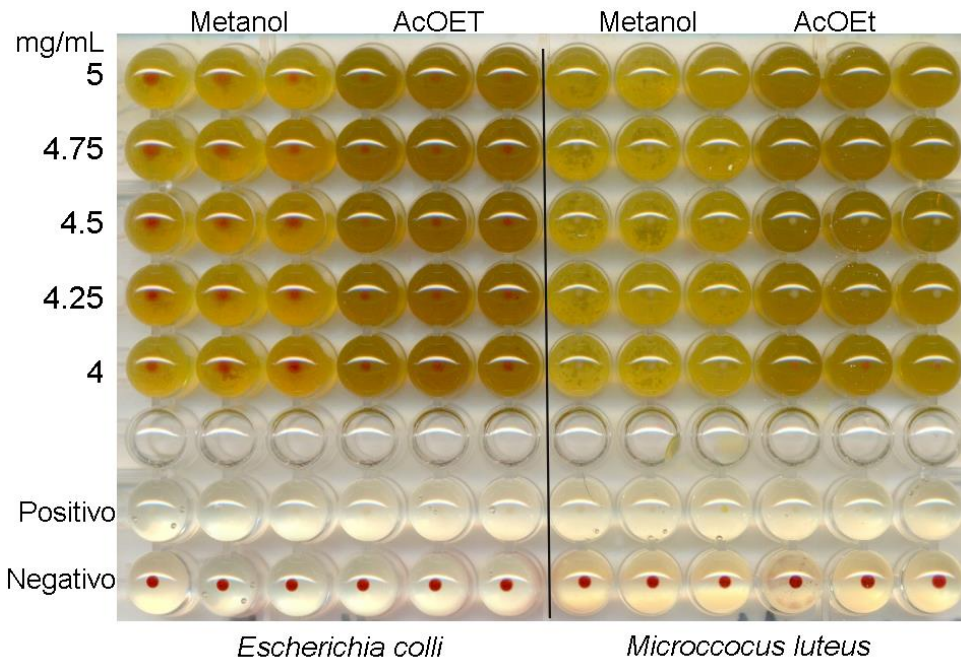


Figura 5.9 Microdilución en caldo para la determinación CMI parasobre las bacterias *E. coli* y *M. luteus*.

## 5.6 Discusión

El indicador reductor TTC ha sido usado para la determinación de la viabilidad microbiológica y CMI de *Clavibacter*, *Xanthomonas*, *E. coli*, *M. luteus*, al agregar TTC 30 minutos después, el crecimiento bacteriano se manifiesta generando un color rojo que permite la fácil interpretación de los resultados. El método de microdilución en caldo combinado con un agente reductor como las sales de tetrazolio (TTC), es conveniente y ampliamente usado para pruebas rápidas de susceptibilidad en un tiempo corto (Lee, Lee, Jeong, & Chang, 2007; Rahman, Kühn, Rahman, Olsson-Liljequist, & Möllby, 2004). El uso de cepas bacterianas de importancia agrícola y patógenas para el humano, en este trabajo representa un modelo de acción inhibitoria de los extractos que difieren sobre los microorganismos.

La inhibición mostrada para los extractos evaluados en los cuatro tipos de bacterias, presentan una variabilidad del efecto para las diferentes concentraciones y el tipo de extracto, es importante resaltar que el uso de disolventes a diferente polaridad implica la probable extracción de mezclas de diferentes compuestos los cuales están asociados a la actividad biológica; es decir un extracto obtenido con un disolvente muy polar, contiene

compuestos de alta polaridad estructuralmente diferentes a compuestos extraídos con disolventes menos polares (Russell, 2010).

De acuerdo al análisis de los datos estadísticos comparado con el control positivo, los extractos a una concentración de 3.75 mg/mL con mayor actividad fueron el de metanol y acetato de etilo, por otro lado las bacterias con mayor sensibilidad fueron: *Xanthomonas* y *M. luteus*.

La determinación de la CMI por microdilución en caldo se basa en una lectura visual de turbidez esto podría derivar en una prueba subjetiva y variable, por ello es más seguro agregar un agente reductor (TTC) para obtener una CMI más confiable (Lee et al., 2007). El resultado obtenido frente a la cepa de *Clavibacter* es de 5 mg/mL (AcOEt) y, *Xanthomonas* 4.5 mL (MeOH y AcOEt), *M. luteus* 4.25 mg/mL (MeOH y AcOEt), es de llamar la atención que en estas pruebas las CMI son mayores que en las reportadas en otros estudios realizados en musgos, por ejemplo, en *Plagiomnium cuspidatum* se evaluó el extracto etanólico y resultado potencialmente activo para valores de 128 µg/mL sobre *E. coli* mientras que esta misma especie no mostró sensibilidad alguna en el actual estudio frente a los extractos probados (Adriana Basile, Giordano, López-Sáez, & Cobianchi, 1999).

Otro ejemplo en el cual se usaron concentraciones bajas de extracto se reportó en el estudio sobre *Plagiochasma appendiculatum*, con valores que oscilan 0.1-0.2 mg/mL para los extractos de: Cloroformo, acetona, etanol y acuoso, sobre *M. luteus* y *E. coli* respectivamente (Bodade, Borkar, Arfeen, & Khobragade, 2008; Singh, Govindarajan, Nath, Rawat, & Mehrotra, 2006). Las diferencias del actual estudio comparado con los anteriores se puede asociar a distintos aspectos notables; en los trabajos anteriores se usaron solo extractos obtenidos en etanol esto podría sugerir, que la composición química del extracto puede variar reduciendo o aumentando la sensibilidad sobre las bacterias (Sabovljevic, Sokovic, Sabovljevic, & Grubisic, 2006; Russell, 2010).



De manera general los resultados obtenidos coinciden con la propuesta inicial, era de esperarse un efecto antimicrobiano dado que especies de musgos exhiben efectos contra bacterias, demostrando que la especie tiene potenciales propiedades antibacterianas. (Frahm & Kirchhoff, 2002; Kang, Kim, Liu, Jovel, & Towers, 2007; Nikolajeva et al., 2012; Nomura, Isshiki, Sakuda, Sakuma, & Kondo, 2012; Oyesiku & Caleb, 2015; Oztopcu-vatan & Savaroglu, 2011) .

## 5.7 Conclusiones

Los resultados demuestran que *P. flexilis* posee inhibición a diferentes concentraciones de los extractos crudos metanol y acetato de etilo *contra C. michiganensis, Xanthomonas y Micrococcus*, lo que implica que tiene compuestos activos con actividad antibacteriana

Se propone continuar el estudio de sus propiedades biológicas, así como los efectos sobre bacterias de importancia económica, pruebas de actividad antimicrobiana así dar uso con valor agregado a una planta.

## 5.8 Referencias

- Basile, A., Giordano, S., López-Sáez, J. A., & Cobianchi, R. C. (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*, *52*(8), 1479–1482. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00286-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00286-1)
- Bodade, R. G., Borkar, P. S., Arfeen, S., & Khobragade, C. N. (2008). In vitro screening of bryophytes for antimicrobial activity. *Journal of Medicinal Plants*, *7*(SUPPL. 4), 23–28.
- Daniel, W. W. 2011. Bioestadística. 4a edición. Limusa Wiley, México.
- Eloff, J. N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, *64*(8), 711–713.
- Frahm, J.-P., & Kirchhoff, K. (2002). Antifeeding effects of bryophyte extracts from *Neckera crispa* and *Porella obtusata* against the slug *Arion lusitanicus*. *Cryptogamie. Bryologie*, *23*(3), 271–275.
- Horna, G., Silva, M., Vicente, W., & Tamariz, J. (2012). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica*

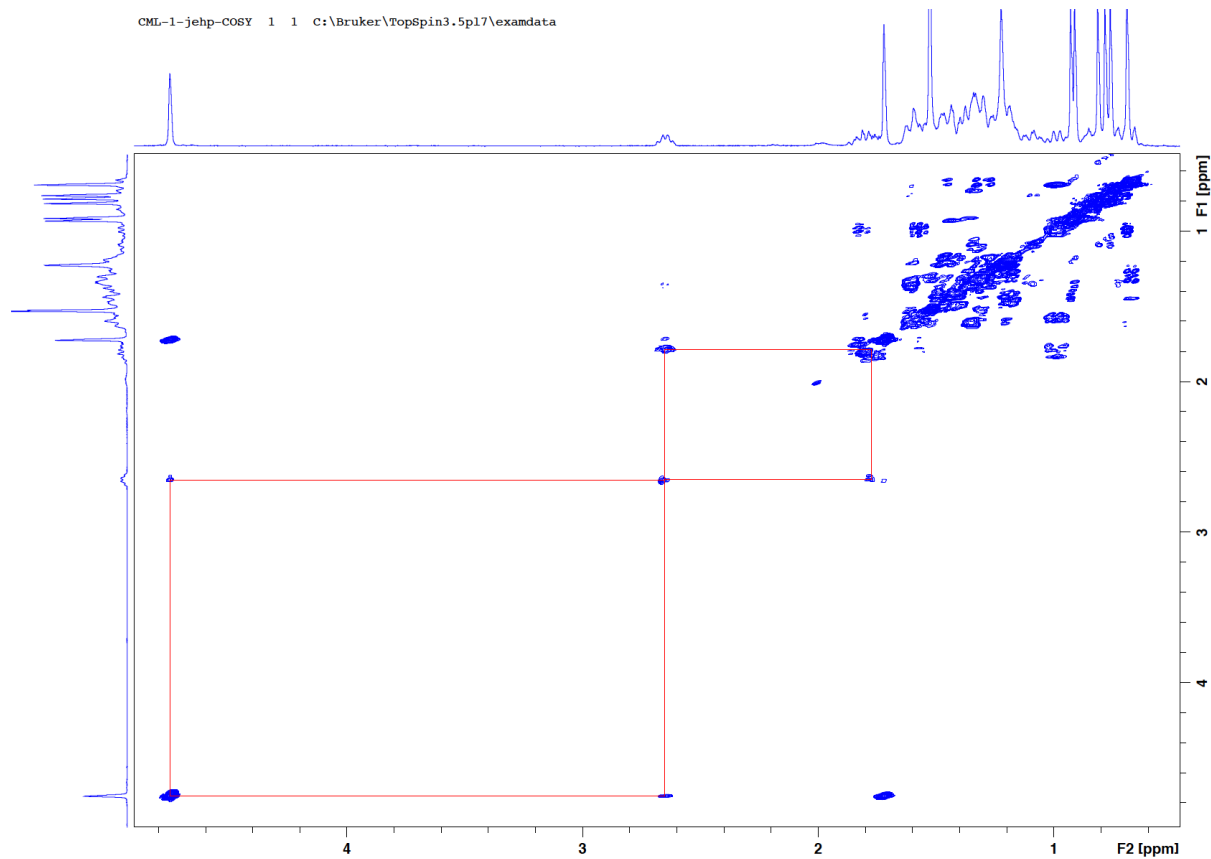
*Hereditaria*, 16(1), 39.

- Kang, S. J., Kim, S. H., Liu, P., Jovel, E., & Towers, G. H. N. (2007). Antibacterial activities of some mosses including *Hylocomium splendens* from South Western British Columbia. *Fitoterapia*, 78(5), 373–376.
- Kim, S., Kim, M. J., Kang, H. Y., Seol, S. Y., Cho, D. T., & Kim, J. (2010). A simple colorimetric method for testing antimicrobial susceptibility of biofilmed bacteria. *Journal of Microbiology*, 48(5), 709–711. <https://doi.org/10.1007/s12275-010-0299-z>
- Knezevic, P., & Petrovic, O. (2008). A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Microbiological Methods*, 74(2–3), 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.03.005>
- Lee, D. D., Lee, E. Y., Jeong, S. H., & Chang, C. L. (2007). Evaluation of a Colorimetric Broth Microdilution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Using 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride. *Korean Journal of Clinical Microbiology*, 10(1), 49–53. Retrieved from <http://www.koreamed.org/SearchBasic.php?RID=0105KJCM/2007.10.1.49&DT=1>
- Li, W., Liu, Z., Lin, H., Nie, Z., Chen, J., Xu, X., & Yao, S. (2010). Label-free colorimetric assay for methyltransferase activity based on a novel methylation-responsive DNazyme strategy. *Analytical Chemistry*, 82(5), 1935–1941. <https://doi.org/10.1021/ac902670c>
- Meletiadiis, J., Mouton, J. W., Meis, J. F. G. M., Bouman, B. A., Donnelly, J. P., Verweij, P. E., & Network, E. (2001). Colorimetric Assay for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3402–3408.
- Nikolajeva, V., Liepina, L., Petrina, Z., Krumina, G., Grube, M., & Muiznieks, I. (2012). Antibacterial Activity of Extracts from Some Bryophytes. *Advances in Microbiology*, 2(3), 345–353. <https://doi.org/10.4236/aim.2012.23042>
- Nomura, H., Isshiki, Y., Sakuda, K., Sakuma, K., & Kondo, S. (2012). The Antibacterial Activity of Compounds Isolated from Oakmoss against *Legionella pneumophila* and Other *Legionella* spp ., 35(9), 1560–1567.
- Oyesiku, O. O., & Caleb, O. J. (2015). Antimicrobial Activity of Three Mosses, *Calymperes Erosus* Müll. Hal., *Racomium Africanum* Mitt. , *Cyclodictyon* Mitt. From Southwest Nigeria. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences Ver. III*, 10(2), 2319–2319. <https://doi.org/10.9790/3008-10230105>
- Oztopcu-vatan, P., & Savaroglu, F. (2011). ANTIMICROBIAL AND ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITIES OF *Homalothecium sericeum* ( Hedw .) Schimp . EXTRACTS, 20(2), 461–466.
- Rahman, M., Kühn, I., Rahman, M., Olsson-Liljequist, B., & Möllby, R. (2004). Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4),

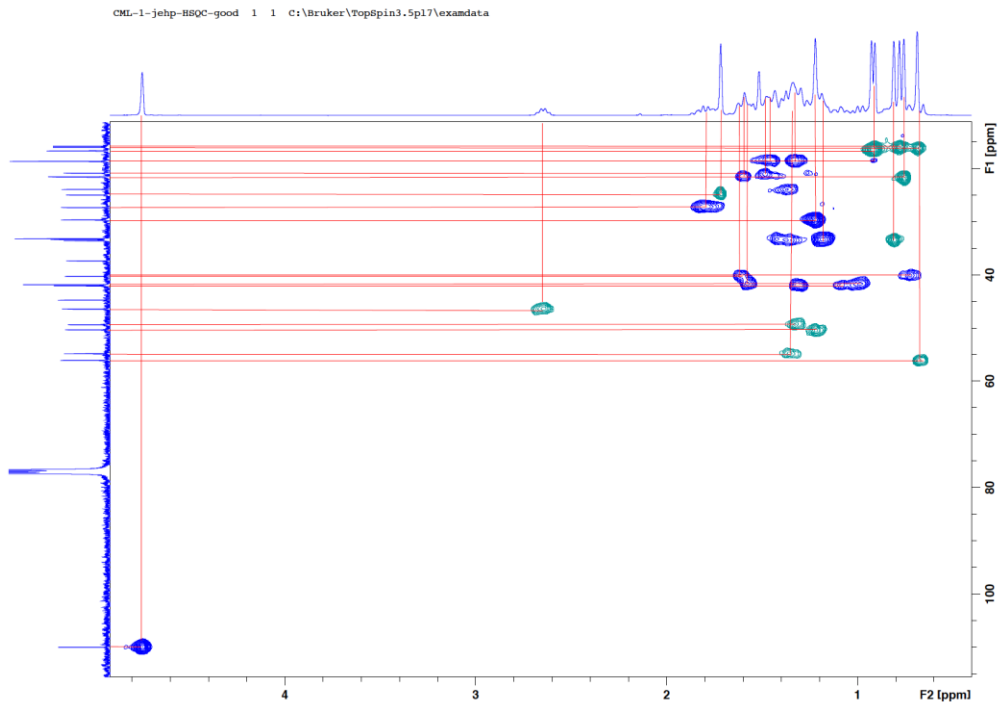
2398–2403.

- Ramirez, L. S., & Marin Castaño, D. (2009). METODOLOGIAS PARA EVALUAR IN VITRO LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, (42), 263–268.
- Russell, M. D. (2010). Antibiotic Activity of Extracts from some Bryophytes in South Western British Columbia. *Medical Student Journal of Australia*, 2, 9–14.
- Sabovljevic, A., Sokovic, M., Sabovljevic, M., & Grubisic, D. (2006). Antimicrobial activity of *Bryum argenteum*, 77, 144–145. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.11.002>
- Sharp, A. J., Crum, H., & Eckel, P. M. (Eds.). (1994). *The Moss Flora of México*. Memoirs of The New York Botanical Garden.
- Singh, M., Govindarajan, R., Nath, V., Rawat, A. K. S., & Mehrotra, S. (2006). Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.02.007>
- StatSoft. 2011 STATISTICA (data analysis software system), version 10.  
[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Tsukatani, T., Suenaga, H., Higuchi, T., Akao, T., Ishiyama, M., Ezo, K., & Matsumoto, K. (2008). Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.016>
- Tunney, M., Ramage, G., Field, T. R., Moriarty, T. F., & Storey, D. G. (2004). Rapid colorimetric assay for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5), 1879–1881. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1879>
- Zhu, R.-L., Wang, D., & Xu, L. (2006). Antibacterial activity in extracts of some bryophytes from China and Mongolia (Papers to Commemorate the 100th Issue of the Journal of the Hattori Botanical Laboratory)--(Bryology). *Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, (100), 603–615.

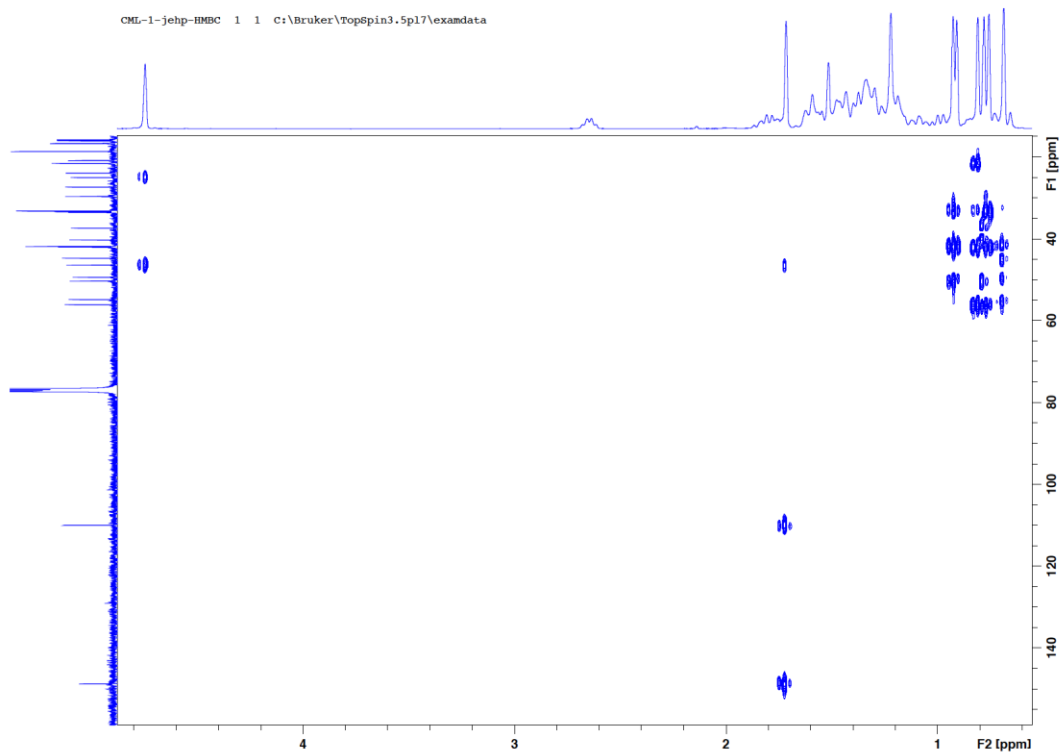
# Anexos



Anexo 1 Espectro COSY del compuesto 1



Anexo 2 Espectro HSQC del compuesto 1



Anexo 3 Espectro HMBC del compuesto 1