

Actividad antioxidante *in vitro* del extracto acuoso de las hojas de *Smallantus sonchifolius* (yacón)

In vitro antioxidant activity of aqueous extract from the leaves of *Smallantus sonchifolius* (yacón)

A actividade antioxidante *in vitro* do extracto aquoso das folhas de *Smallantus sonchifolius* (yacón)

Ivar J. Lavado Morales¹, Jorge L. Arroyo Acevedo¹ y César B. Cisneros Hilario¹

Resumen

El ser humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. El objetivo fue determinar el efecto antioxidante del extracto acuoso de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) frente al estrés oxidativo, inducida por fructosa en ratas. Se utilizó el extracto de yacón para conocer el potencial antioxidante; se evaluó por la actividad antioxidante *in vitro* por medio de los ensayos de inhibición de radicales DPPH, ABTS y FRAPP; la capacidad antioxidante, al final del experimento y se determinó para el FRAP el R² es igual a 0,998, para el DPPH es el R² igual 0,999 y para el ABTS el R² fue de 0,995. La actividad antioxidante del extracto seco de las hojas del *Smallanthus sonchifolius* (yacón), se tuvo un resultado similar para los tres métodos FRAP, DPPH, ABTS presentando un efecto antioxidante comparado con el grupo control.

Palabras clave: FRAP, DPPH, ABTS, capacidad antioxidante.

Abstract

Man maintains a balance redox constant, preserving the balance between the production of pro-oxidants that are generated as a result of cellular metabolism and antioxidant defense systems. The objective was to determine the antioxidant effect of aqueous extract of leaves yacón against oxidative stress induced by fructose in rats. yacon extract was used to determine the antioxidant potential; assessed by the *in vitro* antioxidant activity through inhibition assays DPPH radical ABTS and FRAPP; antioxidant capacity, at the end of the experiment and was determined to FRAP R² is 0.998, for DPPH R² is equal to 0.999 and R² ABTS was 0.995. The antioxidant activity of dry extract of leaves yacón, a similar result for the three FRAP, DPPH methods had, ABTS presenting an antioxidant effect compared to the control group.

Keywords: FRAP, DPPH, ABTS, antioxidant capacity.

Resumo

Homem mantém uma constante de equilíbrio redox, preservar o equilíbrio entre a produção de pró-oxidantes que são gerados como um resultado dos sistemas de defesa antioxidantes e metabolismo celular. O objetivo foi determinar o efeito antioxidante do extrato aquoso de folhas Yacón (yacon) contra o estresse oxidativo induzido por frutose em ratos. yacón extracto foi utilizada para determinar o potencial antioxidante; avaliada pela atividade antioxidante *in vitro* através de ensaios de inibição DPPH radical ABTS e frapp; capacidade antioxidante, no final da experiência e foi determinada a FRAP R² é 0,998, para DPPH R² é igual a 0,999 e R² ABTS foi 0,995. A atividade antioxidante do extrato seco de folhas Yacón (yacon), um resultado semelhante para os três FRAP, métodos DPPH teve, ABTS apresentando um efeito antioxidante em comparação com o grupo controle.

Palavras-chave: FRAP, DPPH, ABTS, capacidade antioxidante.

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, ivar.lavado@unmsm.edu.pe

Introducción

Trabajos previos reportan que la infusión de hojas de yacón reduce la glicemia y que probablemente los principios activos que contienen actúan estimulando la liberación de insulina y aumentando la concentración de ésta en el plasma de ratas diabéticas y normales. Por otro lado, estudios clínicos preliminares demostraron que las raíces y hojas tienen actividad hipoglucemiante. (Gordillo et al., 2012).

Smallanthus sonchifolius (Poepp.) H. Rob., (yacón) *Asteraceae*, es una hierba que se utiliza tradicionalmente para el tratamiento de la diabetes en la medicina popular. Se obtuvieron tres extractos de hojas de yacón: extracto acuoso, donde se detectaron los derivados del ácido clorogénico y lactonas sesquiterpénicas; extracto de hoja de enjuague, rico en lactonas sesquiterpénicas; y el extracto polar, rico en derivados del ácido clorogénico. (Rejane, 2013).

El yacón (*Smallanthus sonchifolius*) es un componente de la dieta, las hojas es un hipoglucemiante (Valentová *et al.*, 2005). El porcentaje de FOS en el yacón es 70-80% de su peso seco. Por lo tanto, yacón podría ser un potencial prebiótico y ejerce un efecto sobre la el ecosistema intestinal (Lachman, 2014; Bonet, 2010).

El estudio sobre la actividad hipoglicemiante de yacón a dosis de 19 mg/Kg y 38 mg/Kg de peso corporal, sobre la hiperglicemia inducida en ratas albinas machos. El extracto se administró por vía oral después de 48 horas de la inducción de diabetes experimental con solución de aloxano al 5% (vía intraperitoneal) a ratas albinas normoglicémicos. Fueron asignadas 40 ratas aleatoriamente distribuidos en 4 grupos; 2 grupos recibieron las dosis correspondientes por la planta de estudio (19 mg/Kg y 38 mg/Kg); y el 3^{er} grupo recibió solución salina al 0.9% y el 4^{to} recibió vía oral la solución de glibenclamida 5 mg. Las hojas de yacón presentaron actividad hipoglicemiante a dosis de 38 mg/Kg. y una menor porcentaje a dosis de 19 mg/Kg. (Ampudia y col, 2014).

Otro estudio de la capacidad antioxidante de 10 accesiones de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en hojas y raíces procedentes de Cajamarca. Se empleó la prueba de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) y se midió el contenido de fenoles totales y flavonoides totales. Se usó ácido ascórbico, ácido gálico (AG) y quercetina (Q) como referencia. Para la captación del radical DPPH, los extractos de raíces presentaron un IC₅₀, en el rango de 1,92 a 6,32 uL de raíz/mL. Sus fenoles totales variaron de 217,5 a 352,4 ug EAG/mL de raíz. Los extractos hidroalcohólicos de hojas mostraron un IC₅₀, para la captación del radical DPPH, entre 44,2 y 110,3 ug de hoja seca/mL. Sus fenoles totales estuvieron en el rango de 7,7 a 22,7 mg EAG/g de hoja y el de flavonoides entre 2,2 y 4,4 mg EQ/g de hoja. (Arnao y col, 2011).

Se evaluó el potencial de los extractos de hojas de yacón como fuente de compuestos antioxidantes. Después de que el secado y pulverización de las muestras, se utilizaron tres procesos para preparar los extractos: infusión, decocción, y la extracción con disolvente (metanol). Compuestos fenólicos totales (utilizando el método Folin-Ciocalteu), compuestos flavonoides totales (utilizando el método colorimétrico UV-VIS), y la actividad antioxidante (por DPPH y ABTS ensayos) se utilizaron para evaluar estos extractos. Los compuestos fenólicos individuales que se encuentran en los extractos se caracterizaron y se cuantificaron mediante HPLC-DAD. Extracción

decocción de las hojas mostró los valores fenólicos y flavonoides totales más altos, al 42.20mgGAE/gdw y 39.71mgRE/gdw, respectivamente. El ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) y rutina (quercetina-3-rutinósido fecha trihidroxi) fueron los compuestos fenólicos más abundantes en los extractos de hojas (1.97 y 2.81mg / GDW, respectivamente). Miricetina (3,3,4,5,7-hexahydroxyflavone) y ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) fueron los compuestos fenólicos que se encuentran en mayores cantidades en los extractos de flores (16,09 y 1.36mg/gdw, respectivamente) y se identificaron estos compuestos y cuantificados en este estudio por primera vez. Decocción de las hojas de yacón exhibió la mayor actividad antioxidante en el ensayo DPPH a $EC_{50} = 220.50$ gdw. La infusión de extracto de las hojas exhibió una mayor actividad antirradical en los ensayos de ABTS que los otros extractos estudiados (422,13 Mequiv.Trolox / GDW). Los resultados indican que la infusión y decocción de hojas de yacón y las flores pueden ser considerado como una fuente prometedora de ácidos fenólicos y compuestos flavonoides, con propiedades antioxidantes apreciables.

Materiales y métodos

Para el presente trabajo de investigación se realizó el efecto antioxidante *In vitro* del extracto acuoso de las hojas del *Smallantus sonchifolius* (Yacón). Para el ensayo experimental del efecto antioxidante de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón), Se usaron 30 ratas hembras, de la especie *Rattus norvegicus* var. Albina, de seis semanas, con un peso promedio de 180 - 200 gramos, procedentes del bioterio de la (UNALM). Los animales se aclimataron una semana y se les pesó cada semana. Siendo colocadas en jaulas individuales con una temperatura ambiental que oscilo entre 20° y 23°C. Se les alimentó con dieta obtenida de la UNALM y agua y *ad libitum*, en condiciones ambientales estandarizadas. Luego de dicho período, se procedió a formar aleatoriamente los cinco grupos de estudio (n=6). Antes del tratamiento con el extracto acuoso de yacón (EAY), se les retiró el alimento y recibieron por vía orogástrica durante cinco días. Para el experimento se preparará una infusión al 2% (p/v) en agua hirviendo, se filtró en frío usando papel Whatman N°1; se preparó alícuotas que fueron colocadas en la estufa a 40°C, hasta obtener el extracto seco. Se mantuvo en congelación a -20°C hasta antes de su uso. Para extraer el extracto acuoso en solución, se disolvió 0.2 gr de extracto acuoso y se disolverá en 50 ml de solución salina fisiológica. FRUCTOSA = 1.0 ml al 60% y COLESTEROL = 200 mg/kg. Método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP). El procedimiento seguido ha sido descrito por Benzie y Strain (1996) con ligeras modificaciones. Para iniciar el análisis se preparó el reactivo de trabajo, que consiste en una mezcla de tampón acetato 300 mM (pH = 3,6), TPTZ 10 mM en HCL 40 mM y tricloruro férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 20 mM en una proporción 10:1:1 (v:v:v), una vez preparado, se añadieron 3 mL de éste reactivo en una cubeta, y se midió la absorbancia a 593 nm. Posteriormente se agregaron 100 μ L de una de las diluciones del extracto etanólico de yacón y se agitó en un vortex durante 30 segundos. Después de 6 minutos de incubación a temperatura ambiente, se realizó la lectura de absorbancia nuevamente a 593 nm, al que se restó el valor del blanco. Se procedió de la misma forma para todas las diluciones y las muestras se ensayaron por triplicado. Los resultados se expresaron en relación al Trolox. Para ello se realizó una curva de calibración en un intervalo de concentraciones de 1,00 a 0,03 mM y se procedió igual que la muestras. Todos los puntos de la curva se realizaron por triplicados. Para la comparación de los resultados se extrapola los valores de la muestra en la curva estándar para expresar la actividad antioxidante en relación a los mM de Trolox. Método de inhibición frente al radical libre 2,2-Difenil-1-picrilhidraizil (DPPH), El método que se empleó en este trabajo es el propuesto por

Brand-Williams et al. (1995) con algunas modificaciones. Dicho radical tiene un electrón desapareado y presenta un color violeta el cual cambia a amarillo pálido en presencia de una sustancia antioxidante, se midió ésta reacción en un espectrofotómetro.

La solución del radical DPPH, se preparó una solución a 0,1 mM de DPPH, pesando 3,9 mg de DPPH en un matraz aforado previamente tarado y se disolvió en 100 mL de metanol, la solución se colocó en un sonicador para asegurar la buena disolución y luego comprobar que a una absorbancia a 517 nm esté ente 0,6 y 0,7. El matraz se cubrió con papel de aluminio para la protección frente a la luz. Preparación del Trolox: Se preparó una solución stock 1 mM disolviendo 2,503 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2- carboxílico 97% (Trolox), en 10 mL de metanol, luego se prepararon diluciones con rangos de concentración entre 0,5 y 0,03 mM como, con el fin de realizar la curva de calibración. Como blanco de calibración del equipo se empleó metanol.

Para la determinación de la curva de calibración, se adiciono 2,9 mL de la solución de DPPH en una cubeta y se midió su absorbancia a 517 nm y luego se adicionó 0,1 mL de las diluciones de Trolox, se agitó vigorosamente y se mantuvo en la oscuridad por 30 minutos a temperatura ambiente, para después realizar la lectura en un espectrofotómetro UV/VIS a 517 nm.

Para la medición de la actividad antioxidante del extracto etanólico de yacón, se utilizó una celda de cuarzo al que se agregó 2,9 mL de DPPH y se midió su absorbancia posteriormente se adicionaron 0,1 mL de una dilución del extracto etanólico de yacón, esta mezcla se dejó en reposo durante 30 minutos en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se leyó la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro UV/VIS. Los resultados fueron expresados como la capacidad antioxidante equivalente en mM de Trolox.

La reacción con el radical 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolin-6-sulfonato de amonio) (ABTS), se realizó según el método propuesto por Re et al. (1999), empleando la capacidad antioxidante del ABTS⁺ y su habilidad de secuestrar radicales de larga vida. Actualmente el método ABTS ha sido ampliamente usado tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica. El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342 nm, es muy soluble en agua y químicamente estable. El radical ABTS⁺ una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa, mioglobina) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico o ABAP [2,2'-azobis-(2-amidinopropeno) HCl], pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815nm.

En este método, la generación del radical ABTS[•] se produce por medio químico mediante la adición de persulfato de potasio antes de la adición de la muestra, lo que evita que los componentes de la misma pueda reaccionar con el reactivo, otra ventaja es que se trabaja a pH fisiológico (pH = 7,1), a una temperatura de 37 °C simulando las condiciones fisiológicas. Para comenzar el análisis es necesario preparar el reactivo de trabajo el cual debe tener una concentración de ABTS[•] de 30 uM y se procede de la siguiente manera: Se pesan 0,0504 g de la sal amónica cristalizada de ABTS y se disuelve en 5 mL de agua ultra pura, luego se adiciona 6,7 mg de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) y se deja agitando por espacio de media hora envuelta en papel aluminio protegido de la luz, pasado este tiempo se transfiere a un matraz volumétrico de 10 mL y se enrasa con agua ultra pura y se deja reaccionar a temperatura ambiente y protegido

de la luz durante 12 a 18 horas. Transcurrido el tiempo correspondiente se toma una alícuota de 1 mL y se adiciona 70 mL de tampón fosfato de pH 7.1 y se mide la absorbancia a 734 nm la absorbancia el cual debe estar entre $0,680 \pm 0,2$.

Para la medida de la actividad antioxidante se tomaron 2 mL del radical ABTS en una cubeta y se midió su absorbancia inicial a 734 nm con el equipo termostatzado a 37 °C, posteriormente se añadieron 50 µL de una de las diluciones del extracto etanólico de yacón (el cual debe haber estado en un baño maría a 37 °C), se mezcla durante 10 segundos en un vortex, después de 4 minutos de incubación se midió la absorbancia final a 734 nm. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Resultados

Tabla 1. Valores de la curva de calibración de Trolox por el método FRAP.

mM Trolox	Absorbancia	SD	CV%
1 mM	0,715	0,01569501	2,196
0,5 mM	0,367	0,01563117	4,263
0,25 mM	0,208	0,00808290	3,892
0,125 mM	0,095	0,00493288	5,211
0,0625 mM	0,058	0,01501111	2,604
0,03125 mM	0,031	0,00321455	1,589

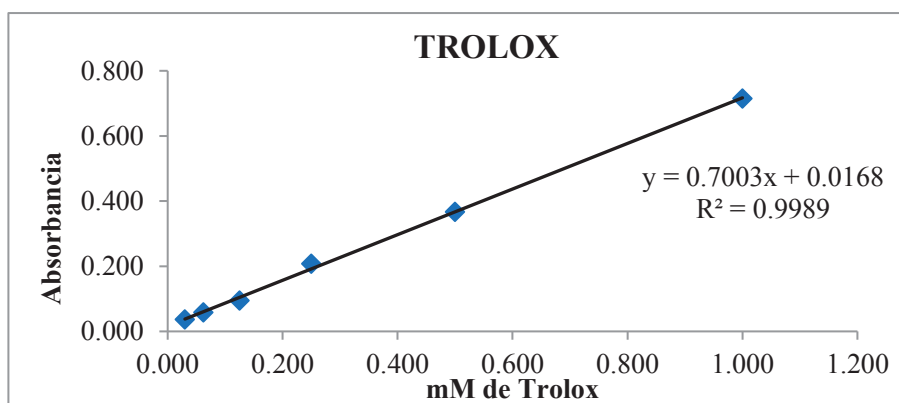


Figura 1. Curva de calibración de Trolox por el método de FRAP.

Tabla 2. Valores de la curva de calibración de Trolox por el método de DPPH.

mM Trolox	Absorbancia	SD	CV%
1 mM	0.560	0.00754983	1.35
0,5 mM	0.300	0.00585947	1.96
0,25 mM	0.162	0.00854400	5.27
0,125 mM	0.084	0.00173205	2.06
0,0625 mM	0.054	0.00100000	1.85
0,03125 mM	0.031	0.00057735	1.84
0,01562 mM	0.025	0.00200000	8.00

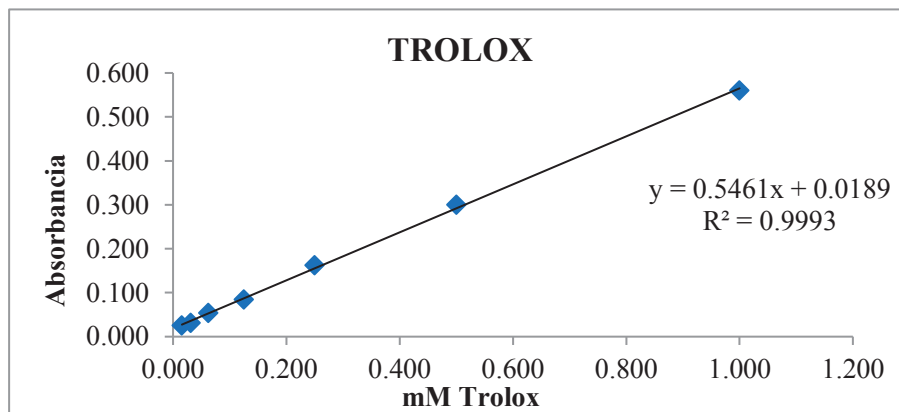


Figura 2. Curva de calibración de Trolox por el método de DPPH.

Tabla 3. Valores de la curva de calibración de Trolox por el método de ABTS.

mM Trolox	Absorbancia	SD	CV%
1 mM	0.654	0.00321455	0.49
0,5 mM	0.325	0.00115470	0.36
0,25 mM	0.178	0.00208167	1.17
0,125 mM	0.106	0.00264575	2.50
0,0625 mM	0.088	0.00057735	0.66
0,03125 mM	0.074	0.00493288	6.70
0,01562 mM	0.066	0.00200000	3.03

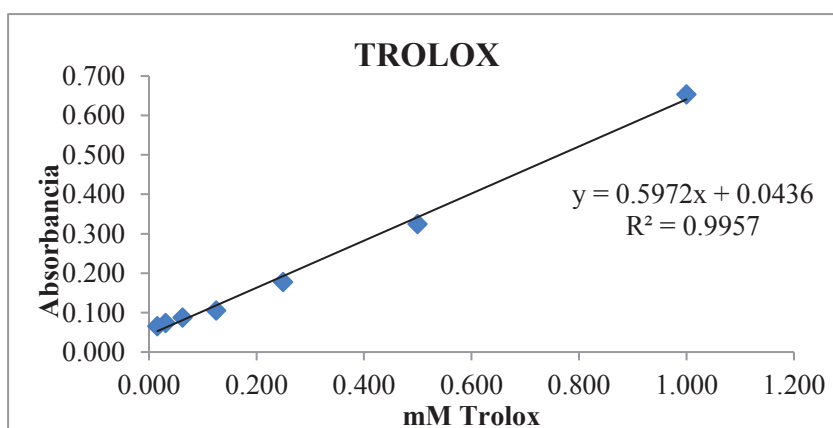


Figura 3. Curva de calibración de Trolox por el método de ABTS

Discusión

En cuanto a la dispersión de la desviación típica podemos decir existe una pequeña variación en el rendimiento en el método de DPPH, seguido por el método de FRAP y por ultimo ABTS .La decoloración de la solución de DPPH aumenta regularmente con los incrementos de la cantidad de extracto en un volumen determinado de solución.

Los grupos tratados son estándares y el extracto de extracto acuoso de las hojas del *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) mostraron la dispersión de la desviación típica en forma ascendente en la tabla 01, 02 y 03 para efecto antioxidante *In vitro* coincidiendo para los tres métodos FRAP, DPPH y ABTS. Los valores de DPPH son más altos para los extractos de hojas debido quizá a que estos extractos tienen un contenido más alto de fenoles totales. Hay diferencia significativa ($p < 0,05$) entre todos los extractos de hojas. (Carbajal, 2011).

En cuanto a la calibración de los métodos podemos decir que la tendencia fue similar para los tres métodos de acuerdo a los gráficos 1,2 y 3 tal como son expresados en DPPH ($R^2=0.9993$), FRAP ($R^2=0.9989$) y ABTS ($R^2=0.9957$). Este método mide la capacidad antioxidante relativa de los extractos para atrapar el radical ABTS en la fase acuosa en comparación con una cantidad estándar de Trolox. El ABTS+, generado por persulfato de potasio, es una buena herramienta para determinar la actividad antioxidante de compuestos donadores de hidrógeno (atrapadores de radicales en la fase acuosa). Todos los extractos, tanto de las hojas presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$). (Carbajal, 2011).

El estrés oxidativo se define como “una situación en la que existe tanto un aumento en la velocidad de generación de las especies reactivas de oxígeno como una disminución en los sistemas de defensa” (Sánchez, 2011) menciona en su estudio, que el estrés oxidativo se ha relacionado con el desarrollo de la mayoría de las enfermedades crónicas. Específicamente, en la diabetes, se cree que desempeñan un papel tanto en la patogénesis y evolución de la enfermedad. Teniendo en cuenta que los procesos inflamatorios, especialmente aquellos que se presentan crónicos, están asociadas con una sobreproducción de radicales libres que inducen estrés oxidativo y provocan la aparición de diversas enfermedades degenerativas, consideramos que la actividad antioxidante podría ser un factor clave que contribuye a la reducción del edema en los animales tratados con el aceite de linaza (Castro, 2014).

Conclusión

Existe efecto antioxidante del extracto acuoso de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) frente al estrés oxidativo, inducida por fructosa en ratas.

Referencias bibliográficas

- Ampudia, R., Manzur, C. (2013). Actividad hipoglicemiante *in vivo* del extracto acuoso liofilizado de hojas de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en ratas albinas Holtzman – Essalud – 2013 [Tesis]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Arnao, I., Seminario, J., Cisneros, R., Trabucco. (2011). Potencial antioxidante de 10 accesiones de yacón, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson, procedentes de Cajamarca-Perú. *An Fac med.* 72(4):239-43.
- Benzie, I., y Strain. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay. *Anal Biochem*, 239: 70-76.

- Bonet, B. (2010), Prebiotic effect of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) on intestinal mucosa using a mouse model. *Food and Agricultural Immunology*. Argentina; (21)-(2), 175-189.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 22, 25-30.
- Carbajal, L. (2011), Algunas especies de *Passiflora* y su capacidad antioxidante, Universidad Nacional de Colombia. **CONOCIMIENTO PARA EL DESARROLLO**, 2016, 7(2):81-88
- Plantas Medicinales. 2011; 16(4):334-335.
- Castro, J., Ocampo, Y., Franco, L. (2014). In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Cryptostegia grandiflora* Roxb. ex R. Br. *Leaves. Biological Research* 47:32.
- Gordillo, G. (2009). Efecto hipoglicemiante del extracto acuoso de las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2. [Tesis] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Lachman, J., Fernández E., Viehmannová I., Sulc M. Eopková. (2014). Total phenolic content of yacón (*Smallanthus sonchifolius*) rhizomes, leaves, and roots affected by genotype. Downloaded by [181.66.157.168] at 22:13.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pan-Nala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 9/10, 1231-1237.
- Rejane, B., Oliveira, D., Chagas-Paula, A., Secatto, T., Gasparoto, L., Faccioli, A., Campanelli, F., Da Costa. (2013). Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 23(3): 497-505, May/Jun. 2013.
- Sánchez, C. (2011), Capacidad de la silibinina de revertir las alteraciones metabólicas y el estrés oxidativo en ratas con resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en fructosa. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. España. P.290.
- Valentová, K., Sersen, F., Ulrichová, J. (2005). Radical Scavenging and Anti-lipoperoxidative Activities of *Smallanthus Sonchifolius* Leaf Extracts. *Journal of World Congr. Medicinal and aromatic plants for human welfare*, Mendoza, Argentina.