

CAPACIDAD CAPTADORA DE RADICALES LIBRES DEL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTOS ETANÓLICOS DE YACÓN (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) H. ROBINSON, CULTIVADO EN COLOMBIA¹

Dary Luz Mendoza Meza²

Loreinys Parra Flórez²

Sergio Loza Rosas²

RESUMEN

Introducción: El *Smallanthus sonchifolius* es un cultivo andino con importantes propiedades medicinales y nutricionales, usado principalmente como hipoglucemiente. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad captadora de radicales libres del aceite esencial y fracciones fenólicas de un extracto etanólico de hojas de yacón, cultivado en Colombia. **Materiales y Métodos:** El aceite esencial de las hojas se extrajo mediante hidrodestilación asistida por radiación de microondas y se analizó usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). También se separaron fracciones fenólicas de diferente polaridad desde un extracto etanólico de las hojas usando la resina Amberlita XAD-2. Los compuestos fenólicos totales se determinaron con el reactivo de Folin-Ciocalteu y analizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM). La actividad antioxidante se evaluó usando los radicales DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) y ABTS [2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)]. **Resultados y Discusión:** El aceite esencial mostró actividad captadora del radical ABTS ($CE_{50} = 2,11 \text{ mg/ml}$). Los compuestos mayoritarios identificados en el aceite esencial fueron: Sabineno (40,75%), D-Germacreno (15,36%), Cariofileno (9,93%) y 1-Terpinen-4-ol (5,51%). El contenido de fenoles

totales en las fracciones separadas con Amberlita XAD-2 fue: F1 (H_2O) > F2 ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 1:1 v/v) > F3 (MeOH). Todas las fracciones presentaron actividad captadora del DPPH y ABTS⁺. Los ácidos fenólicos identificados por HPLC-EM fueron derivados de los ácidos quínico, cafeoilquínico, dicafeoilquínico, dicafeoilglucárico, cafeoiltartárico e hidroxiferúlico. En conclusión, las hojas de yacón cultivado en Duitama (Boyacá) contienen metabolitos secundarios capaces de proteger a las células frente al estrés oxidativo inducido por radicales libres.

Palabras clave: *Smallanthus sonchifolius*, aceite esencial, extracto etanólico, antioxidantes, ABTS, DPPH.

FREE RADICAL SCAVENGING CAPACITY OF ESSENTIAL OIL AND ETHANOLIC EXTRACTS OF YACÓN (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl) H. ROBINSON, CULTIVATED IN COLOMBIA

ABSTRACT

Introduction: *Smallanthus sonchifolius* is an Andean crop with important medicinal and nutritional properties, used mainly as a hypoglycemic. The aim of this study was to

¹ Investigación financiada con recursos del Grupo de Investigación de Productos Naturales y Bioquímica de Macromoléculas de la Universidad del Atlántico.

² Grupo de Investigación en Productos Naturales y Bioquímica de Macromoléculas. Programa de Química. Universidad del Atlántico. Km 7 antigua vía a Puerto Colombia (Atlántico). Correo electrónico: darymendoza@mail.uniatlantico.edu.co

determine free radical scavenging activity of essential oil and phenolic fractions of an ethanolic extract of yacón leaves grown in Colombia.

Materials and Methods: The essential leaf oil was extracted through hydrodistillation assisted by microwave radiation and was analyzed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). Phenolic fractions of different polarity were also separated from an ethanolic leaf extract using Amberlite XAD-2 resin. The total phenolic compounds were determined with the Folin-Ciocalteu reagent and analyzed using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS). The antioxidant activity was evaluated using DPPH radicals (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS [2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate]. **Results and Discussion:** The essential oil showed the ABTS radical scavenging

activity ($EC_{50} = 2.11 \text{ mg / ml}$). The major compounds identified in the essential oil were: Sabinene (40.75%), D-germacrene (15.36%), Caryophyllene (9.93%) and 1-Terpinen-4-ol (5.51%). The total phenolic content in the fractions separated on Amberlite XAD-2 was $F1 (\text{H}_2\text{O}) > F2 (\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}, 1:1 \text{ v/v}) > F3 (\text{MeOH})$. All fractions showed scavenging activity with DPPH[•] and ABTS^{•+}. Phenolic acids identified using HPLC-MS were quinic, hidroxiferulic, caffeoylquinic, dicaffeoylquinic, dicaffeoilglucaric and caffeoiltartaric derivatives. In conclusion, yacón leaves grown in Duitama (Boyacá) contain secondary metabolites able to protect cells against oxidative stress induced by free radicals.

Key words: *Smallanthus sonchifolius*, essential oil, ethanolic extract, antioxidants, ABTS, DPPH.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa con alta incidencia y prevalencia a nivel mundial (1). Según datos de la Asociación Americana de Diabetes (ADA), cerca de 371 millones de personas en todo el mundo (5,26% de la población mundial) la padecen (2). Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el año 2030, habrá cerca de 366 millones de personas diabéticas en el mundo, por lo que se predice que la enfermedad alcanzará dimensiones de auténtica epidemia (3).

En la actualidad existe evidencia suficiente que sustenta la relación entre los radicales libres y las enfermedades degenerativas crónicas, como la diabetes mellitus (4-6). Se conoce que defectos en los mecanismos de defensa antioxidante, radicales libres y estrés oxidativo pueden ser responsables de la diabetes mellitus misma y sus complicaciones (7-9), razón por la cual los antioxidantes pueden coadyuvar en su prevención y/o tratamiento (10, 11).

Smallanthus sonchifolius (Poepp. & Endl.) H. Robinson (Asteraceae), es un arbusto andino originario de Perú, que se encuentra en toda Sudamérica desde Venezuela hasta Argentina (12); sus hojas y raíces son reconocidas por tener propiedades antioxidantes, antimicrobianas e hipoglucemiantes (12-14). Investigaciones realizadas con partes aéreas de variedades de yacón cultivadas en varios países andinos han descrito un alto contenido de ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales pueden contribuir a la actividad antidiabética de la planta; estos compuestos son derivados del ácido cafeico, quínico, ferúlico y el flavonoide quercetina (15-17).

En Colombia, el yacón se cultiva principalmente en municipios del altiplano cundiboyacense y del Eje Cafetero, donde es utilizado principalmente como forraje, desaprovechándose el potencial de este cultivo como fuente de metabolitos con actividad biomédica. Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue contribuir a la caracterización química y determinación de la actividad antioxidante de las hojas del yacón que se cultiva en Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las hojas de yacón se recolectaron de cultivos establecidos en la vereda Tocogua, aledaña al municipio de Duitama, Boyacá (Latitud 5°49'30,31" N, Longitud 73°0'24,55" O). La identidad botánica de la especie fue confirmada en el Herbario Nacional de Colombia, adscrito al Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional, sede Bogotá (Código de Barras COL000362397, No. Catálogo 547142).

Extracción y caracterización del aceite esencial

Para la obtención del aceite esencial se seleccionaron hojas maduras en buen estado fitosanitario. La extracción se realizó por hidrodestilación asistida por radiación de microondas, siguiendo el procedimiento descrito previamente (18). Para la extracción de cada muestra se realizaron 6 ciclos de extracción de 10 min cada uno, a una potencia de 840 W, con intervalos de 2 min de reposo antes de cada ciclo. El análisis de composición química del aceite fue realizado en un cromatógrafo Agilent Technologies Inc. GC System 7890A, acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies Inc. GC System 5975C VL MSD, equipado con una columna capilar de fase estacionaria 5% fenil-poli (metilsiloxano). La identificación de las sustancias se hizo mediante comparación de sus espectros de masas con aquellos dados por las librerías de CG-MS NIST MS Search 8.0 con la ayuda del software MSD ChemStation E.02.00.493 de Agilent Technologies Inc. La cuantificación de los componentes se realizó usando n-tetradecano (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemania) como estándar interno (istd), relacionando las áreas de este y del compuesto de interés con las concentraciones de los dos.

Actividad antioxidante del aceite esencial

Fue evaluada mediante el ensayo del ABTS descrito por Re y colaboradores (19). Se preparó

la solución del catión radical ABTS^{•+} y diluciones seriadas del aceite esencial en metanol (desde 300 a 2 mg/ml). De cada dilución se tomaron 100 µl y se mezclaron con 1 ml de la solución del ABTS^{•+}, la absorbancia de la mezcla fue registrada luego de 7 min, en un equipo UV-VIS (Génesis 20) a 734 nm. Las lecturas se compararon con un blanco (metanol) y la actividad captadora de radicales libres se expresó como porcentaje de inhibición (%) I) y como la concentración efectiva que neutraliza el 50% del radical (CE₅₀). Además, se estudio la actividad del Sabineno (Sigma-Aldrich, CAS No. 546-79-2), un compuesto mayoritario en el aceite esencial. Como control del ensayo se utilizó a-tocoferol (Sigma-Aldrich, CAS No. 10191-41-0).

Obtención de extractos etánolicos

Una muestra de 250 g de hojas secas de yacón se sometió a un proceso de maceración hasta pulverización y extracción con etanol absoluto, durante 15 días bajo refrigeración. El extracto se filtró y se concentró a presión reducida a 50°C y 36 rpm, en un equipo Laborata 4000 (Heidolph®). El reconocimiento de flavonoides se realizó mediante el ensayo de Shinoda, mientras que los fenoles se identificaron con el ensayo de FeCl₃ (20).

Separación de ácidos fenólicos y flavonoides

Esta se realizó por cromatografía de columna (40 x 2 cm), usando la resina Amberlite XAD-2 (Sigma, 20-60 mesh), con una velocidad de flujo del solvente de 10 ml/min (21). Se agregó a la columna 1 g del extracto etanólico total de hojas de yacón, los compuestos se eluyeron con 20 ml de H₂O, 20 ml de la mezcla H₂O:MeOH (1:1, v/v) y 20 ml de MeOH. La presencia de fenoles y compuestos antioxidantes en los eluidos fue evaluada en cromatoplascas de Silica-Gel F₂₅₄ usando como fase móvil la mezcla de n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5, v/v/v). Las chromatoplascas se revelaron con una solución del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, Calbiochem®) a la concentración 0,5 M.

Cuantificación de fenoles totales

Se realizó mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Blainski y colaboradores (22) con algunas modificaciones. Un volumen de 2 ml de los eluidos se mezcló con 2,5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España). La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 2 min, seguidamente se adicionaron 2 ml de carbonato de sodio al 7,5% y posterior incubación a 50°C por 15 min. Los datos de absorbancia de la muestra a 765 nm se interpolaron en una curva de calibración estándar de ácido gálico ($r^2 = 0,985$) y se expresaron como mg de ácido gálico equivalente (mg AGE).

Ensayo de captación del DPPH

Se preparó una solución metanólica del radical DPPH de concentración 0,1 mM (23). Un volumen de 50 µl del extracto total de cada fracción se mezcló con 2 ml del DPPH[•], la mezcla se incubó por 30 min en oscuridad, seguidamente se leyó la absorbancia a 517 nm, frente a un blanco. Los datos de absorbancia de las muestras se interpolaron en una curva de calibración estándar de Trolox[®] (Sigma, CAS No. 53188-07-1) y se expresaron como mM de Equivalentes Trolox (ET). También se calculó el porcentaje de captación del DPPH[•] (% CR) vs tiempo (estudio cinético), utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CR} = \frac{\text{Ab Control} - \text{Ab Muestra}}{\text{Ab Control}} \times 100$$

Donde, Ab Control corresponde a la absorbancia de la mezcla de reacción sin la muestra, y Ab Muestra es la absorbancia de cada eluido.

Ensayo de captación del ABTS^{•+}

El radical catiónico ABTS^{•+} (Sigma-Aldrich®, CAS No. 30931-67-0) se generó a partir de la reacción del ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico con persulfato de potasio (Fluka-Sigma-Aldrich®, CAS No. 77727-21-1). Se

mezclaron partes iguales de una solución metanólica de ABTS 7 mM con una solución acuosa de persulfato potásico 2,45 mM; la mezcla se mantuvo en oscuridad, a temperatura ambiente durante 16 horas para la formación del radical. Un volumen de 100 µl de cada fracción se mezcló con 1 ml de la solución del ABTS^{•+} (Ab734 = 0,7), la mezcla se incubó por 10 min en oscuridad, seguidamente se leyó la absorbancia a 517 nm, frente a un blanco. Los datos de absorbancia de las muestras se interpolaron en una curva de calibración estándar de Trolox y se expresaron como mM de Equivalentes Trolox (ET). También se calculó el porcentaje de captación del ABTS^{•+} (% CR) vs tiempo.

Análisis de las fracciones fenólicas por HPLC-EM

Para la identificación de los compuestos presentes en los eluidos F1, F2 y F3 se realizó un análisis de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-EM), en un equipo Agilent 1100 G1956A VL-LC con detector selectivo de masas, usando la columna Zorbax Rapid Resolution Eclipse Plus Stable Bond Poroshell XDB-C18 de 100 mm x 4,6 mm d.i y 3,5 µm de tamaño de partícula.

El protocolo consistió de una fase móvil binaria. La composición de la fase A fue 10% (v/v) de CH₃CN en H₂O y 0,05% (v/v) de CH₃-COOH; y, la composición de la fase B fue 90% (v/v) de CH₃CN en H₂O y 0,05% (v/v) de CH₃-COOH. La elución de la columna se llevó a cabo con el siguiente gradiente lineal: 0,0 min 100% de la fase A con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min – 39,0 min 100% de la fase B con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min – 40,0 min 100% de la fase B con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min – 41,0 min 100% de A con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min – 46,0 min 100% de A con una velocidad de flujo de 1,0 ml/min – 47,0 min 100% de A con una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Durante el escaneo del espectro de masa la velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min. El volumen de inyección de la muestra fue de 10 µl.

La fuente de ionización usada fue electrospray (ESI) de polaridad negativa. El rango de masas fue desde 50 hasta 1500 m/z; una Misa Precisión de $\pm 0,13$ u, las cuales están dentro del rango de masas calibradas; una Misa Axis Estabilidad de $\pm 0,13$ hasta poco más 8 horas; una velocidad de barrido: 2500 u/s y una sensibilidad SIM: min 400 μl en ESI, APCI o actualizar a 1000 L/min. La interpretación de los espectros de masa se realizó por comparación con los espectros reportados en la literatura.

Análisis de datos

Los ensayos de determinación del contenido de fenoles totales y de actividad captadora de radicales libres DPPH⁻ y ABTS⁺ se realizaron por triplicado, los datos obtenidos se sometieron a un

análisis estadístico univariado utilizando medidas de frecuencia, pruebas de tendencia central y de dispersión, usando el paquete estadístico SPSS Statistics 19 para Windows de IBM (SPSS Inc., an IBM Company, Chicago, IL, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aceite esencial de hojas de yacón

El rendimiento de la extracción del aceite esencial fue 0,363 ml/kg de hoja seca. La cromatografía de gases separó 35 componentes, de los cuales 96,2% fueron identificados. Los quimiotipos principales fueron monoterpenos (50,8%) y sesquiterpenos (31,1%). La Tabla 1 presenta los compuestos identificados por CG/EM.

Tabla 1. Compuestos químicos del aceite esencial de hojas de yacón colectadas en el municipio de Duitama (Boyacá, Colombia), identificados por CG/EM.

t_{R}^* (min)	Compuesto	Ík**		Cantidad relativa (%)	Concentración (ppm)
		Teórico	Experimental		
09,00	4-metilhexanal	-	874,107	0,176	27,548
11,08	a-Tujeno	925	924,741	0,406	66,321
11,32	a-Pineno	937	930,367	2,452	399,566
13,17	Sabineno	973	972,838	40,746	6637,764
13,91	b-Mirceno	992	989,901	1,522	247,205
14,88	a-Terpineno	1017	1013,726	1,076	172,416
15,21	p-Cimeno	1021	1022,228	0,535	87,596
15,37	3-Isopropenil-5,5-Dimetilciclopenteno	-	1026,248	0,553	89,163
15,86	trans-b-Ocimeno	1039	1038,796	0,658	106,736
16,65	g-Terpineno	1060	1058,95	2,236	361,072
16,96	cis-4-Tujanol	-	1067,017	2,744	292,820
17,81	a-Terpinoleno	1088	1088,809	0,598	96,581
19,09	Trans-p-Ment-2-en-1-ol	-	1121,485	0,427	68,881
19,79	Cis-p-Ment-2-en-1-ol	1139	1139,539	0,26	42,162
21,27	1-Terpinen-4-ol	1177	1177,311	5,512	893,562
21,73	a-Terpineol	1190	1189,117	0,226	36,683
23,79	p-ment-4-en-3-ona	-	1247,832	0,198	31,940
26,91	d-Elemeno	1330	1338,882	1,228	196,308
27,80	Ciclosativeno	-	1367,149	0,276	44,358
28,18	a-Cubebeno	-	1375,997	0,408	63,533

t_R^* (min)	Compuesto	$\bar{I}k^{**}$		Cantidad relativa (%)	Concentración (ppm)
		Teórico	Experimental		
28,48	b-Bourboneno	1384	1384,669	0,217	36,121
28,66	b-Cubebeno	1388	1389,955	1,076	174,238
29,66	Cariofileno	1420	1421,401	9,932	1599,916
30,68	a-Humuleno	1455	1454,901	1,117	176,179
31,45	g-Cadineno	1481	1480,184	0,31	49,706
31,62	D-Germacreno	1485	1485,93	15,36	2426,482
31,73	a-Selineno	1488	1489,378	0,34	54,601
32,02	Biciclogermacreno	-	1498,933	0,388	62,359
32,12	a-Muuroleno	1504	1502,184	0,244	39,471
32,82	d-Cadineno	1528	1525,333	2,322	375,076
34,37	Germacren-D-4-ol	-	1576,063	0,41	66,268
34,60	Óxido de Cariofileno	1582	1583,714	0,972	156,823
36,26	t-Muurolol	1640	1642,573	0,458	74,808
41,66	Hexahidrofarnesil Acetona	-	1843,194	0,648	104,462
43,53	Farnesil Acetona	1918	1917,337	0,207	33,280

(*) Tiempo de retención.

(**) Índice de Kovats.

El ensayo ABTS⁺ demostró que el aceite esencial de hojas de yacón presenta actividad captadora de radicales libres ($CE_{50} = 2,11 \text{ mg/ml}$). El máximo % CR se obtuvo a una concentración de aceite esencial de 17,5 mg/ml (% I = 97,2±0,91%); en comparación, el % CR por el a-tocoferol fue menor (% I = 43,2±1,06% a 17,5 mg/ml). Adicionalmente, se estableció que el Sabineno no contribuye a la capacidad captadora del ABTS⁺, obteniéndose un valor de inhibición máxima del 2,7±1,13% a la concentración de 300 mg/ml.

Fracciones fenólicas del extracto etanólico de hojas de yacón

Se obtuvieron tres fracciones de la columna de Amberlita XAD-2, a saber: fracción eluida con H₂O (F1); fracción eluida con MeOH/H₂O (F2); fracción eluida con MeOH (F3). La presencia de compuestos con actividad antioxidante fue evidenciada en todas las fracciones, mediante cromatografía en capa fina revelada con DPPH· 0,5 M (Figura 1).

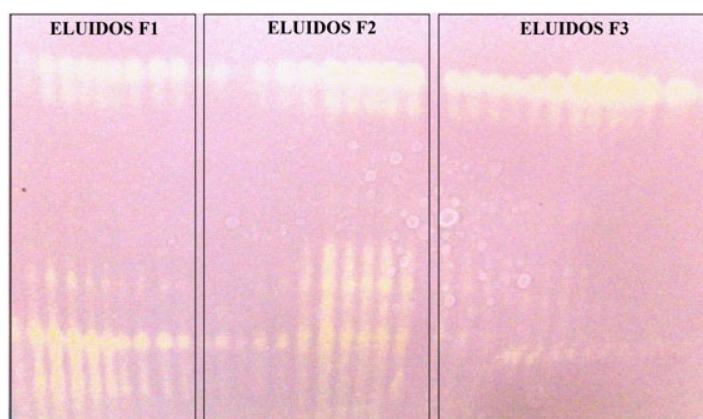


Figura 1. Perfil cromatográfico de las fracciones fenólicas del extracto etanólico de hojas de yacón (cromatoplaca revelada con DPPH 0,5 M). Se observan señales comunes en los tres eluidos.

Cuantificación de fenoles totales

La Figura 2 presenta la curva de calibración con ácido gálico para el ensayo de Folin-Ciocalteu.

El contenido de fenoles totales en las fracciones eluidas de la Amberlita se muestra en la Tabla 2, con el siguiente orden de elución: F1 > F2 > F3.

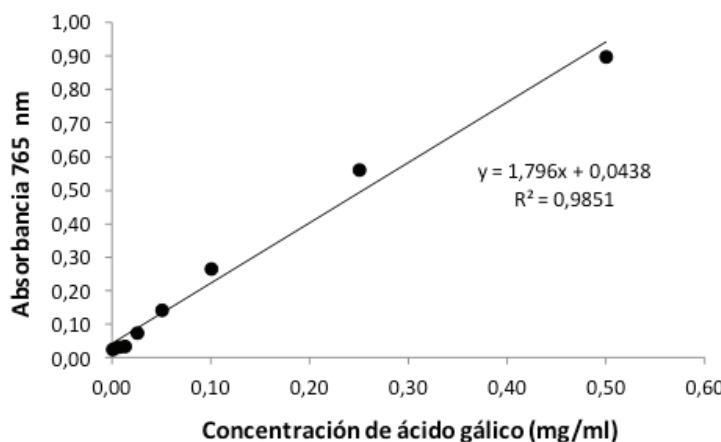


Figura 2. Curva de calibración de ácido gálico.

Tabla 2. Fenoles totales en las fracciones de extracto etanólico de hojas de yacón eluidas de la Amberlita XAD-2.

Muestra	mg EAG/ml (Media±DE)
F1	0,348±0,011
F2	0,161±0,016
F3	0,106±0,008

Ensayo del DPPH

Las tres fracciones fenólicas eluidas de la columna Amberlita XAD-2 presentaron actividad

captadora del DPPH, siendo la fracción F1 (eluido con H₂O) la que presentó mayor actividad a los 30 min de reacción (Tabla 3).

Tabla 3. Capacidad captadora de DPPH[·] de las fracciones fenólicas del extracto etanólico de hojas de yacón.

Muestra	Media±de	
	Et [*] (mm)	% Cr ^{**}
F1	2,821±0,018	91,15±0,93
F2	2,801±0,008	90,96±0,43
F3	2,773±0,020	89,53±1,06

(*) Equivalentes Trolox.

(**) Porcentaje de captación del DPPH[·] a 30 min de reacción.

Los resultados de la evaluación de la capacidad reductora del DPPH[·] con relación al tiempo, sugieren la presencia de compuestos con mayor capacidad antioxidante en la fracción eluida con

H₂O, observándose que la reducción del 50% del DPPH[·] se alcanza, aproximadamente, a los 3 min de reacción (Figura 3).

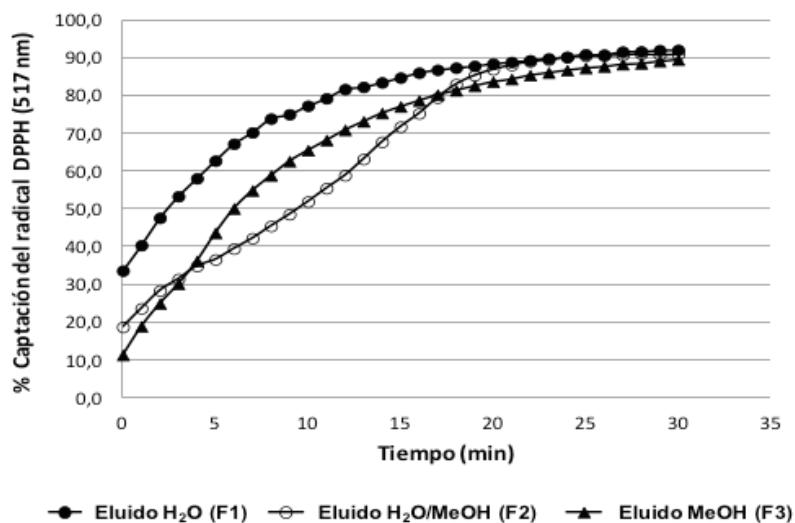


Figura 3. Cinética de la reducción del radical DPPH en las fracciones fenólicas de las hojas de yacón.

Ensayo del ABTS

Los resultados de captación del ABTS⁺ son consistentes con lo observado en la reacción con DPPH[·]. Todas las fracciones eluidas de la columna

de Amberlita XAD-2 mostraron actividad captadora de este radical, observándose mayor poder reductor en las fracciones F1 (eluido con H₂O) y F2 (eluido con H₂O/MeOH) a los 10 minutos de reacción (Tabla 4).

Tabla 4. Capacidad captadora de ABTS⁺ de las fracciones fenólicas del extracto etanólico de hojas de yacón.

MUESTRA	Media±DE	
	ET* (mM)	% CR**
F1	0,619±0,001	100,06±0,13
F2	0,619±0,001	99,97±0,05
F3	0,618±0,002	99,71±0,12

(*) Equivalentes Trolox.

(**) Porcentaje de captación del ABTS⁺ a 10 min de reacción.

Adicionalmente, la evaluación de la capacidad reductora del ABTS⁺ con relación al tiempo, sugiere que no hay diferencia entre las fracciones,

observándose reducción de cerca del 90% del ABTS⁺ antes de 2 min de reacción (Figura 4).

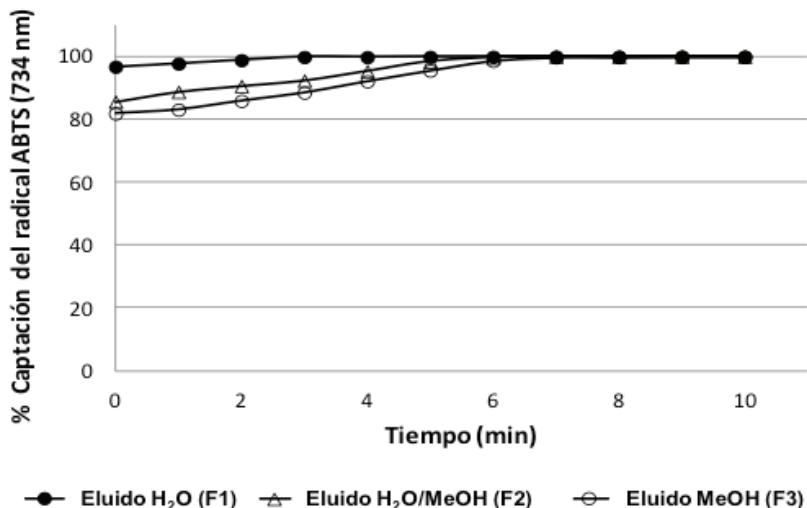


Figura 4. Cinética de la reducción del catión radical ABTS en las fracciones fenólicas de las hojas de yacón.

Análisis de las fracciones fenólicas por HPLC-EM

Se evidenció la presencia de ácidos fenólicos en forma de glucósidos y agliconas, en todas

las fracciones del extracto etanólico de hojas de yacón eluidas de la columna Amberlita XAD. Los iones pseudomoleculares comunes en las tres fracciones fueron consistentes con derivados del ácido quínico, cafeico y ferúlico (Tabla 5).

Tabla 5. Datos del análisis HPLC-EM (ESI negativo) de las fracciones fenólicas F1, F2 y F3 del extracto etanólico de hojas de yacón.

Posible compuesto*	[M-H] (m/z)	Fragmentaciones (m/z)	t _r (min)		
			F1	F2	F3
Ácido quínico	191	-	NP**	1,898	1,993
Derivado del ácido hidroxiferúlico	371	191, 209	1,886	NP	NP
Derivado del ácido cafeoilquínico	353	209, 191, 179	3,997	NP	NP
Derivado del ácido hidroxiferúlico	371	209, 191	NP	4,316	4,209
Derivado del ácido hidroxiferúlico	371	209, 191, 743	NP	5,315	6,056
Derivado del ácido cafeoilquínico	353	191, 179, 707	NP	6,688	6,642
Ácido dicafeoilglucárico	533	371, 209, 161, 707	10,736	10,706	10,688
Ácido dicafeoilquínico	515	353, 209, 161	NP	NP	13,227
Derivado del ácido hidroxiferúlico	371	193, 161, 209, 191	14,549	NP	NP
No identificado	331	301, 695	NP	NP	16,427
Ácido cafeoiltartárico	311	179	35,702	35,675	NP

(*) Identidad del compuesto asignada de acuerdo a datos tomados de la literatura.

(**) Compuesto no presente.

A continuación se presenta el análisis de cada compuesto:

a) Caracterización de los derivados del ácido cafeoilquínico: Estos presentan un ion pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 353 y productos iónicos a m/z 173 ([ácido quínico-H-H₂O]), acompañado por fragmentos secundarios a m/z 179 ($[M-H-\text{ácido quínico}]^-$) y m/z 191 ($[M-H-\text{ácido cafeico}]^-$) (24). Otro compuesto es el ácido dicafeoilquínico, el cual se caracteriza por presentar un ion pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 515, un producto iónico que corresponde a la forma desprotonada del ácido cafeoilquínico (m/z 353) y señales a m/z 209 ([ácido quínico-H+H₂O]) y m/z 161 ([ácido cafeico-H-H₂O]) (25) (Figura 5).

b) Caracterización de los derivados del ácido hidroxiferúlico: Estos compuestos presentan un ion pseudomolecular con $[M-H]^-$ a m/z 371, cuyo patrón de fragmentación es consistente con el descrito por Simirgiotis y colaboradores (26), para los isómeros glicosilados del ácido cinámico que presentan un grupo CH₃O- y dos grupos OH- sustituidos en el anillo aromático (ácido hidroxi-isoferúlico o ácido hidroxiferúlico). La fragmentación de estos compuestos produce iones de m/z 209 ($[M-H-162]^-$) y m/z 191 ($[M-H-$

162-H₂O]), debido a la pérdida de una unidad de azúcar hexosa [hexosa-H₂O] (Figura 6). El producto iónico de 193 unidades de masa atómica (uma) corresponde a la molécula desprotonada del ácido ferúlico (PM = 194 Dalton).

c) Caracterización del ácido dicafeoilglucárico: Este compuesto presenta un ion pseudomolecular con $[M-H]^-$ a m/z 533 y tres productos iónicos a 371, 209 y 191 uma. Un compuesto con patrón de fragmentación similar fue descrito previamente como ácido dicafeoilglucárico (27). El producto iónico de m/z 209 se interpretó como un ácido aldárico de seis átomos de carbono (ácido glucárico, C₆O₈H₁₀), el cual sufre una deshidratación subsiguiente liberándose un fragmento de m/z 191 [209-H₂O]⁻. La pérdida de dos fragmentos de 162 uma, la primera desde el m/z 533 a 371 y la segunda desde el m/z 371 a 209, fue interpretado como la pérdida de dos grupos cafeoilos (C₉O₃H₆) diferentes; este patrón de fragmentación sugiere la presencia de dos isómeros del ácido dicafeoilglucárico (Figura 7).

d) Caracterización del ácido cafeoiltartárico: Este compuesto presenta un ion pseudomolecular $[M-H]^-$ con m/z 311; su fragmentación genera un producto iónico a m/z 179 ($[M-H - \text{tartárico}]^-$), descrito previamente en la literatura (27). (Figura 8).

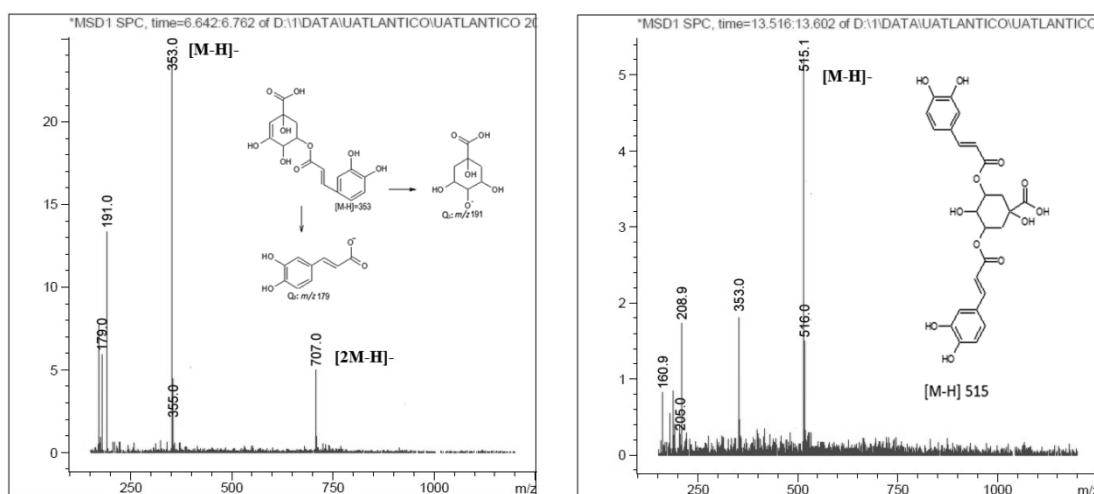


Figura 5. Espectros de masa ESI de derivados del ácido cafeoilquínico ($[M-H]^-$ a m/z 353) y dicafeoilquínico ($[M-H]^-$ a m/z 515) identificado tentativamente en el extracto etanólico de hojas de yacón.

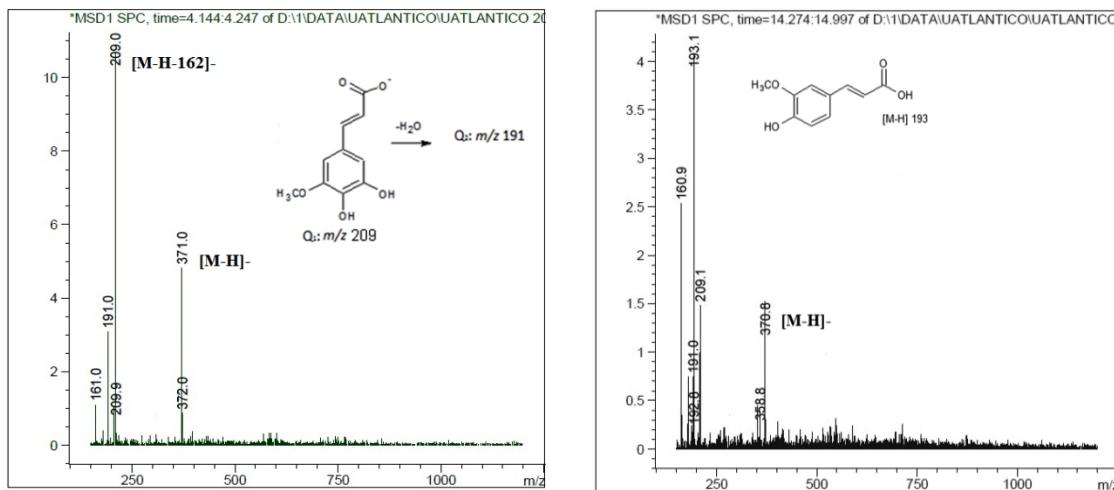


Figura 6. Espectros de masa ESI de dos derivados del ácido hidroxiferúlico ($[M-H]^-$ a m/z 371) identificados tentativamente en el extracto etanólico de hojas de yacón.

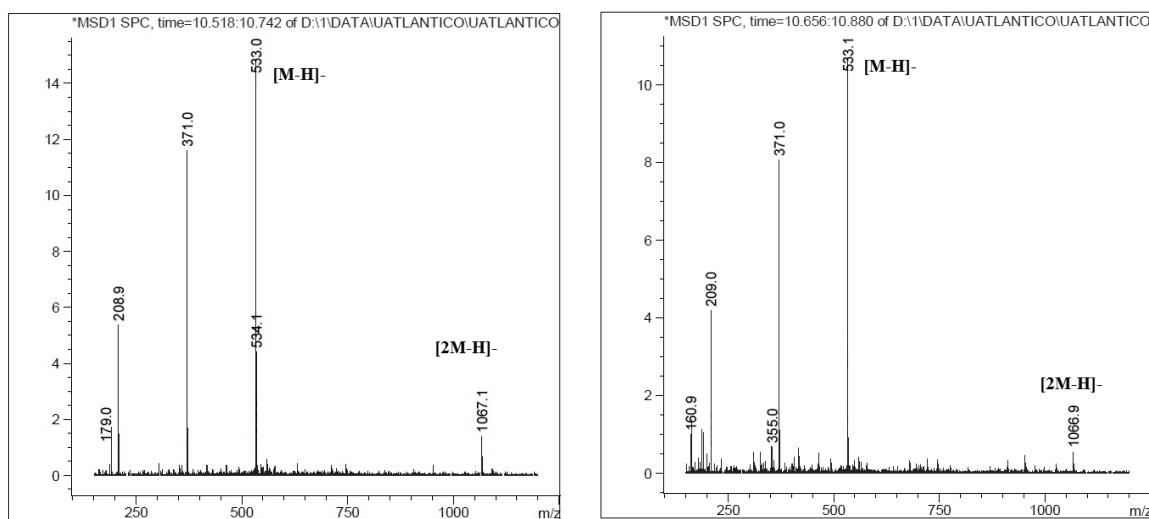


Figura 7. Espectros de masa ESI del ácido dicafeoilglucárico ($[M-H]^-$ a m/z 533) identificado tentativamente en el extracto etanólico de hojas de yacón.

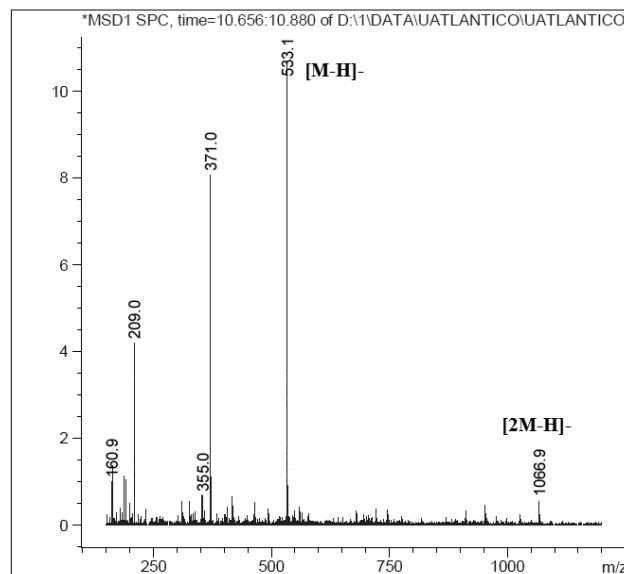


Figura 8. Espectros de masa ESI del ácido cafeoiltartárico ($[M-H]^-$ a m/z 311) identificado tentativamente en el extracto etanólico de hojas de yacón.

DISCUSIÓN

En Colombia, son escasos los estudios de caracterización química de variedades de yacón que son cultivadas o que crecen en forma silvestre. En este trabajo se demostró que, tanto el aceite esencial como el extracto etanólico de las hojas de yacón cultivadas en la vereda Tocogua del municipio de Duitama (Boyacá), poseen actividad captadora de radicales libres.

La composición química del aceite esencial obtenido difiere de la descrita previamente en variedades de yacón cultivadas en Ecuador (28) y China (29). En la variedad ecuatoriana, los compuestos volátiles fueron aislados por microextracción en fase sólida, identificándose principalmente b-pineno, cariofileno y g-cadineno; el aceite esencial de la variedad cultivada en China se obtuvo por hidrodestilación y se identificaron b-felandreno (26,3%), b-cubeneno (17,7%), b-cariofileno (14%) y b-bourboneno (10,2%), mayoritariamente. La diferencia en la composición puede estar asociada con factores abióticos relacionados con el sitio de cultivo.

Se ha demostrado que metabolitos presentes en el aceite esencial de hojas de yacón poseen actividad antioxidante. Ruberto y Baratta, describieron la actividad antioxidante de los hidrocarburos monoterpénicos a-Terpinoleno, a-Terpineno y g-Terpineno, usando el método de inhibición de la oxidación del ácido linoleico; este estudio también reportó una leve actividad antioxidante del (+)-Sabineno (30). Otros trabajos describieron la actividad antioxidante de los monoterpenos a-pineno (31) y p-cimeno (32). Lo anterior sugiere que estos metabolitos podrían actuar sinérgicamente en el proceso de captación del ABTS⁺.

La actividad captadora de radicales libres en las fracciones fenólicas del extracto etanólico de hojas de yacón se relacionó positivamente con el contenido de fenoles totales. Las moléculas identificadas tentativamente en las fracciones fenólicas fueron derivadas de los ácidos cafeoilquínico, dicafeoilglucárico, hidroxiferúlico, cafeoiltartárico y dicafeoilquínico. La mayoría de estos compuestos habían sido descritos en extractos de hojas de yacón cultivados en otros países andinos (16, 17). Valentová y colaboradores reportaron

ácido cafeico, cafeoilquínico y ferúlico en extractos de hojas obtenidos con acetato de etilo (33), posteriormente estos ácidos fueron confirmados mediante HPLC acoplado a un sistema de detección electroquímica (HPLC-ECD), identificándose además el ácido gálico y gentísico (34). Otro estudio, describió el análisis de tres isómeros del ácido dicafeoilquínico y un derivado del ácido cafeoilquínico de identidad desconocida (PM = 562 Dalton), mediante HPLC acoplado a masa (16). Estos ácidos fenólicos también se detectaron en las antenas, cálices y tubérculos de yacón (35).

Investigaciones recientes presentan evidencia de que los ácidos clorogénico, cafeico, ferúlico e isómeros del dicafeoilquínico son inhibidores

de enzimas digestivas de los carbohidratos, como la alfa-amilasa y la alfa-glucosidasa (36, 37), lo que ofrecería una explicación del efecto hipoglucemiante de los extractos y productos preparados con base en hojas de yacón. Por otra parte, se plantea que los ácidos fenólicos presentes en las hojas de yacón podrían contrarrestar los procesos de peroxidación de lipoproteínas plasmáticas, membranas de eritrocitos y tejidos en individuos diabéticos.

En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que las plantas de yacón cultivadas en el departamento de Boyacá deberían ser exploradas como fuente de compuestos antioxidantes con potencial uso en la prevención de las complicaciones de la diabetes mellitus.

BIBLIOGRAFÍA

1. Isla P. Chronic complications of diabetes mellitus. Recommendations from the American Diabetes Association 2011. Prevention and management. Rev Enferm 2012; 35(9):46-52.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2008; 31(1):55-60.
3. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Res Clin Pract 2010; 87(1):4-14.
4. Dixon SJ, Stockwell BR. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. Nat Chem Biol 2014; 10(1):9-17.
5. Crujeiras AB, Díaz-Lagares A, Carreira MC, Amil M, Casanueva FF. Oxidative stress associated to dysfunctional adipose tissue: a potential link between obesity, type 2 diabetes mellitus and breast cancer. Free Radic Res 2013; 47(4):243-56.
6. Mohora M, Vîrgolici B, Paveliu F, Lixandru D, Muscurel C, Greabu M. Free radical activity in obese patients with type 2 diabetes mellitus. Rom J Intern Med 2006; 44(1):69-78.
7. Muhammad S, Bierhaus A, Schwaninger M. Reactive oxygen species in diabetes-induced vascular damage, stroke, and Alzheimer's disease. J. Alzheimers 2009; 16:775-78.
8. Mrowicka M. Free-radical reactions in diabetes mellitus. Pol Merkur Lekarski 2005; 19(112):571-6.
9. Ryu GR, Lee E, Chun HJ, Yoon KH, Ko SH, Ahn YB, et al. Oxidative stress plays a role in high glucose-induced activation of pancreatic stellate cells. Biochem Biophys Res Commun 2013; 439(2):258-63.
10. Zatalia SR, Sanusi H. The role of antioxidants in the pathophysiology, complications, and management of diabetes mellitus. Acta Med Indones 2013; 45(2):141-7.
11. Alam MM, Meerza D, Naseem I. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. Life Sci 2014; 109(1):8-14.

12. Valentová K, Ulrichová J. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* - prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2003; 147(2):119-30.
13. Choi JG, Kang OH, Lee YS, Oh YC, Chae HS, Obiang-Obounou B, et al. Antimicrobial activity of the constituents of *Smallanthus sonchifolius* leaves against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2010; 14(12):1005-9.
14. De Almeida Paula HA, Abrançhes MV, De Luces Fortes Ferreira CL. Yacón (*Smallanthus sonchifolius*): a food with multiple functions. Crit Rev Food Sci Nutr 2015; 55(1):32-40.
15. Valentova K, Cvak L, Muck A, Ulrichova J, Simanek V. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. Eur J Nutr 2003; 42(1):61-6.
16. Simonovska B, Vovk I, Andrensek S, Valentová K, Ulrichová J. Investigation of phenolic acids in yacón (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. J Chromatogr A 2003; 1016(1):89-98.
17. Xiang Z, He F, Kang TG, Dou DQ, Gai K, Shi YY, et al. Anti-diabetes constituents in leaves of *Smallanthus sonchifolius*. Nat Prod Commun 2010; 5(1):95-8.
18. Combariza MY, Blanco C, Stashenko EE, Shibamoto T. Limonene concentration in lemon (*Citrus volcameriana*) peel oil as a function of ripeness. J High Resol Chromatogr 1994; 17(9):643-6.
19. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 1999; 26:1231-7.
20. Siddiqui S, Verma A, Rather AA, Jabeen F, Meghvansi K. Preliminary phytochemical analysis of some important aromatic plants. Adv Biol Res 2009; 3(5-6):188-95.
21. Osler KH, Goodwin R. A general use of Amberlite XAD-2 resin for the purification of flavonoids from aqueous fractions. J Nat Prod 1983; 47(1):188.
22. Blainski A, Lopes GC, de Mello JC. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. Molecules 2013; 18(6):6852-65.
23. Goyal AK, Middha SK, Sen A. Evaluation of the DPPH radical scavenging activity, total phenols and antioxidant activities in Indian wild *Bambusa vulgaris* "Vittata" methanolic leaf extract. J Nat Pharm 2010; 1:40-45.
24. Chen HJ, Inbaraj BS, Chen BH. Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique. Int J Mol Sci 2012; 13(1):260-85.
25. Harrinson H, Mitchell T, Peterson JK, Wechter P, Majetich GF, Snook ME. Contents of caffeoylquinic acid compounds in the storage roots of sixteen sweetpotato genotypes and their potential biological activity. J Amer Soc Hort Sci 2008; 133(4):492-500.
26. Simirgiotis MJ, Caligari PDS, Schmeda-Hirschmann G. Identification of phenolic compounds from the fruits of the mountain papaya *Vasconcellea pubescens* A. DC. grown in Chile by liquid chromatography-UV detection-mass spectrometry. Food Chemistry 2009; 115:775-84.
27. Lorenz P, Conrad J, Bertrams J, Berger M, Duckstein S, Meyer U, et al. Investigations into the Phenolic Constituents of Dog's Mercury (*Mercurialis perennis* L.) by LC-MS/MS and GC-MS analyses. Phytochem. Anal 2012; 23(1):60-71.
28. Adam M, Juklová M, Bajer T, Eisner A, Ventura KJ. Comparison of three different solid-phase microextraction fibres for analysis of essential oils in yacón (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. J Chromatogr A 2005; 1084(1-2):2-6.
29. Li J, Lan H, Zheng M, Rong T. GC-MS analysis of the chemical constituents of the essential oil from the leaves of yacón (*Smallanthus sonchifolia*). Front Agric China 2009; 3(1):40-2.
30. Ruberto G, Baratta MT. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. Food Chemistry 2000; 69:167-74.

31. Huang CC, Wang HF, Chen CH, Chen YJ, Yih KH. A study of four antioxidant activities and major chemical component analyses of twenty-five commonly used essential oils. *J Cosmet Sci* 2011; 62(4):393-404.
32. Sahin Basak S, Candan F. Effect of *Laurus nobilis* L. Essential Oil and its Main Components on α -glucosidase and Reactive Oxygen Species Scavenging Activity. *Iran J Pharm Res* 2013; 12(2):367-79.
33. Valentová K, Sersen F, Ulrichová J. Radical scavenging and anti-lipoperoxidative activities of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts. *J Agric Food Chem* 2005; 53(14):5577-82.
34. Jirovský D, Horáková D, Kotouček M, Valentová K, Ulrichová J. Analysis of phenolic acids in plant materials using HPLC with amperometric detection at a platinum tubular electrode. *J Sep Sci* 2003; 26:739-42.
35. Lachman J, Hejtmánková A, Dudjak J, Fernández EC, Pivec V. Content of polyphenolic antioxidants and phenolcarboxylic acids in selected organs of yacón [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. et Endl.) H. Robinson]. In: Blatná J, Horna A, editors. *Vitamins 2003, Proceeding of Conf. Pardubice, Czech Republic, 15-17 September 2003*. Pardubice: Univerzita Pardubice; 2003. p. 89-97.
36. Oboh G, Agunloye OM, Adefegha SA, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2014 May 12.
37. Dalar A, Türker M, Zabaras D, Konczak I. Phenolic composition, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Eryngium bornmuelleri* leaf. *Plant Foods Hum Nutr* 2014; 69(1):30-6.