



## Inhibición *in vitro* de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl).

Dary Luz Mendoza Meza\*, Ramón Medina Valdés

Grupo de Investigación en Productos Naturales y Bioquímica de Macromoléculas.  
Universidad del Atlántico. Atlántico, Colombia

(\*) [darymendoza@mail.uniatlantico.edu.co](mailto:darymendoza@mail.uniatlantico.edu.co)

Recibido: 03/11/2014

Revisado: 22/01/2015

Aceptado: 23/02/2015

### Resumen

El yacón es un cultivo andino con propiedades antioxidantes y dietarias. En este estudio se obtuvieron extractos etanólicos a partir de hojas de yacón colectadas en Chía (Cundinamarca) y San Francisco (Antioquía), Colombia. El contenido máximo de fenoles y flavonoides totales fue:  $11,6 \pm 0,4$  mg AGE/mL y  $0,37 \pm 0,03$  mg EQ/mL, para Chía;  $5,04 \pm 0,13$  mg AGE/mL y  $0,21 \pm 0,03$  mg EQ/mL, para San Francisco. Todas las muestras exhibieron inhibición *in vitro* de las enzimas alfa-amilasa y lipasa pancreática. El análisis por HPLC-EM mostró iones pseudomoleculares correspondientes a la quercetina, ácidos clorogénico, ferúlico, cafeico y quínico. Los resultados sugieren que las hojas de yacón contienen metabolitos que podrían ser utilizados como alternativa para el control de la obesidad.

**Palabras claves:** ácidos fenólicos; alfa-amilasa pancreática; flavonoides; lipasa pancreática; *Smallanthus sonchifolius*

### Abstract

Yacon is an Andean crop with antioxidant and dietary properties. In this study the ethanolic extracts were obtained from yacon leaves collected in Chía (Cundinamarca) and San Francisco (Antioquía), Colombia. The maximum content of total phenols and flavonoids was  $11.6 \pm 0.4$  mg GAE/mL and  $0.37 \pm 0.03$  mg QE/mL to Chía;  $5.04 \pm 0.13$  mg GAE/mL and  $0.21 \pm 0.03$  mg QE/mL to San Francisco. All samples showed *in vitro* inhibition of pancreatic alpha-amylase and lipase enzymes. HPLC-MS analysis showed pseudomolecular ions corresponding to quercetin and chlorogenic acid, ferulic, caffeic and quinic. The results suggest that yacon leaves contain metabolites that could be used as an alternative for controlling obesity.

**Keywords:** Phenolic acids; pancreatic alpha-amylase; flavonoids; pancreatic lipase; *Smallanthus sonchifolius*

### Introducción

La obesidad ha sido catalogada como uno de los problemas de salud pública más prevalentes en todas las poblaciones y grupos etarios alrededor del mundo, relacionándose con el aumento de la mortalidad y la morbilidad por enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, síndrome metabólico y algunos tipos de cáncer<sup>1-3</sup>. Por lo anterior, la prevención y el tratamiento de la obesidad son prioridades importantes para los sistemas de salud de varios países de América, siendo las modificaciones en el estilo de vida y el tratamiento farmacológico las medidas de intervención más consideradas por médicos y especialistas en salud, para lograr la disminución del peso corporal<sup>4</sup>.

Investigaciones realizadas en los últimos años demuestran que sólo un 5-10 % de los pacientes pueden mantener su pérdida de peso, después de la suspensión de la modificación del estilo de vida o la farmacoterapia<sup>5,6</sup>, lo cual sugiere que es necesario desarrollar otras modalidades de tratamiento que

produzcan mejores resultados y más sostenibles<sup>6</sup>. Los suplementos producidos a partir de extractos de plantas y terapias a base de dietas, son algunas de las estrategias más comunes para bajar de peso en medicina complementaria y alternativa<sup>7,8</sup>.

El yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl, Asteraceae) es una planta de origen andino, con propiedades medicinales, utilizada como pre-biótico, para el control de la glicemia y del peso corporal<sup>9,10</sup>. Gonzales y colaboradores (2013) y Genta y colaboradores (2010) demostraron el efecto hipoglucemiante *in vivo* de extractos orgánicos de hojas de yacón, a través de un modelo experimental de ratones con diabetes inducida con estreptozotocina<sup>11,12</sup>; adicionalmente, Roselino y colaboradores en 2012, observaron normalización en los niveles de triglicéridos y colesterol HDL en ratas diabéticas que fueron alimentadas con dietas suplementadas con extracto de yacón<sup>13</sup>. También existe evidencia que demuestra el efecto antioxidante e inhibidor de la actividad

alfa-glucosidasa *in vitro*, de extractos de partes aéreas de yacón, lo cual se ha atribuido a la presencia de compuestos polifenólicos<sup>14-16</sup>.

A pesar del alto potencial medicinal del yacón, en Colombia se le da poca importancia a esta planta, y son escasas las investigaciones encaminadas a conocer su diversidad genética, características fitoquímicas y propiedades farmacológicas. Uno de los pocos estudios publicados en Colombia acerca del yacón describe la existencia de diez biotipos y cuatro genotipos diferentes cultivados en la zona del Eje Cafetero<sup>17</sup>; esta información sugiere la existencia de una amplia diversidad genética en el país y, por consiguiente, la necesidad de realizar estudios a nivel químico y biológico que permitan hallar las variedades con mayor potencial nutracéutico.

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto inhibidor *in vitro* de las enzimas alfa-amilasa pancreática y lipasa pancreática, por fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de yacón cultivadas en dos municipalidades colombianas: Chía, en el departamento de Cundinamarca, y San Francisco, en el departamento de Antioquia.

## Parte experimental

### Material vegetal

Hojas de yacón colectadas en cultivos establecidos en el municipio de Chía (Cundinamarca), Latitud 4°51'48"N, Longitud 74°03'10"O, Altitud 2600 msnm y temperatura promedio de 14°C; y en el municipio de San Francisco (Antioquia), Latitud 5°57'51"N, longitud 75°06'06"O, altitud 1250 msnm y temperatura promedio de 21 °C. Las hojas fueron seleccionadas considerando su buen estado fitosanitario y tamaño similar; adicionalmente una planta completa fue enviada al Herbario Nacional de Colombia, adscrito al Instituto de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia (Sede Bogotá), para la certificación de la identidad botánica, obteniéndose los números de colección 576675 y 576676.

### Extractos etanólicos de hojas de yacón

La obtención de los extractos se realizó mediante percolación, a partir de 5 Kg de las hojas previamente maceradas y pulverizadas, usando como solvente etanol del 70 % (v/v) (Mallinckrodt Baker Inc., St. Louis, Missouri USA). El producto obtenido se filtró y envasó en frascos de vidrio de color ámbar. Parte de este extracto fue concentrado a presión de 50 mbar y temperatura de 50 °C en un rota- evaporador Laborata 4000 (Heidolph), luego fue almacenado a 4 °C.

### Separación de las fracciones fenólicas

Se realizó mediante cromatografía de columna (40 x 2 cm), usando la resina Amberlita XAD-2 (Sigma, 20-60 mesh), con una velocidad de flujo del solvente de 10 mL/min<sup>18</sup>. Se

agregó a la columna 1 g del extracto seco, seguido se lavó con 20 mL de H<sub>2</sub>O destilada y 20 mL de una mezcla H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1, v/v). Los compuestos fenólicos se eluyeron con 20 mL MeOH 96 %, colectándose fracciones de aproximadamente 1,5 mL.

### Cuantificación de compuestos fenólicos totales

Este ensayo se realizó con las fracciones eluidas de la Amberlita XAD-2, usando el método de Folin-Ciocalteu<sup>19</sup>. Un volumen de 50 µL de cada fracción se mezcló con 50 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España), seguido se adicionó a la reacción 50 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % (p/v). La absorbancia de la muestra se leyó en un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 20, a longitud de onda de 765 nm, las lecturas obtenidas se interpolaron en una curva de calibración del estándar de ácido gálico (R<sup>2</sup> = 0,99). Los resultados se expresaron en términos de miligramos de ácido gálico equivalente por mililitro del eluido (mg AGE/mL). El cálculo se realizó usando la siguiente ecuación:

$$\text{Fenoles totales} = [(A_M - A_B) - b]/m \quad (1)$$

donde, A<sub>M</sub> es la absorbancia de las fracciones con el reactivo de Folin-Ciocalteu; A<sub>B</sub> es la absorbancia de las fracciones sin el reactivo; b y m son el intercepto y la pendientes de la curva de calibración, respectivamente.

### Cuantificación de flavonoides totales

Este ensayo se realizó con las fracciones eluidas de la Amberlita XAD-2, para lo cual se usó un procedimiento descrito previamente, al cual se le hizo pocas modificaciones<sup>20</sup>. Un volumen de 50 µL de cada fracción eluida de la columna Amberlita XAD-2 se mezcló con 10 µL de una solución de AlCl<sub>3</sub> al 10 % (p/v) y 10 µL de acetato de sodio 1 M en etanol absoluto (150 µL), seguido de incubación a 30 °C por 30 min. La absorbancia de la muestra se leyó en un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 20, a longitud de onda de 430 nm. La estimación del contenido de flavonoides se calculó a partir de una curva de calibración con un estándar de quercetina (R<sup>2</sup> = 0,99), usando la ecuación (2).

$$\text{Flavonoides totales} = [(A_M - A_B) - b]/m \quad (2)$$

Los resultados se expresaron en términos de miligramos equivalentes de quercetina por mililitro de muestra (mg EQ/mL).

### Actividad inhibitoria alfa-amilasa

El ensayo de inhibición enzimática se realizó siguiendo un protocolo descrito previamente, con algunas modificaciones<sup>21</sup>. La reacción se llevó a cabo en placas de microtitulación de polipropileno de 96 pozos Nunc<sup>®</sup>. Un volumen de 25 µL de la cada fracción fenólica se mezcló con 25 µL de la solución de la enzima alfa-amilasa pancreática (Sigma Aldrich Chemical), previamente disuelta en tampón

salino fosfato 0,1 M (pH 6,9) hasta una concentración de 0,5 mg/mL. La mezcla se incubó a 25 °C por 10 min, luego se adicionó 25 µL de una solución de almidón (0,5 % p/v) disuelto en tampón salino fosfato 0,1 M y se incubó a 25°C por 10 min. A la reacción se le adicionó 50 µL del cromógeno DNS (ácido dinitrosalicílico), a una concentración de 96 mM (Sigma Aldrich Chemical), seguido de incubación en agua hirviente por 5 min y enfriamiento a temperatura ambiente. La absorbancia de la muestra ( $A_M$ ) se leyó a la longitud de onda de 540 nm en el lector de placas Synergy™ HT de BioTek®. El porcentaje de inhibición (% I) se calculó mediante la ecuación (3).

$$\% I = (1 - A_M/A_C) \times 100 \quad (3)$$

El control representará el 100 % de la actividad de la enzima y corresponde a la mezcla de reacción sin la muestra ( $A_C$ ), la cual será reemplazada por el diluyente (25 µL de MeOH 70 % v/v). Como control positivo de la inhibición se usó el oligosacárido acarbosa (Glucobay®).

#### *Actividad inhibitoria lipasa pancreática*

La inhibición de la enzima se realizó mediante método espectrofotométrico descrito previamente, con pocas modificaciones<sup>22</sup>. La reacción se llevó a cabo en placas de microtitulación de polipropileno de 96 pozos Nunc®. Un volumen de 25 µL de la cada fracción fenólica se incubó con 150 µL del sustrato, compuesto por una mezcla de *p*-nitrofenilpalmitato (*p*-NPP) 0,2 mM, ácido deoxi-taurocolico 5 mM disuelto en tampón fosfato monobásico 50 mM (pH8,0). Después de la pre-incubación se adicionó 25 µL de la enzima lipasa pancreática (Sigma Aldrich Chemical) previamente disuelta en buffer de reacción a la concentración de 10 mg/mL. Después de incubación a 37 °C por 5 min, se midió la absorbancia de cada mezcla de reacción a la longitud de onda de 410 nm en un lector de placas Synergy™HT de BioTek®. Como control positivo del ensayo se usó tetrahidrolipistatina (Orlistat MK®). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la lipasa pancreática, empleando la ecuación (3).

#### *Análisis de las fracciones por HPLC-EM*

La identificación de los compuestos fenólicos se realizó en las fracciones separadas con Amberlita XAD-2 que presentaron mayor porcentaje de inhibición de la actividad alfa-amilasa y lipasa pancreática. El análisis HPLC-EM se realizó en un equipo Agilent 1100 G1956A VL-LC con detector selectivo de masas de cuadrupolo simple. Se usó una 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 análisis se realizó con base en el protocolo descrito por Simonovska y colaboradores en 2003<sup>23</sup>, con pocas modificaciones. Se usó una fase móvil, con la siguiente composición: fase A consistente de 10 % (v/v) de CH<sub>3</sub>CN en H<sub>2</sub>O y 0,05 % (v/v) de CH<sub>3</sub>-COOH; y fase B consistente de

90 % (v/v) de CH<sub>3</sub>CN en H<sub>2</sub>O y 0,0 5% (v/v) de CH<sub>3</sub>-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. El detector usado fue de arreglo de diodo, la temperatura de la columna al inicio y al final del análisis se mantuvo en 25°C y la presión entre 46,8 y 51,3 bar, respectivamente. El volumen de inyección de la muestra fue de 10 µL.

El análisis de masas se realizó mediante electrospray (ESI-API) usando una fuente de ionización de polaridad negativa. Las condiciones del equipo fueron: presión del nebulizador de 60 psi, flujo del gas de secado de 13 L/min, temperatura del gas de 350 °C, corriente del capilar de 8 nA al inicio y 31 nA al final. El escaneo de iones se programó para la detección específica de compuestos fenólicos reportados previamente en hojas de yacón<sup>16,23</sup>, los cuales corresponden a los iones moleculares desprotonados [M-H]<sup>-</sup> con m/z de 353 (ácido clorogénico), 301 (quercetina), 193 (ácido ferúlico), 191 (ácido quínico) y 179 (ácido cafeico).

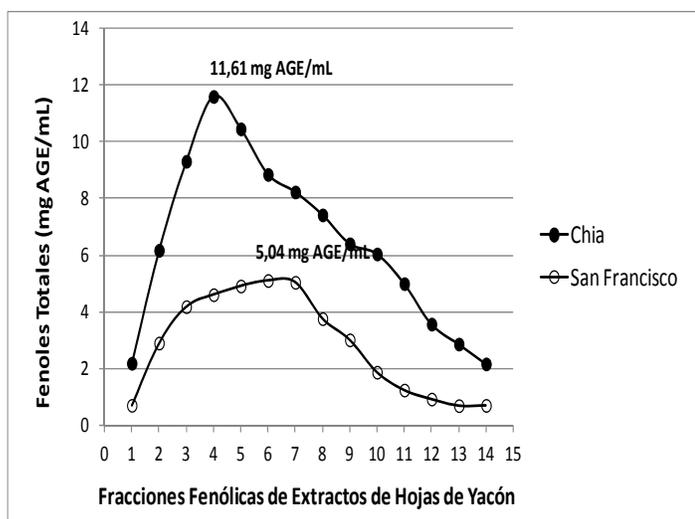
#### *Análisis de datos*

Los experimentos se realizaron por duplicado y fueron expresados como la media aritmética ± desviación estándar. Los datos se compararon por análisis de varianza (ANOVA de un factor), la diferencias estadísticas entre las medias se identificaron con el 95 % de nivel de confianza ( $p < 0,05$ ). También se realizaron análisis de regresión lineal para establecer la relación entre el contenido de fenoles y flavonoides totales con respecto a la actividad inhibitoria de cada enzima. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS Statistics 19 para Windows de IBM (SPSS Inc., and IBM Company, Chicago, H, IL, USA).

#### **Discusión de resultados**

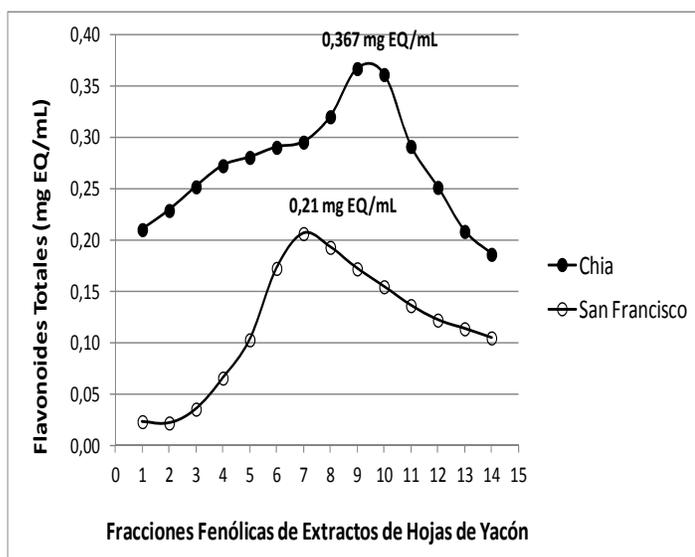
Los extractos de hojas de yacón se obtuvieron con un rendimiento de 5,85 % p/p para las muestras colectadas en el municipio de Chía y de 5,9 % p/p para las muestras colectadas en el municipio de San Francisco.

La separación con Amberlita XAD-2 produjo 14 fracciones de cada extracto. El ensayo de Folin-Ciocalteu mostró que las fracciones obtenidas a partir de la muestra colectada en el municipio de Chía presentaron un contenido mayor de fenoles totales (concentración máxima = 11,6 ± 0,4 mg AGE/mL); mientras que en las fracciones obtenidas a partir de la muestra de San Francisco, el contenido de fenoles totales fue menor (concentración máxima = 5,04 ± 0,13 mg AGE/mL, figura 1).



**Fig. 1:** Contenido de fenoles totales en las diferentes fracciones de extractos etanólicos de hojas de yacón, eluidas de la columna Amberlita XAD-2

El análisis de ANOVA mostró que existe diferencia significativa entre las fracciones de Chía y San Francisco ( $p = 0,0007$ ), sugiriendo que el contenido de compuestos fenólicos en las hojas de yacón depende del sitio de cultivo y que, a mayor altitud la planta producirá mayor cantidad de estos metabolitos. Esta observación está acorde a lo publicado por Petinatti y colaboradores en 2012, quienes describen la altitud como un factor abiótico importante en la expresión de genes implicados en la ruta biosintética de los ácidos fenólicos<sup>24</sup>. La influencia de la altitud en el contenido de compuestos fenólicos ha sido reportada previamente en especies de la familia Asteraceae como *Arnica montana* cv. ARBO<sup>25</sup> y *Matricaria chamomilla* cv. BONA<sup>26</sup>.



**Fig. 2:** Contenido de flavonoides totales en las diferentes fracciones de extractos etanólicos de hojas de yacón, eluidas de la columna Amberlita XAD-2.

Todas las fracciones eluidas de la Amberlita XAD-2 resultaron positivas para flavonoides totales; sin embargo, las fracciones de Chía presentaron un contenido mayor de equivalentes de quercetina (concentración máxima =  $0,367 \pm 0,013$  mg EQ/mL, figura 2).

El análisis de ANOVA mostró que existe diferencia estadísticamente significativa entre el contenido de flavonoides totales de las muestras colectadas en Chía y San Francisco ( $p = 1,45 \times 10^{-7}$ ). Este resultado respalda la hipótesis de que el sitio de cultivo y, en particular la exposición a factores de estrés ambiental como la altitud y la temperatura, influyen en la producción de compuestos fenólicos y flavonoides<sup>24</sup>. En el presente estudio, el municipio de Chía fue el sitio de muestreo con las condiciones ambientales más favorables para que las plantas de yacón produzcan los metabolitos de interés (altitud de 2600 msnm y temperatura promedio de 14 °C). Albert y colaboradores en 2009, describieron la temperatura como factor abiótico determinante en la biosíntesis de flavonoides en plantas de la familia asteraceae, como *Arnica montana* L. cv. ARBO, reportándose un incremento pronunciado del radio quercetina/kaempferol, como resultado de la disminución de la temperatura en 5 °C<sup>27</sup>.

El ensayo de inhibición alfa-amilasa fue positivo para todas las fracciones eluidas de la Amberlita XAD-2, obteniéndose porcentajes de inhibición mayores al 40 % (figura 3). Aunque las fracciones de Chía presentaron porcentajes de inhibición enzimática relativamente superior (media =  $62 \pm 12$  %), a los observados en las fracciones de San Francisco (media =  $59 \pm 8$  %), el análisis de ANOVA mostró que no existe diferencia significativa entre ellas ( $p = 0,358$ ). El control positivo acarbosa, causó inhibición del 50 % de la actividad alfa-amilasa pancreática a una concentración de  $1,9 \pm 0,5$   $\mu$ g/mL ( $CI_{50}$ ).

El análisis de regresión, entre la actividad inhibitoria alfa-amilasa pancreática y el contenido de fenoles totales, mostró que existe asociación positiva entre estas variables, tanto en las fracciones de Chía ( $p = 1,36 \times 10^{-6}$ ) como en las de San Francisco ( $p = 6,13 \times 10^{-5}$ ). Por el contrario, no se observó asociación entre la actividad inhibitoria alfa-amilasa y el contenido de flavonoides totales (valor  $p = 0,158$  para Chía; valor  $p = 0,192$  para San Francisco). Por lo anterior, la inhibición alfa-amilasa podría atribuirse a los ácidos fenólicos simples y polifenoles presentes en las hojas de yacón.

Los resultados del ensayo de inhibición *in vitro* de la lipasa pancreática se presentan en la figura 4. En este ensayo la fracción 4 y la fracción 9 de las muestras de Chía y San Francisco, respectivamente, fueron las que causaron la mayor inhibición; este resultado podría atribuirse al fenómeno de desorción diferencial de los metabolitos desde la resina Amberlita XAD-2, ocasionado por la diferencia en la polaridad de los flavonoides presentes en cada muestra<sup>28</sup>.

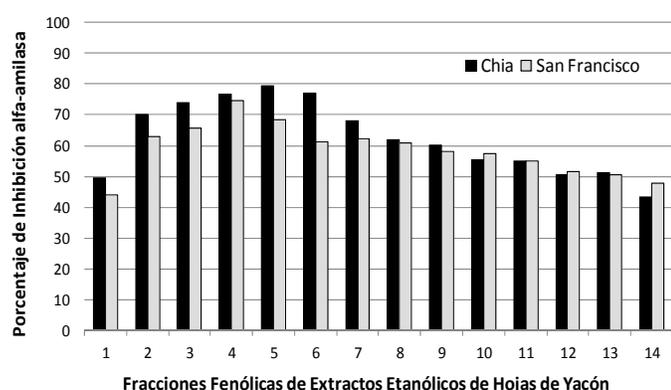
**Tabla 1:** Composición química y abundancia relativa de compuestos fenólicos en extractos etanólicos de hojas de yacón, determinadas mediante HPLC-EM (ESI de polaridad negativa).

Compuesto <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min)	PM (g/mol)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	% Área total	
				Chía	San Francisco
Ácido caféico	11,72 <sup>b</sup> -11,73 <sup>c</sup>	180	179	0,498	0,742
Ácido quínico	12,08 <sup>c</sup>	192	191	NP	0,047
Ácido clorogénico	22,34 <sup>b</sup> - 22,20 <sup>c</sup>	354	353	13,34	5,450
Derivado de la quercetina	22,95 <sup>b</sup> -22,94 <sup>c</sup>	302	301	38,02	4,38
Ácido ferúlico	26,85 <sup>b</sup> -26,84 <sup>c</sup>	194	193	0,976	0,066
Derivado de la quercetina	33,31 <sup>b</sup> -33,29 <sup>c</sup>	302	301	33,78	77,3

a. Identificados tentativamente de acuerdo con su ion pseudomolecular,

b. Tiempo de retención en la muestra de Chía,

c. Tiempo de retención en la muestra de San Francisco, NP. No presente.

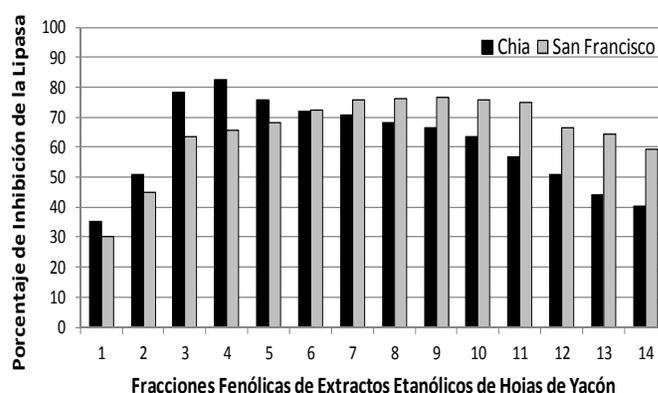


**Fig. 3:** Porcentajes de Inhibición *in vitro* de la actividad alfa-amilasa pancreática por las diferentes fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de yacón. La fracción 4 de la muestra de San Francisco (% I = 75 ± 3 %) y la fracción 5 de la muestra de Chía (%I = 80 ± 5 %) causaron los mayores porcentajes de inhibición enzimática.

El análisis ANOVA mostró que no existe diferencia significativa entre los porcentaje de inhibición *in vitro* de la lipasa pancreática, entre las fracciones de Chía (media = 61 ± 15 %) y San Francisco (media = 65 ± 13 %) ( $p = 0,46$ ). El control positivo orlistat, causó inhibición del 50 % de la actividad lipasa pancreática a la concentración de 0,81 ± 0,03 µg/mL (CI<sub>50</sub>).

El análisis de regresión mostró que existe correlación entre la actividad inhibitoria lipasa pancreática y el contenido de flavonoides totales, tanto en las fracciones de Chía ( $p = 0,013$ ) como en las de San Francisco ( $p = 6,07 \times 10^{-4}$ ). También se observó correlación entre la actividad anti-lipasa pancreática y el contenido de fenoles totales en las fracciones de Chía ( $p = 1,12 \times 10^{-7}$ ), pero no con las fracciones de San Francisco ( $p = 0,175$ ). Estos resultados indican que los flavonoides podrían ser los responsables de la inhibición de esta enzima.

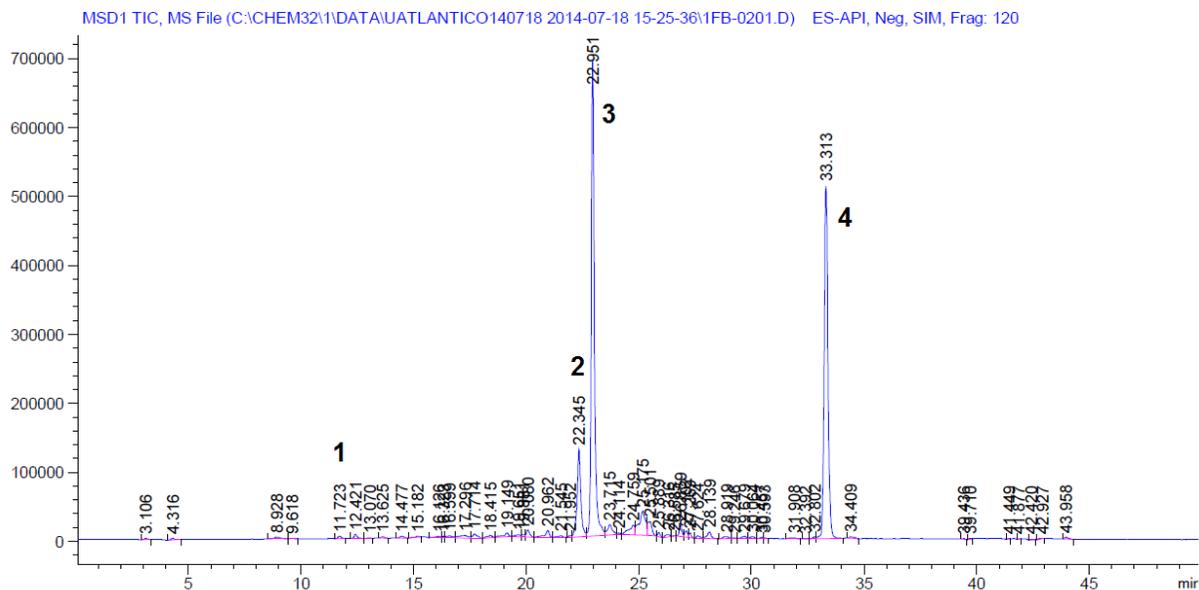
El análisis HPLC-EM se realizó en la fracción 4 de la muestra de Chía, debido a que ésta presentó altos porcenta-



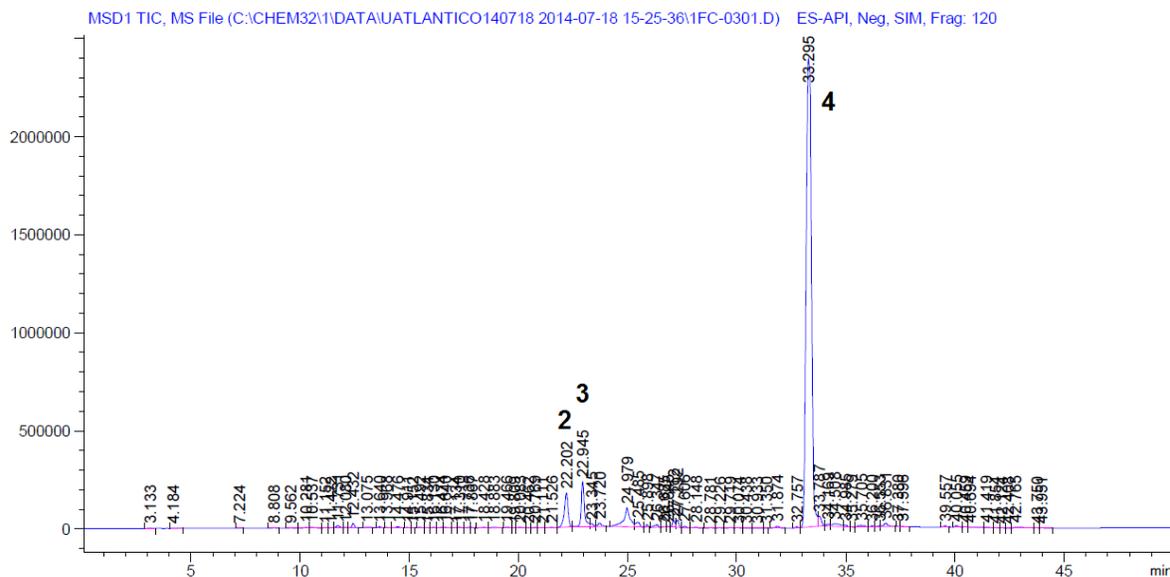
**Fig. 4:** Porcentajes de Inhibición *In vitro* de la actividad lipasa pancreática por las diferentes fracciones fenólicas de extractos etanólicos de hojas de yacón. La fracción 4 de la muestra de Chía (% I = 82,4 ± 0,4 %) y la fracción 9 de la muestra de San Francisco (% I = 77 ± 2 %) causaron los porcentajes más altos de inhibición enzimática.

jes de inhibición para las dos enzimas; también se analizó la fracción 9 de la muestra de San Francisco, debido a que ésta presentó el porcentaje más alto de inhibición lipasa pancreática (figuras 3 y 4). Los resultados sugieren la presencia de los seis compuestos de interés, como se relaciona en la tabla 1.

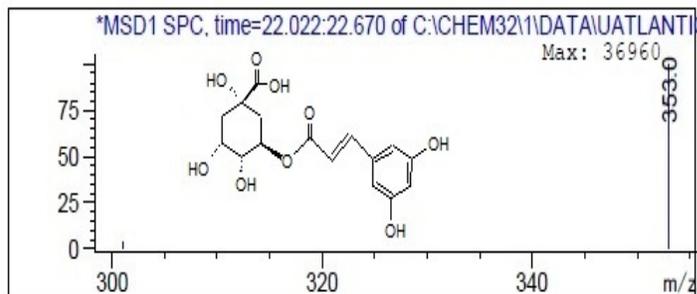
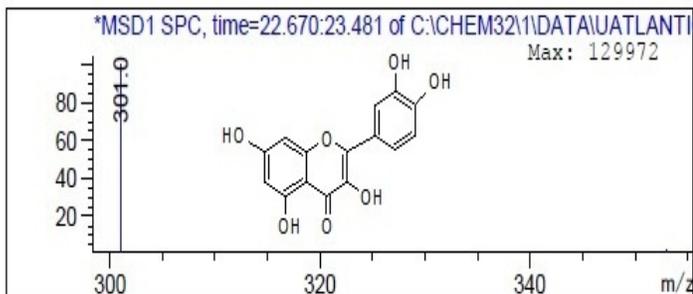
El ion pseudomolecular con m/z de 301 fue el mayoritario en ambas muestras, este fue identificado tentativamente como quercetina (PM = 302 Dalton); el ion pseudomolecular con m/z de 353, fue el segundo en abundancia y se identificó tentativamente como ácido clorogénico (PM = 354 Dalton). Otras señales minoritarias corresponden a iones pseudo-moleculares con m/z 193, 191 y 179, los cuales fueron identificados tentativamente como ácido ferúlico (PM = 194 Dalton), ácido quínico (PM=192 Dalton) y ácido cafeico (PM = 180 Dalton), respectivamente. Las figuras 5 y 6 corresponden a los cromatogramas HPLC de cada muestra y la figura 7 muestra los espectros de masas de los iones mayoritarios.



**Fig. 5:** Cromatograma HPLC de la fracción fenólica de extractos etanólicos de hojas de yacón, cultivadas en Chía, departamento de Cundinamarca, Colombia. Los compuestos fueron identificados tentativamente como ácido cafeico (1), ácido clorogénico (2) y dos derivados del flavonoide quercetina con tiempos de retención diferente (3 y 4).



**Fig. 6:** Cromatograma HPLC de la fracción fenólica de extractos etanólicos de hojas de yacón, cultivadas en San Francisco, departamento de Antioquia, Colombia. Los compuestos fueron identificados tentativamente como ácido clorogénico (2) y dos derivados del flavonoide quercetina con tiempos de retención diferente (3 y 4).



**Fig. 7:** Espectros de masas (ESI de polaridad negativa), de los iones pseudomoleculares con 301 y 353 unidades de masa atómica (uma), identificados tentativamente como quercetina y ácido clorogénico, respectivamente.

El ion pseudomolecular de 301 uma, presentó dos tiempos de retención diferentes (22,9 min y 33,3 min) en las fracciones analizadas, esto hace suponer que se trata de dos derivados de la quercetina; este flavonoide fue descrito previamente en hojas de yacón, mediante HPLC-EM, reportándose un ion pseudomolecular a 301 uma en modo ESI negativo<sup>23,29</sup>. Adicionalmente, la existencia de la quercetina en forma de derivados glucosilados se ha descrito en diferentes especies vegetales, mostrando señales en el cromatograma a tiempos de retención diferentes, dependiendo del sitio de glucosilación<sup>30</sup>.

Los ácidos fenólicos clorogénico, cafeico, ferúlico y quínico también se han descrito en hojas de yacón procedentes de Ecuador y cultivados en República Checa<sup>23</sup>. El ácido clorogénico fue uno de los compuestos mayoritarios en la presente investigación, este es un éster del ácido cafeico y el ácido quínico con potente actividad antioxidante<sup>14</sup>. Una publicación reciente describe el efecto inhibitorio *in vitro* del ácido clorogénico sobre la enzima alfa-amilasa, reportándose una  $IC_{50} = 9,10 \mu\text{g/mL}$ <sup>31</sup>; este mismo estudio sugiere que el efecto inhibitorio del ácido cafeico es significativamente mayor ( $CI_{50} = 3,68 \mu\text{g/mL}$ ) al del ácido clorogénico. En nuestro estudio, la abundancia del ácido cafeico en ambas fracciones analizadas fue menor al 0,8 %; por tanto, la mayor actividad alfa-amilasa de la muestra de Chía podría atribuirse a abundancia relativa más alta del ácido clorogénico (13,34 %).

Compuestos flavonoides, como la quercetina, han sido reportados previamente por ser inhibidores de enzimas digestivas alfa-amilasa y alfa-glucosidasa<sup>32,33</sup>; sin embargo, esta actividad puede ser afectada por la presencia de grupos sustituyentes en el núcleo flavonoide. Li y colaboradores en 2009, reportaron aumento en la actividad de inhibición  $\alpha$ -glucosidasa de flavonas que presentan un grupo hidróxilo libre en el C-3 del anillo B, mientras que C-glucosilaciones en las posiciones C-6 o C-8 del anillo A debilitan la actividad inhibitoria<sup>34</sup>. Estos antecedentes podrían explicar porque, a pesar de que los derivados de la quercetina fueron los compuestos mayoritarios en las muestras analizadas, no se observó correlación entre la actividad inhibitoria alfa-amilasa y el contenido de flavonoides totales. Por consiguiente, la caracterización estructural de los compuestos identificados tentativamente como derivados de la quercetina, en las fracciones analizadas, permitiría confirmar esta hipótesis.

Por otra parte, la actividad inhibitoria *in vitro* de la enzima lipasa pancreática también podría relacionarse con la presencia de derivados del flavonoide quercetina. Una publicación reciente describe la actividad inhibitoria lipasa de flavonoides como quercetina-3-O- $\beta$ -D-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopiranosido y quercetina-3-O- $\beta$ -D-glucuronido<sup>35</sup>; otro estudio realizado con compuestos aislados desde *Eremochloa phiuroides* (Munro) Hack,

concluyeron que los ácido clorogénico y cafeico tienen poca participación en la actividad inhibitoria de la lipasa, sugiriendo que flavonoides glucosilados en el anillo A podrían ser los responsables de la actividad anti-lipasa pancreática<sup>36</sup>.

## Conclusiones

El presente estudio plantea que las hojas de yacón cultivadas en los municipios de Chía y San Francisco (Colombia), presentan ácidos fenólicos y flavonoides que podrían inhibir la actividad catalítica de enzimas digestiva como la alfa-amilasa y lipasa pancreática, respectivamente. A pesar de que la identificación de los compuestos fenólicos se realizó tentativamente, estos resultados y los presentados por otros investigadores, sugieren que metabolitos como la quercetina y ácido clorogénico podrían usarse como indicadores de la calidad de los extractos de hojas de yacón que se usarían para propósitos dietarios y/o como nutraceuticos.

## Referencias

1. R Eckel, D York, S Rössner, V Hubbard, I Caterson, S St Jeor, L Hayman, R Mullis, S Blair. American Heart Association: Prevention conference VII obesity, a Worldwide epidemic related to heart disease and stroke: executive summary. **Circulation**, **110**, 2968-2975 (2004).
2. A Field, E Coakley, A Must, J Spadano, N Laird, W Dietz, E Rimm, G Colditz. Impact of overweight on the risk of developing common chronic diseases during a 10-year period. **Arch. Intern. Med.**, **161**, 1581-1586 (2001).
3. Expert panel on the identification, evaluation, and treatment of overweight in adults: Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: executive summary. **Am. J. Clin. Nutr.**, **68**, 899-917 (1998).
4. E Poggiogalle, S Migliaccio, A Lenzi, L Donini. Treatment of body composition changes in obese and overweight older adults: insight into the phenotype of sarcopenic obesity. **Endocrine.**, **47**, 699-716 (2014).
5. A Howard. The historical development, efficacy and safety of very low calorie diets. **Int. J. Obes.**, **5(3)**, 195-208 (1981).
6. M Abdollahi, B Afshar-Imani. A review on obesity and weight loss measures. **Middle. East. Pharmacy**, **11**, 6-10 (2003).
7. R Akilen, Z Pimlott, A Tsiami, N Robinson. The use of complementary and alternative medicine by individuals with features of metabolic syndrome. **J. Integr. Med.**, **12(3)**, 171-174 (2014).
8. S Hasani-Ranjbar, Z Jouyandeh, M Abdollahi. A systematic review of anti-obesity medicinal plants - an update. **J. Diabetes. Metab. Disord.**, **12(1)**, 28 (2013).
9. H de Almeida Paula, M Abranches, C de Luces Fortes Ferreira. Yacón (*Smallanthus sonchifolius*): a food with multiple functions. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, **55(1)**, 32-40 (2015).

10. G Delgado, W Tamashiro, M Maróstica Junior, G Pastore. Yacón (*Smallanthus sonchifolius*): a functional food. **Plant. Foods. Hum. Nutr.**, **68**(3), 222-228 (2013).
11. G Gonzales, C Gonzales-Castañeda, M Gasco. A mixture of extracts from Peruvian plants (black maca and yacón) improves sperm count and reduced glycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes. **Toxicol. Mech. Methods.**, **23**(7), 509-518 (2013).
12. S Genta, W Cabrera, M Mercado, A Grau, C Catalán, S Sánchez. Hypoglycemic activity of leaf organic extracts from *Smallanthus sonchifolius*: Constituents of the most active fractions. **Chem. Biol. Interact.**, **185**(2), 143-152 (2010).
13. M Roselino, N Pauly-Silveira, D Cavallini, L Celiberto, R Pinto, R Vendramini, E Rossi. A potential symbiotic product improves the lipid profile of diabetic rats. **Lipids. Health. Dis.**, **11**, 114 (2012).
14. K Valentová, F Sersen, J Ulrichová. Radical scavenging and anti-lipoperoxidative activities of *Smallanthus sonchifolius* leaf extracts. **J. Agric. Food. Chem.**, **53**(14), 5577-5582 (2005).
15. S Terada, K Ito, A Yoshimura, N Noguchi, T Ishida. Constituents relating to anti-oxidative and alpha-glucosidase inhibitory activities in Yacón aerial part extract. **Yakugaku Zasshi**, **126**(8), 665-669 (2006).
16. Z Xiang, F He, T Kang, D Dou, K Gai, Y Shi, Y Kim, F Dong. Anti-diabetes constituents in leaves of *Smallanthus sonchifolius*. **Nat. Prod. Commun.**, **5**(1), 95-98 (2010).
17. M Polanco, M García. Caracterización morfológica y molecular de materiales de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poep. and Endl) H. Robinson colectados en la eco región eje cafetero de Colombia. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental (RIAA)**, **4** (2), 97-116 (2013).
18. K Osler, R Goodwin. A general use of Amberlite XAD-2 resin for the purification of flavonoids from aqueous fractions. **J. Nat. Prod.**, **47**(1), 188 (1983).
19. M Ozgen, F Wyzgoski, A Tulio. Antioxidant capacity and phenolic antioxidants of Midwestern black raspberries grown for direct markets are influenced by production site. **Horticulture Science**, **43**(7), 2039-2047 (2008).
20. S Adisakwattana, B Chanathong. Alpha-glucosidase inhibitory activity and lipid-lowering mechanisms of *Moringaoleifera* leaf extract. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, **15**(7), 803-808 (2011).
21. S Adisakwattana, T Ruengsamran, P Kampa, W Sompong. *In vitro* inhibitory effects of plant-based foods and their combinations on intestinal  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic  $\alpha$ -amylase. **BMC Complement. Altern. Med.**, **12**, 110 (2012).
22. D Lewis, D Liu. Direct measurement of lipase inhibition by orlistat using dissolution linked in vitro assay. **Clinic. Pharmacol. Biopharm.**, **1**, 103 (2012).
23. B Simonovska, I Vovk, S Andresek, K Valentová, J Ulrichová. Investigation of phenolic acids in yacón (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. **J. Chromatogr. A.**, **1016**(1), 89-98 (2003).
24. D Petinatti-Pavarini, S Petinatti-Pavarini, M Niehuesa, N Peporine-Lopes. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, **176** (1-4), 5-16 (2012).
25. R Spitaler, A Winkler, I Lins, S Yanar, H Stuppner, C Zidorn. Altitudinal variation of phenolic contents in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO: a 3-year comparison. **J. Chem. Ecol.**, **34**(3), 369-375 (2008).
26. M Ganzera, M Guggenberger, H Stuppner, C Zidorn. Altitudinal variation of secondary metabolite profiles in flowering heads of *Matricaria chamomilla* cv. BONA. **Planta. Med.**, **74**(4), 453-457 (2008).
27. A Albert, V Sareedenchai, W Heller, H Seidlitz, C Zidorn. Temperature is the key to altitudinal variation of phenolics in *Arnica montana* L. cv. ARBO. **Oecologia**, **160**(1), 1-8 (2009).
28. F Tomás-Barberán, A Blázquez, C García-Viguera, F Ferreres, F Tomás-Lorente. A comparative study of different Amberlite XAD resins in flavonoid analysis. **Phytochem. Anal.**, **3**, 178-181 (1992).
29. W Xie, J Li, H Li. Study on chemical constituents of *Smallanthus sonchifolius*. **Zhong. Yao. Cai.**, **31**(10), 1510-1512 (2008).
30. L Barrosa, T Alves, M Dueñas, S Silvac, R Oliveira, A Carvalho, M Henriques, C Santos-Buelga, I Ferreira. Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC-DAD-ESI/MS and evaluation of antifungal properties. **Ind. Crops. Prod.**, **44**, 104-110 (2013).
31. G Oboh, O Agunloye, S Adefegha, AAkinyemi, A Ademiluyi. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (*in vitro*): a comparative study. **J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol.**, May 12 (2014).
32. K Tadera, Y Minami, K Takamatsu, T Matsuoka. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase by flavonoids. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, **52**(2), 149-153 (2006).
33. J Watanabe, J Kawabata, H Kurihara, R Niki. Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **61**(1), 177-178 (1997).
34. H Li, F Song, J Xing, R Tsao, Z Liu, S Liu. Screening and structural characterization of alpha-glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MS(n) and SORI-CID FTICR MS. **J. Am. Soc. Mass. Spectrom.**, **20**(8), 1496-1503 (2009).
35. Y Tao, Y Zhang, Y Wang, Y Cheng. Hollow fiber based affinity selection combined with high performance liquid chromatography-mass spectroscopy for rapid screening lipase inhibitors from lotus leaf. **Anal. Chim. Acta.**, **785**, 75-81 (2013).
36. E Lee, S Lee, B Chung, J Cho, I Lee, S Ahn, S Jang, T Kim. Pancreatic lipase inhibition by C-glycosidic flavones Isolated from *Eremochloa ophiuroides*. **Molecules**, **15**(11), 8251-8259 (2010).