

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Propiedades antioxidante y antiglicosilante de extractos de *Diplotaxis tenuifolia* Antioxidant and antiglycation properties of extracts of *Diplotaxis tenuifolia*

Parada Romina B.¹, Vallejo Marisol¹, Marguet Emilio R.¹

DOI. 10.21931/RB/2019.04.02.6

852

Resumen: El objetivo de este trabajo fue investigar el contenido de fenoles y la actividad biológica en hojas de *Diplotaxis tenuifolia* recolectadas en la Patagonia (Argentina). La actividad de antiglicosilación se evaluó mediante los modelos de albúmina sérica bovina-glucosa (BSA-glu) y la reacción de Maillard. Solo en el extracto acuoso de materia seca, la reacción de Maillard se logró inhibir un 40 %. Los resultados restantes no permitieron realizar conclusiones. El extracto acuoso presentó mayor contenido de polifenoles que el metanólico (1074,25 y 647,5 mg equivalente de ácido gálico/100 g de materia seca, respectivamente). Por otro lado, el contenido de flavonoides fue comparable entre los extractos acuoso y metanólico (218,2 y 213,4 mg equivalente de quercetina/100 g de materia seca, respectivamente). En cuanto a las propiedades antioxidantes, CUPRAC (capacidad de antioxidante sobre el cobre) presentó valores de 655,6 mg equivalentes de Trolox /100 g de materia seca y 749,6 mg equivalentes de ácido ascórbico/100 g de materia seca para el extracto acuoso y 1045,2 mg equivalente de Trolox/100 g de materia seca y 1203,9 mg equivalente de ácido ascórbico/100 g de materia seca para el metanólico. El ensayo de reducción DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) exhibió valores de 203,3 mg equivalentes de Trolox/100 g de materia seca y 180,0 mg equivalentes de ácido ascórbico/100 g de materia seca para el extracto acuoso, y 97,7 mg equivalentes de Trolox/100 g de materia seca y 89,3 mg equivalentes a ácido ascórbico/100 g de materia seca para el metanólico. Los resultados obtenidos demuestran el potencial antioxidante de *D. tenuifolia* recolectada en las regiones extremas de la Patagonia. Esta planta comestible es una fuente rica de antioxidantes que debe considerarse como alimento funcional, su consumo es recomendable para prevenir el daño celular al eliminar los radicales libres nocivos. Palabras Clave: rúcula salvaje, polifenol, antioxidante.

Abstract: The goal of this study was to investigate phenolic contents and biological activities in leaves of *Diplotaxis tenuifolia* collected in Patagonia (Argentina). Anti-glycation activities were tested by bovine serum albumin-glucose (BSA-glu) and Maillard reaction models. Only in the case of water extract of dry matter, Maillard reaction could be 40 % inhibited. The remaining results do not allow make definitive conclusions. Water extracts exhibited higher polyphenol content than methanolic ones (1074.25 and 647.5 mg Gallic acid equivalent/100 g of dry matter, respectively). On the other hand, flavonoid content was comparable between the water and methanolic extracts (218.2 and 213.4 mg quercetin equivalent/100 g of dry matter, respectively). Regarding antioxidant properties, CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity) showed values of 655.6 mg Trolox equivalent/100 g of dry matter and 749.6 mg ascorbic acid equivalent/100 g of dry matter for water extracts and 1045.2 mg Trolox equivalent/100 g of dry matter and 1203.9 mg ascorbic acid equivalent/100 g of dry matter for methanolic ones. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay displayed values of 203.3 mg Trolox equivalent/100 g of dry matter and 180.0 mg ascorbic acid equivalent/100 g of dry matter for water extracts, and 97.7 mg Trolox equivalent/100 g of dry matter and 89.3 mg ascorbic acid equivalent/100 g of dry matter for methanolic ones. The results obtained highlight the antioxidative potential of *D. tenuifolia* collected in extreme regions like Patagonia. This edible plant is an antioxidant-rich source that should be considered as functional food, its consumption is recommendable to prevent cell damage by scavenging deleterious free radicals.

Keywords: wild rocket, polyphenol, antioxidant

Introducción

La familia Brassicaceae (Cruciferae) presenta 350 géneros y alrededor de 3.500 especies. Incluye algunas especies de relevancia en la economía mundial, tanto hortícolas, como ornamentales, oleaginosos, forrajeros y una gran variedad de condimentos¹. *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. es una de las especies pertenecientes a la familia Brassicaceae, conocida vulgarmente como “rúcula salvaje”¹ o “flor amarilla”². Esta planta perenne, originaria de Europa y Asia occidental, se introdujo en el año 1920 en Argentina como planta melífera pero se ha difundido convirtiéndose en una de las especies invasoras más abundantes³.

Las brasicáceas son importantes fuentes de compuestos bioactivos con propiedades farmacológicas debido a la presencia de glucosilatonatos, flavonoides, folatos, fibras y carotenoides⁴. La flor amarilla se caracteriza por presentar elevados niveles de hierro, calcio y potasio; contiene algunas vitaminas, particularmente vitamina A y ácido ascórbico. Con excepción de las raíces, todos los tejidos de *D. tenuifolia* contienen flavonoides y polifenoles que, en forma conjunta con el ácido ascórbico, le confieren propiedades antioxidantes por lo que su inclusión en la dieta resulta recomendable⁵.

¹Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco – Argentina. Email parada.ro91@gmail.com

Los antioxidantes son compuestos capaces de retrasar o inhibir los procesos de oxidación que se producen bajo la influencia del oxígeno o especies reactivas de oxígeno. Recientemente, los antioxidantes han atraído considerable atención en relación con los radicales y el estrés oxidativo como preventivos de enfermedades degenerativas, cáncer y envejecimiento celular ⁶.

En nuestro país se han realizado numerosos estudios sobre *D. tenuifolia* como especie invasora, pero existen escasas investigaciones vinculadas con sus propiedades nutricionales y/o farmacológicas. Este trabajo tiene como objetivo determinar el contenido de polifenoles, flavonoides, la actividad antioxidante y antiglicosilante presentes en extractos acuosos y metanólicos de hojas de *D. tenuifolia*.

Materiales y Métodos

Recolección del material de estudio

Se recolectaron plantas de *D. tenuifolia* silvestre en enero de 2017 del Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh), Argentina. Las hojas de *D. tenuifolia* se sometieron a desecación en estufa a 37 °C durante 2 días. El material se conservó en un lugar fresco y seco hasta su posterior estudio.

Preparación de extractos, acuoso y metanólico

El extracto acuoso se obtuvo a partir de 1 g del material seco suspendido en 10 ml de agua destilada y luego tratado en autoclave a 120 °C durante 15 min. El extracto metanólico se obtuvo de 1 g de material seco suspendido en 10 ml de metanol y en agitación durante 3 h a 37 °C. En ambos casos los extractos se centrifugaron a 3.000 rpm y los sobrenadantes obtenidos se conservaron a -20 °C hasta el momento de su procesamiento.

Propiedades antiglicosilación de los extractos

Reacción de Maillard (Lys-Glu)

Los efectos de los extractos en la reacción de Lys-Glu Maillard se determinaron mediante protocolos descritos anteriormente ⁷. Se realizó una mezcla de glucosa y lisina (1 mol/l, 0,5 ml) con 0,5 ml de los extractos y 0,5 ml de buffer fosfato de sodio (0,25 ml/l) en tubos de ensayo con tapa a rosca y se sometieron a 50 °C en baño termostático durante 3 h. Se midió la absorbancia a 465 nm y el porcentaje de inhibición de la reacción de Maillard se calculó según la fórmula ⁸

Inhibición de la reacción de Maillard (%) =

$$\left(1 - \frac{(\text{Abs 3 h de la muestra} - \text{Abs 0 h de la muestra})}{(\text{Abs 3 h del blanco} - \text{Abs 0 h del blanco})}\right) \times 100$$

Modelo de glicosilación BSA-Glu

El ensayo de antiglicosilación se realizó según el modelo albúmina sérica bovina-glucosa (BSA-Glu) ⁹. La glucosa (1,5 ml/l, 0,5 ml) se agregó a 0,5 ml del buffer de fosfato de sodio (50 mmol, pH 7,4) y 0,5 ml de los extractos, se incubó por 2 h a 37 °C. Luego del agregado de albúmina de suero bovino (30 mg ml⁻¹, 0,5 ml) se incubó a 37 °C durante 5 días. Se centrifugaron las mezclas y se tomó 100 µl del sobrenadante de cada reacción y se adicionó 1 ml de NBT (cloruro de nitroblue tetrazolium), se dejó incubar durante 10 min y se midió la absorbancia a 500 nm. El porcentaje de la capacidad de antiglicosilación se obtuvo mediante la siguiente fórmula ⁸

Capacidad de antiglicosilación (%) =

Capacidad antioxidante de los extractos

Capacidad antioxidante según el método de reducción DPPH

La capacidad antioxidante se evaluó según el método de reducción de DPPH ¹⁰. Se realizaron curvas estándares con Trolox y ácido ascórbico como agentes reductores (10-200 µg/ml) y los re-

$$\left(1 - \frac{(\text{Abs 5 días de la muestra} - \text{Abs 0 días de la muestra})}{(\text{Abs 5 días del blanco} - \text{Abs 0 días del blanco})}\right) \times$$

sultados fueron expresados como mg equivalentes (Eq) de Trolox o ácido ascórbico por 100 g de materia seca.

Capacidad antioxidante sobre el cobre (CUPRAC)

La capacidad reductora de los extractos se determinó mediante el poder antioxidante reductor del cobre siguiendo la metodología previamente descrita ¹¹. Se utilizó como estándares Trolox y ácido ascórbico como agentes reductores (10-200 µg/ml) y los resultados fueron expresados como mg Eq de Trolox o ácido ascórbico por 100 g de materia seca.

Contenido fenólico total

El contenido fenólico total de los extractos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu siguiendo las recomendaciones detalladas previamente ¹². Se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar, los resultados se expresaron como mg Eq de ácido gálico por 100 g de materia seca.

Contenido total de flavonoides

El contenido total de flavonoides en los extractos se determinó según la técnica descrita previamente ¹³. Se realizó una curva de calibración utilizando quercetina como estándar y el resultado de la concentración de flavonoides se expresó como mg Eq de quercetina por 100 g de materia seca.

Resultados y Discusión

En este trabajo se utilizaron dos técnicas para determinar la capacidad antiglicosilante de los extractos de *D. tenuifolia*: la reacción de Maillard y el modelo de glicosilación glucosa-albúmina sérica humana. En la primera se determina la capacidad de los extractos de inhibir la reacción no enzimática entre los grupos amino de un aminoácido con un azúcar reductor. En el modelo restante se determina la capacidad de interferir la reacción de Maillard entre los grupos amino libre de las 59 lisinas que posee la albúmina y la glucosa a través de su grupo carbonilo libre. Los resultados nos permiten decir que solo en el caso de los extractos acuosos se logró inhibir parcialmente la reacción de Maillard (≥40 %). En el modelo de glicosilación glucosa-albúmina los datos no permiten llegar a conclusiones definitivas poniendo en duda la utilidad de la técnica con estos tipos de extractos. Este método está basado en la formación de las bases de Schiff y se utiliza principalmente para controlar el nivel de proteínas glicosiladas en sangre en los diabéticos ¹⁴ sin embargo, la técnica muestra interferencia cuando se trabaja con extractos de absorbancia elevada como los obtenidos con *D. tenuifolia*. En la actualidad se utilizan métodos basados en fluorescencias de los productos de glicosilación avanzada (AGEs) ⁸, siendo un modelo más eficiente que evita este tipo de interferencia.

El extracto acuoso de *D. tenuifolia* presentó un 60 % más de concentración de fenoles con respecto al extracto metanólico, mien-

tras que las concentraciones de flavonoides resultaron semejantes para ambos métodos de extracción (Tabla 1). Estudios previos han determinado que la cuantificación de fenoles varía según la especie de *Diplotaxis*, los órganos vegetales, como también depende de los factores ambientales y de crecimiento¹³. Los resultados de este trabajo concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores, donde se implementó la metodología basada en la reducción de molibdeno del reactivo Folin-Ciocalteu. En ensayos realizados con extractos metanólicos de *D. harra*, se registraron una concentración de fenoles y flavonoides de 547 mg Eq de ácido gálico/100 g de materia seca y 383 mg Eq de quercetina/100 g materia seca, respectivamente¹⁵. Mientras que en estudios con extractos acuosos de *D. harra*, se determinaron concentraciones de 1017 mg de ácido cafeico/100g materia seca y 383,7 mg de Rutin/100 g de materia seca, para fenoles y flavonoides, respectivamente¹³. Los resultados obtenidos permiten afirmar que resultan comparables

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo indicarían el potencial de *D. tenuifolia* como alimento o como suplemento dietario debido a sus propiedades fitoquímicas. Su contenido en polifenoles, flavonoides y actividad antioxidante se vincularía con la capacidad de disminuir o eliminar efectos del estrés oxidativo y en consecuencia favorecer la salud de los consumidores. Investigaciones posteriores deberán estar dirigidas a determinar las variaciones de los parámetros estudiados en función de diferentes especies, regiones geográficas, variación estacional y también la aceptación del consumidor sobre la base de su palatabilidad.

Extractos	Fenoles ^a	Flavonoides ^b	DPPH ^{c, d}		CUPRAC ^{c, d}	
<i>(D. tenuifolia)</i>						
Acuoso	1074,25 ± 55	218,2 ± 22,4	203,3 ± 41,2	180,0 ± 18,1	655,6 ± 42,2	749,6 ± 29,9
Metanólico	647,5 ± 43	213,4 ± 36,5	97,0 ± 22,1	89,3 ± 5,7	1045,2 ± 80,4	1203,9 ± 217,0

Tabla 1: Actividades biológicas de los extractos de *Diplotaxis tenuifolia*: fenoles, flavonoides, DPPH, CUPRAC (media ± desvío estándar).

^a Resultados expresados como mg equivalente de ácido gálico/100 g de materia seca; ^b resultados expresados como mg equivalentes de quercetina/100 g de materia seca; ^c resultados expresados como mg equivalentes de Trolox/100 g de materia seca; ^d resultados expresados como mg equivalentes de ácido ascórbico/100 g de materia seca.

las concentraciones de polifenoles y flavonoides entre las especies *D. tenuifolia* y *D. harra*. Si bien se muestran pequeñas variaciones en la cuantificación de fenoles, estas pueden estar asociadas a diferentes factores como la especie evaluada, el lugar de cosecha del material vegetal, las condiciones climáticas y las etapas de desarrollo de la planta¹³.

Debido a la falta de un método estandarizado que determine con precisión la capacidad antioxidante de extractos vegetales, resulta recomendable usar más de un ensayo analítico. En este trabajo se utilizaron los métodos DPPH y CUPRAC basados en la transferencia simple de electrones¹⁶. La capacidad antioxidante de los extractos acuoso y metanólico exhibieron valores más altos por el método CUPRAC que los determinados por el método de reducción de DPPH. La técnica de CUPRAC permite determinar antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos en simultáneo, mientras que el análisis DPPH interfiere en la detección de antioxidantes hidrofílicos, debido al solvente utilizado, alcanzando valores menores. Los resultados obtenidos en general concuerdan con trabajos previos donde evalúan diferentes especies de la familia Brassicaceae^{6,17}. Resultaría conveniente estandarizar los métodos de extracción y los métodos de detección con el propósito de establecer comparaciones entre géneros/especies y las influencias ejercidas por factores externos, como clima, región geográfica, estadio del cultivo etc. cultivo etc.

Referencias

1. Pratap A, Gupta S. Biology and Ecology of Wild crucifers. In: Gupta Kumar S (ed). Biology and Breeding of Crucifers. CSR Press, 2009, pp 37–68.
2. Fernández A. Evaluación de la calidad de la flor amarilla (*Diplotaxis tenuifolia*) y sus efectos en la producción de la carne. 2009.
3. Mitidieri A. *Diplotaxis tenuifolia*, *Senecio madagascariensis* poiret, and *Senecio grisebachii* baker, three perennial weeds now spreading in Argentina. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations (ed). Ecology and Control of Perennial Weeds in Latin America. Chile, 1986, pp 185–203.
4. Jin J, Koroleva OA, Gibson T, Swanston J, Maganj J, Zhang Y et al. Analysis of phytochemical composition and chemoprotective capacity of rocket (*Eruca sativa* and *Diplotaxis tenuifolia*) leafy salad following cultivation in different environments. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 5227–5234.
5. Nicoletti R, Raimo F, Miccio G. *Diplotaxis tenuifolia*: biology, production and properties. *Eur J Plant Sci Biotechnol* 2007; 1: 36–43.

6. Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for Total Antioxidant Activity Determination : A Review. *Biochem Anal Biochem* 2011; 1: 1–10.
7. Kuda T, Yano T. Changes of radical-scavenging capacity and ferrous reducing power in club mackerel *Scomber japonicus* and Pacific saury *Cololabis saira* during 4 oC storage and retorting. *LWT-Food Sci Technol* 2009; 42: 1070–1075.
8. Kuda T, Eda M, Kataoka M, Takahashi H, Kimura B. Anti-glycation properties of the aqueous extract solutions of dried algae products harvested and made in the Miura Peninsula, Japan, and effect of lactic acid fermentation on the properties. *J Food Chem* 2016; 28: 1109–1115.
9. Wang W, Yagiz Y., Buran TJ, Nunes CN, Gu L. Phytochemicals from berries and grapes inhibited the formation of advanced glycation end-products by scavenging reactive carbonyls. *Food Res Int* 2011; 44: 2666–2673.
10. Chen YC, Sugiyama Y, Abe N, Kuruto-Nima R, Nozawa R, Hirota A. DPPH radical scavenging compounds from Dou-Chi, a soybean fermented food. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 999–1006.
11. Apak R, Güçlü K, Demirata B, Özyürek M, Çelik SE, Bektaşoğlu B et al. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 2007; 12: 1496–1547.
12. Agbor G, Vinson J, Donnelly P. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int J Foods Sci Nutr Diet* 2014; 3: 147–156.
13. Bahloul N, Bellili S, Aazza S, Chérif A, Faleiro M, Antunes M et al. Aqueous Extracts from Tunisian *Diplotaxis*: Phenol Content, Antioxidant and Anti-Acetylcholinesterase Activities, and Impact of Exposure to Simulated Gastrointestinal Fluids. *Antioxidants* 2016; 5: 12.
14. Rosenthal M, Olenick L. Evaluation of a Single-Color-Reading Method for Determining Fructosamine. *Clin Chem* 1988; 34: 360–363.
15. Falleh H, Msilini N, Oueslati S, Ksouri R, Magne C, Lachaâl M et al. *Diplotaxis harra* and *Diplotaxis simplex* organs: Assessment of phenolics and biological activities before and after fractionation. *Ind Crops Prod* 2013; 45: 141–147.
16. Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods* 2015; 18: 757–781.
17. Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF et al. Nutrient Requirements A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. *J Nutr* 2001; 132: 461–471.

Recibido: 8 marzo 2019

Aprobado: 4 mayo 2019