

Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L.

[Antioxidant activity of different polarity extracts from *Ageratum conyzoides* L.]

Ana María MESA-VANEGAS¹, Sebastián ZAPATA-URIBE¹, Luis Miguel ARANA¹, Isabel Cristina ZAPATA²,
Zulma MONSALVE¹ & Benjamín ROJANO²

¹Grupo de Investigación Agrobiotecnología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y

²Grupo Ciencias de los alimentos,

Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Contactos | Contacts: Benjamín ROJANO - E-mail address: brojano@unal.edu.co

Abstract: The present study aimed to investigate the antioxidant activity of extracts of different polarity of the species *Ageratum conyzoides* L., evaluating by different spectrophotometric methods: ABTS•+, DPPH•, FRAP and ORAC. Extracts of *A. conyzoides* L., showed good antioxidant activity in the methodologies evaluated. The extract was the most active of ethyl acetate (ACExtA) which showed the best evaluated values techniques with higher power as determined by the assay values of TEAC ORAC = 494048.95 ± 29695.80 μMol Trolox/100g sample. Measurements of antioxidant activity by different techniques offer advantages in terms of predicting the *in vitro* antioxidant capacity of this plant, it is also recommended to explore the structural characteristics of the compounds present in the ethyl acetate extract of the plant with to explore the potential benefits and possible mechanisms of action of new antioxidants.

Keywords: Antioxidants, *Ageratum conyzoides* L., reducing power

Resumen: El presente trabajo tuvo como objetivo investigar la actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de la especie *Ageratum conyzoides* L., mediante la evaluación por diferentes métodos espectrofotométricos: ABTS•+, DPPH•, FRAP y ORAC. Los extractos de *A. conyzoides* L., presentaron una buena actividad antioxidante en las metodologías evaluadas. El extracto más activo fue el de acetato de etilo (ACExtA), que presentó los mejores valores por las técnicas evaluadas con la mayor potencia determinada por el ensayo ORAC con valores de TEAC = 494048,95 ± 29695,80 μMol Trolox/100g muestra. Las mediciones de la actividad antioxidante por diferentes técnicas, ofrecen ventajas en términos de la predicción de la capacidad antioxidante *in vitro* de esta planta, además se recomienda explorar las características estructurales de los compuestos presentes en el extracto de acetato de etilo de esta planta con el fin de investigar los beneficios potenciales y los mecanismos de acción de posibles nuevos antioxidantes.

Palabras clave: Antioxidantes, *Ageratum conyzoides* L., poder reductor.

Recibido | Received: 9 de Septiembre de 2013

Aceptado | Accepted: 2 de Noviembre de 2013

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 28 de Octubre de 2014.

Publicado en línea | Published online: 30 de Enero de 2015

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: AM Mesa-Vanegas, S Zapata-Uribe, LM Arana, IC Zapata, Z Monsalve, B Rojano. 2015. Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 14(1): 1 – 10.

INTRODUCCIÓN

La prolongada exposición a oxidantes exógenos y/o a metabolitos endógenos en el cuerpo pueden producir especies reactivas de oxígeno (ROS), (Por ejemplo, los radicales anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno) (Carocho & Ferreira, 2013). Cuando un exceso de radicales libres se forma, puede causar la destrucción de enzimas tales como superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), y catalasa, generando efectos letales en las células por la oxidación de lípidos, proteínas, DNA y enzimas; ocasionando reacciones en cadena que perpetúa la creación de más radicales libres aumentando el daño de tejidos (Krishnaiah et al., 2011). Los radicales libres son responsables de causar un gran número de enfermedades entre las que se incluyen el cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos neuronales, Alzheimer, Parkinson, deterioro cognitivo leve, enfermedades del hígado inducidas por el alcohol, colitis ulcerosa, el envejecimiento y la aterosclerosis (Alam et al., 2013).

Los compuestos antioxidantes tienen la capacidad de inhibir o interrumpir las reacciones de transformación que causan daños a las biomoléculas. En los últimos años los antioxidantes naturales provenientes de plantas (por ejemplo, ácido ascórbico (vitamina C), α -Tocoferol (vitamina E), glutatión, carotenoides, y flavonoides), han sido frecuentemente usados en diferentes campos de la industria farmacéutica, alimentos y en medicina (Karre et al., 2013). Muchos de estos, presentan una actividad comparable con antioxidantes sintéticos de mayor uso comercial como el 2-terbutil-hidroxitolueno (BHT) y el 2-terbutil-hidroxianisol (BHA); los cuales sin embargo, pese a sus propiedades antioxidantes presentan la desventaja de tener efectos toxicológicos (Koheil et al., 2011). Un gran número de contribuciones sobre el reporte de extractos y/o sustancias validadas por sus propiedades antioxidantes se ha incrementado significativamente en los últimos años. El estudio de nuevos y efectivos antioxidantes puede ser de gran beneficio en la mejora de la calidad de vida mediante la prevención y aparición de enfermedades degenerativas. Además, de presentar un sustancial ahorro en el costo de los servicios de atención de la salud. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de sustancias y/o especies vegetales validadas por poseer propiedades antioxidantes para inhibir el deterioro oxidativo, son pocos los estudios complementarios y los recursos que se destinan en la investigación, ya que sólo unas

pocas especies se utilizan como suplementos antioxidantes o alimentarios (Suhaj, 2006).

Ageratum conyzoides, conocido normalmente como manrubio blanco o morado (Asteraceae), es una planta que se encuentra a nivel mundial, particularmente en el suroeste de Asia, India, China, Japón, Indonesia y Corea (Kohli et al., 2006; Kong et al., 2004), también es muy común en el este de África y algunas partes de Suramérica. *Ageratum* consiste de aproximadamente 30 especies, pero solo unas cuantas se han estudiado desde un punto de vista fitoquímico. Los metabolitos más representativos reportados en *A. conyzoides*, son mono y sesquiterpenos, cromenos, cromonas, benzofuranos, cumarinas, flavonoides, triterpenos, esteroides y alcaloides (Okunade, 2002). En la medicina tradicional, esta planta se ha utilizado en varias partes de África, Asia y América del Sur para curar diversas enfermedades. Algunos usos reportados incluyen remedios populares como purgante, febrífugo, cólicos, úlceras, antipirético, enfermedades mentales e infecciosas, diarrea, así como dolores de cabeza, disnea, antiasmático, antiespasmódica, enfermedades ginecológicas, entre otras (Okunade, 2002).

De esta planta se ha reportado su actividad contra parásitos pertenecientes al género *Plasmodium* (Madureira et al., 2002) y al género *Tripanosoma* (Freiburghaus et al., 1996). Nweze y Obiwulu, 2009; confirmaron que también tiene un gran potencial en el control de la Coccidiosis, una enfermedad provocada por un protista de la subclase Coccidiasina, por lo que se sugiere que esta planta se podría emplear como un fitomedicamento en enfermedades parasitarias (Nweze & Obiwulu, 2009). Por otro parte, se evaluó el efecto gastroprotector *in vivo* en ratones, mediante la administración oral de 500 y 750 mg/kg del extracto etanólico de *A. conyzoides*. Los resultados sugieren que las diferentes concentraciones del extracto protegían significativamente las lesiones gástricas de los ratones en un 80,59 y 89,33%, respectivamente. Estos resultados permitieron deducir que la actividad gastroprotectora significativa podría estar mediada por su actividad antioxidante (Shirwaikar et al., 2003). Posteriormente, se han reportado estudios sobre la capacidad de atrapar radicales por el método DPPH de diferentes extractos de *A. conyzoides*, además de su actividad citotóxica (Adebayo et al., 2010); igualmente Nasrin, 2013, evaluó la actividad citotóxica y antioxidante del extracto metanólico de esta planta (Nasrin, 2013). En este sentido, se pretende determinar la capacidad antioxidante de

extractos de diferente polaridad de la especie *Ageratum conyzoides* L. midiendo la actividad antioxidante por diferentes metodologías espectrofotométricas ABTS^{•+}, DPPH[•], FRAP y ORAC para caracterizar el potencial reductor de los diferentes extractos de esta planta y de esta manera ampliar y complementar los resultados frente a su uso en diferentes enfermedades donde los procesos oxidativos sean relevantes.

MATERIALES Y METODOS

Colección del material vegetal

Se obtuvieron hojas de manrubio blanco (*A. conyzoides*), a partir de plantas silvestres del oriente del departamento de Antioquia en el municipio de Guarne. La identificación taxonómica de las plantas se realizó en el herbario de la Universidad de Antioquia.

Preparación de los extractos de diferente polaridad y aceite esencial

El material vegetal se secó a temperatura ambiente durante 10 días y posteriormente se molieron con un tamaño de partícula de 5 mm. Se llevó inicialmente 50,49 g del material vegetal molido a un proceso de percolación hasta agotamiento (5 días/3 veces), utilizando etanol (E) destilado como solvente. Posteriormente, se filtró y se concentró el extracto en un rotavaporador para obtener el extracto etanólico

codificado como (CPExtE). Por otra parte, (307,15 g) de material molido se sometió a un proceso de extracción con solventes de polaridad ascendente (500 mL) mediante un proceso de percolación hasta agotamiento con cada uno de los siguientes solventes: hexano (H), diclorometano (D), acetato de etilo (A) y metanol (M). Después de tres días se comenzó la concentración del extracto a presión reducida en un rotavaporador. El solvente recuperado en el rotavaporador se agregó nuevamente al material vegetal y se repitió el proceso de extracción tres veces hasta cambiar el solvente. El aceite esencial se obtuvo mediante extracción por arrastre con vapor con 40,03 g de material vegetal, el condensado (mezcla aceite esencial (AE) y agua) se recogió y se extrajo con diclorometano, se filtró y se secó con sulfato de sodio Na₂SO₄ y posteriormente se rotoevaporó. Los seis extractos se codificaron con las iniciales de *Ageratum conyzoides* y el tipo de extracto (ACExtH, ACExtD, ACExtA, ACExtM, ACExtE, ACExtAE) y se monitorearon por cromatografía de capa delgada con fase estacionaria de Silica gel 60 GF₂₅₄ Merck®, mediante sistema de elución diclorometano: metanol (DCM -MeOH; 9:1) y revelando con lámpara ultravioleta UVGL-58 a 254 y 366 nm.

Los porcentajes de extracción de los extractos se calcularon según la ecuación 1.

$$Ec. 1 \quad \% \text{ de Extracción} = \frac{\text{Peso Extracto}}{\text{Peso Material Vegetal}} \times 100$$

Evaluación de la actividad antioxidante

Contenido de fenoles totales (CFT)

Determinación de fenoles totales. La determinación del contenido de fenoles totales se realizó por el método colorimétrico Folin - Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965; Peyrat-Maillard et al., 2000, modificado por Gaviria et al., 2009). Se construyó una curva patrón utilizando como estándar ácido gálico. Posteriormente se prepararon diluciones a partir de las soluciones de trabajo, de forma que 50 µL de cada dilución fueron mezclados con 425 µL de agua supra-pura, 125 µL del reactivo Folin y 400 µL de carbonato de sodio, con el objetivo de obtener lecturas a 760 nm, después de permanecer por una hora en ausencia de luz, en un intervalo determinado

de la curva patrón. Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de extracto.

Ensayo de decoloración del catión radical α-α-difenil-β-picrilhidrazilo (DPPH•)

Para cuantificar la capacidad captadora de radicales libres de los extractos se determina el grado de decoloración que provocan sus componentes a una solución metanólica de DPPH mediante el método de Brand-Williams, con algunas modificaciones (Brand-Williams et al., 1995; Puertas et al., 2005). Se prepara una solución madre de DPPH• aproximadamente 20 mg/L del radical en metanol, 990 µL de ésta solución se mezclan con 10 µL de

solución de extracto (a diferentes concentraciones), Se prepara un blanco de muestra que contiene 990 μL MeOH con 10 μL de muestra y un blanco de referencia que contiene 990 μL DPPH \cdot con 10 μL de solvente, Se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad y se mide la absorbancia a 517 nm, Los resultados se expresan como valores TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante TROLOX®.

Ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS \cdot^+

Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS \cdot^+ , debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno ó de electrones, El radical catiónico ABTS \cdot^+ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio, Las mediciones se realizan a una longitud de onda de 734 nm (Re *et al.*, 1999). En la evaluación se utilizaron 10 μL de extracto y 990 μL de la solución del radical ABTS \cdot^+ , A los 30 minutos de reacción a temperatura ambiente y en la oscuridad, se leyó el cambio en la absorbancia respecto a la referencia del reactivo, a una longitud de onda de 734 nm, La referencia del reactivo consistió en una solución del radical ABTS \cdot^+ con el solvente de la muestra, Los resultados se expresaron como valores TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante TROLOX®.

Ensayo FRAP (Ferric Reducing/Antioxidant Power)

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo a su capacidad para reducir el hierro ferrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}), que presenta un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm (Benzie & Strain, 1996). Este ensayo se llevó a cabo en un buffer ácido acético-acetato de sodio (pH 3,4), que contiene TPTZ y FeCl_3 , Se utilizan 900 μL de ésta solución, 50 μL de muestra y 50 μL de agua destilada, Luego de 60 minutos de reacción se determina la absorbancia a una longitud de onda de 593 nm, Para cada muestra se tuvo en cuenta la lectura de la absorbancia del blanco sin cromóforo, de la misma manera que en las pruebas anteriores. La

curva de referencia se construyó usando ácido ascórbico como patrón primario Las actividades de las muestras se expresaron como AEAC (Ascorbic Acid Equivalent Antioxidant Capacity: mg de ácido ascórbico/100 g extracto).

Ensayo ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

El procedimiento experimental está basado en reportes previos de Ou *et al.* (2001), en el cual se emplea Trolox como estándar y condiciones controladas de temperatura a 37° C y pH 7,4. Las lecturas se realizan a una λ de excitación de 493 nm y slit de excitación 5, λ de emisión 515 nm y slit de emisión 13, con atenuador del 1% y sin placa atenuadora, Para el desarrollo de la técnica, se utilizan soluciones de fluoresceína 1×10^{-2} M en PBS (75 mM) AAPH 0,6 M en PBS (75 mM), La muestra contiene 21 μL de fluoresceína, 2,899 μL de PBS, 30 μL del extracto ensayado y 50 μL de AAPH. Como referencia se uso Trolox, El efecto protector del antioxidante es calculado usando las diferencias de áreas bajo la curva de decaimiento de la fluoresceína entre el blanco y la muestra, y se compara contra la curva del Trolox, y expresa en micromoles equivalentes de Trolox por gramo de muestra (μmol Tx/g muestra), de acuerdo a la siguiente ecuación (4):

Ecuación 4

$$ORAC = \frac{(AUC - AUC^0)}{(AUC_{Trolox} - AUC^0)} f[Trolox]$$

Donde AUC es el área bajo la curva de la muestra, AUC^0 área bajo la curva para el control, AUC_{Trolox} área bajo la curva para el Trolox, f es el factor de dilución de los extractos,

Análisis estadístico

Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados son presentados como la media y su desviación estándar (DS), Todos los cálculos fueron realizados y analizados en los programas estadísticos GranPad Prisma 5, STATGRAPHICS CENTURIUN XVI.

RESULTADOS

Los rendimientos de la extracción y los resultados obtenidos empleando cinco metodologías de análisis de actividad antioxidante se presentan en la tabla 1. Los porcentajes de material extractable con los

diferentes solventes mostraron mejores rendimientos para el extracto etanolico (ACEExtE) siendo el porcentaje en peso con respecto al material vegetal seco de 4,32%, seguido de los extractos de diferente

polaridad ACEExtD 1,49%, ACEExtH, 1,21%, ACEExtA 0,59%, ACEExtAE 0,16%.

Tabla 1
Resultados de cuatro ensayos (fenoles totales, DPPH[•], ABTS^{•+}, FRAP y ORAC) para los extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L.

Extracto <i>Ageratum conyzoides</i> L.	% Rendimiento del extracto (g de extracto /100g de material Vegetal seco)	Fenoles totales mg a. gálico / 100 gr muestra	TEAC μ Mol Trolox/ g de extracto TEAC DPPH	TEAC μ Mol Trolox/ g de extracto TEAC ABTS ^{•+}	mg a.a / 100 gr muestra FRAP	ORAC HIDROFÍLICO TEAC (μ Mol Trolox / 100g muestra)
ACEExtH	1,21	1371,74 \pm 59,70	2689,18 \pm 668,01	11243,35 \pm 802,95	2105,79 \pm 78,53	497453,69 \pm 22062,27
ACEExtD	1,49	4223,55 \pm 197,90	6981,68 \pm 1193,13	28364,20 \pm 858,21	3981,51 \pm 58,78	368043,16 \pm 9548,59
ACEExtA	0,59	3697,64 \pm 171,33	19103,49 \pm 571,50	12247,93 \pm 1038,35	5199,34 \pm 191,90	494048,95 \pm 29695,80
ACEExtM	ND	2493,40 \pm 131,97	15616,23 \pm 2528,10	31339,38 \pm 2957,52	2855,51 \pm 309,71	199634,28 \pm 2719,46
ACEExtE	4,32	2479,80 \pm 138,91	10075,80 \pm 1016,63	27711,40 \pm 1717,66	3636,32 \pm 81,69	244178,38 \pm 6048,28
ACEExtAE	0,16	921,88 \pm 29,26	939,14 \pm 35,40	3510,48 \pm 406,91	932,72 \pm 12,26	270615,10 \pm 28563,44

ND*= No determinado

Los antioxidantes, incluyendo compuestos fenólicos (por ejemplo, flavonoides, ácidos fenólicos y taninos), tienen diversos efectos biológicos, tales como anti-inflamatorios, anti-cancerígenos y antiateroscleróticos efectos, como consecuencia de su actividad antioxidante (Chung *et al.*, 1998). La Figura 1, muestra el poder reductor de los diferentes extractos de la especie *A. conyzoides*. Se evaluaron los extractos de *A. conyzoides*, en términos de su contenido de fenoles totales (CPT), los extractos que mayor contenido de fue el ACEExtD 4223,55 \pm 197,90, seguido de ACEExtA con 3697,64 \pm 171,33, ACEExtM con 2493,40 \pm 131,97, ACEExtE con 2479,80 \pm 138,91 y los de más bajo contenido ACEExtH y ACEExtAE con 1371,74 \pm 59,70 y 921,88 \pm 29,26 respectivamente.

El extracto de aceites esenciales no presentó una actividad antioxidante significativa.

Existen varios ensayos de actividad antioxidante rápidos y consistentes, sin embargo cada uno de ellos presenta sus ventajas y desventajas, por lo que se prefiere evaluar varios métodos en lugar de un enfoque unidimensional. Los métodos más comunes y fiables son los ensayos de DPPH[•] y ABTS^{•+}; éstos han sido modificados y mejorados en los últimos años (Krishnaiah *et al.*, 2011). La técnica

DPPH[•] (2,2 - difenil-1-picrilhidracilo) se basa en la premisa de que un hidrógeno donante es un antioxidante. Este ensayo colorimétrico utiliza el DPPH[•] radical, que cambia de púrpura a amarillo en presencia de antioxidantes, y es ampliamente utilizado como un estudio preliminar (Moon & Shibamoto, 2009). Para el ensayo de DPPH[•] se presentó un alto y promisorio potencial reductor para el extracto de acetato de etilo ACEExtA 19103,49 \pm 571,50 seguido del extracto metanolico ACEExtM con 15616,23 \pm 2528,10. Los ABTS^{•+} (2,20-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) ensayo de ácido es un ensayo colorimétrico en el que los radicales ABTS^{•+} decolora en la presencia de antioxidantes (carotenoides, fenólico compuestos y otros) (Moon & Shibamoto, 2009). Este ensayo de decoloración mide la capacidad antioxidante total, tanto lipofílico y sustancias hidrófilas. Las muestras con altos valores de TEAC en el ensayo ABTS^{•+} fueron para los extractos de metanol y diclorometano, con valores de ACEExtM (31339,38 \pm 2957,52) y ACEExtD (28364,20 \pm 858,21) y para los extractos de etanol con valores de ACEExtE (27711,40 \pm 1717,66). Estos resultados indican que los extractos de acetato de etilo y metanol de la especie *A. conyzoides* L. actúan mediante la donación de electrones, por lo que

podrían también reaccionar con los radicales libres, convirtiéndolos en productos más estables y detener las reacciones en cadena generada por radicales libres. Igualmente en el ensayo FRAP, los mejores valores los presentó el extracto de acetato de etilo

ACExtA ($5199,34 \pm 191,90$) y el extracto de diclorometano ACExtD ($3981,51 \pm 58,78$). Esto indica que la propiedad quelante de las muestras con mas alto potencial reductor pueden proporcionar protección contra daño oxidativo.

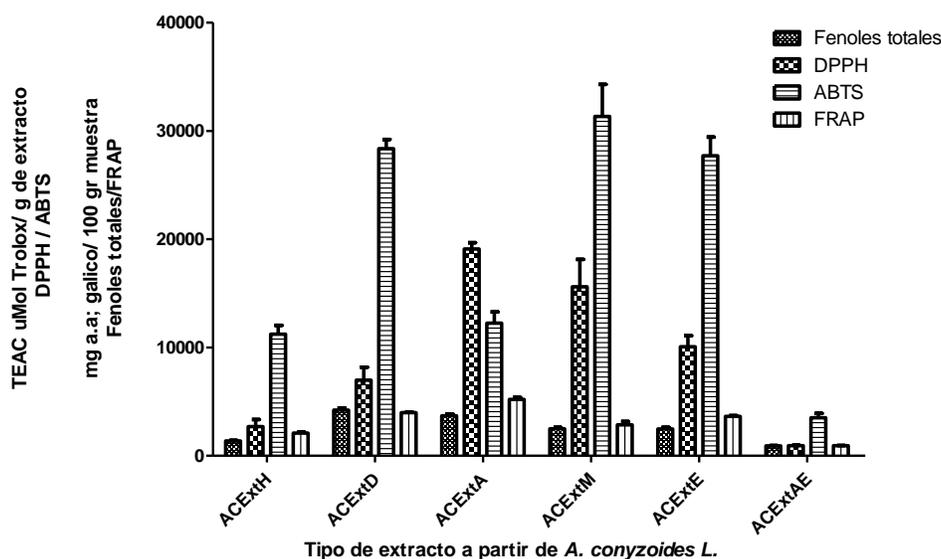


Figura 1

Efecto antioxidante de los extractos de hexano (ExtH), diclorometano (ExtD), acetato de etilo (ExtA) y metanol (ExtM) de *Ageratum conyzoides* L. Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar (DE, n=3). Diferencias entre los extractos con un nivel de $p < 0.05$.

El ensayo ORAC utiliza como sustrato un oxidable beta-ficoeritrina (PE). El ensayo ha sido ampliamente utilizado en muchos estudios recientes de las plantas, ya que presenta la ventaja de combinar el porcentaje de inhibición y el tiempo de duración de la inhibición de los radicales libres de la acción en una sola cantidad. El ensayo ORAC presentó altos valores para el extracto de hexano ACExtH $497453,69 \pm 22062,27$; acetato de etilo ACExtA $494048,95 \pm 29695,80$ y diclorometano ACExtD $368043,16 \pm 9548,59$.

Correlaciones entre los fenoles totales y las actividades antioxidantes

Un buen antioxidante para su correcta evaluación, debe cumplir con muchos requisitos como: una alta solubilidad en el medio, una correcta orientación para interactuar con los radicales libres, proteger los lípidos oxidables, ser un buen reductor y funcionar con alta reactividad, tener efectividad a diferentes

pH. Sin embargo, ninguna técnica de medición de la actividad antioxidante satisface las condiciones anteriores; y para tener una idea del mecanismo de acción de los antioxidantes se deben establecer correlaciones entre el contenido de fenoles y los diversos ensayos antioxidantes (ver Figura 2).

Las medidas de los valores TEAC por la técnica $ABTS^{++}$ son muy altos; sin embargo, es una técnica que no permite discriminar extractos que contienen compuestos buenos antioxidantes como la gran mayoría de este trabajo; esto se debe a la labilidad del reactivo $ABTS^{++}$, una estructura completamente plana que reacciona fácilmente con reductores mediante un mecanismo SET y/o HAT, lo anterior se refleja en la correlación entre los valores TEAC de $ABTS^{++}$ Vs Fenoles Totales ($R^2 = 82,475$; $p < 0,005$) (ver Figura 1).

En las Figuras 2, 3 y 4, se observa una regresión logarítmica que expresa en un 79,49% la concentración de fenoles contra la actividad

antioxidante expresada como TEAC por el ensayo DPPH[•]. Mientras que la regresión lineal entre FRAP y Fenoles totales describe fuertemente en un 96,467% el fenómeno oxidativo; de tal manera, que la mayoría de los compuestos fenólicos contenidos en los extracto de *A.conyzoides* son buenos antioxidantes y la mayoría de ellos, se expresan muy bien como agentes reductores que reaccionan

fundamentalmente mediante un mecanismo de transferencia de electrones SET. Los valores TEAC por el ensayo DPPH[•] y FRAP, tienen una alta correlación entre ellos ($R^2 = 86,52$; $p < 0,005$), por lo tanto ambas técnicas describen de igual forma el mecanismo oxidativo, siendo más significativo estadísticamente el ensayo FRAP.

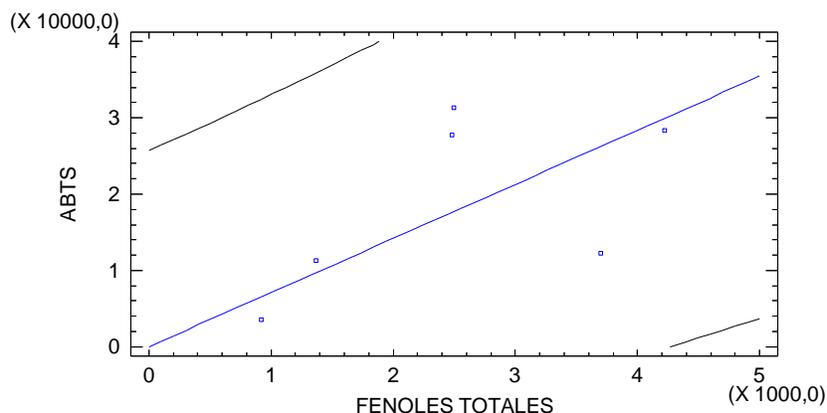


Figura 2
Correlación entre ABTS^{•+} Vs Fenoles Totales

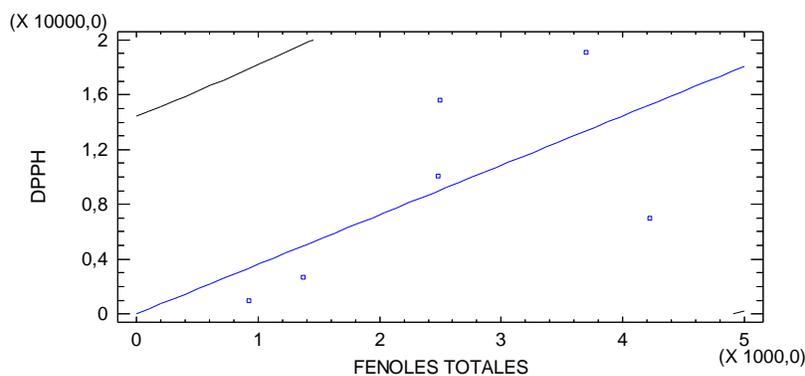


Figura 3
Correlación entre DPPH[•] Vs Fenoles Totales

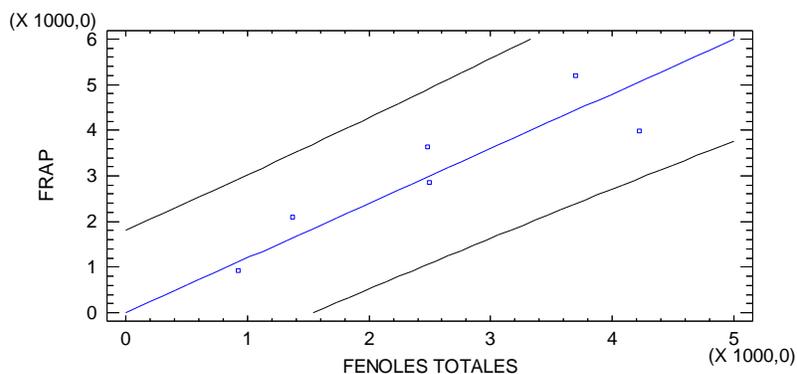


Figura 4
Correlación entre FRAP Vs Fenoles Totales

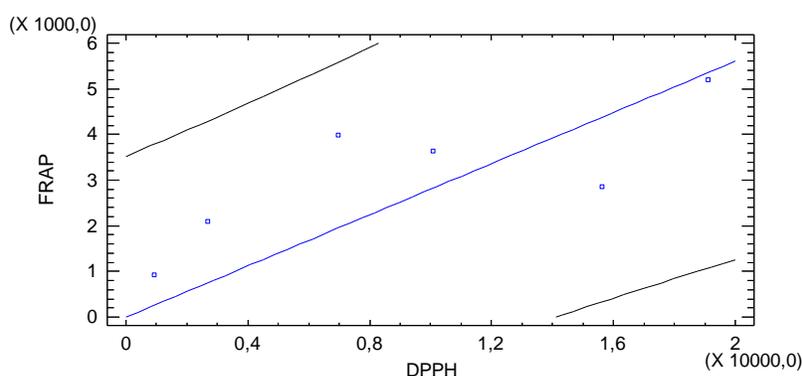


Figura 5
Correlación entre FRAP Vs DPPH

DISCUSIÓN

Recientes investigaciones han demostrado que las propiedades antioxidantes de las plantas podrían estar correlacionadas con la defensa del estrés oxidativo y en diferentes enfermedades humanas. Tres mecanismos de defensa se ha desarrollado, incluyendo: la prevención de las reacciones de especies reactivas oxígeno, especies con compuestos biológicamente importantes, rompiendo reacciones en cadena de radicales libres y no radicales indeseables reacciones de oxidación, limpiando los productos de libre radicales reacciones con sustancias y reparación biológicos de daños y perjuicios. Shirwaikar *et al.*, 2003, determinaron el efecto gastroprotector *in vivo* en ratones del extracto etanólico de *A. conyzoides* sugiriendo que las diferentes concentraciones evaluadas del extracto protegía significativamente las lesiones gástricas en

un 80,59 y 89,33%, respectivamente. Estos resultados permitieron deducir que la actividad gastroprotectora significativa podría estar mediada por su actividad antioxidante. Adebayo *et al.*, 2010, demostraron que la actividad captadora de radicales libres por el método DPPH, las presentaba el extracto de acetato de etilo *A. Conyzoides* y que el kaempferol aislado de este, presentaba una alta capacidad de atrapar el radical a una concentración de $130,07 \pm 17,36$ g/kg. Igualmente, Nasrin 2013, encontró que el extracto metanólico de esta especie presentó un contenido de fenoles totales de $38,125 \pm 2,01$ mg/g equivalentes de ácido gálico y una capacidad antioxidante total medida por método fosfomolibdeno de 333.37 ± 4.22 mg/g equivalente de ácido ascórbico. Estas investigaciones sugieren que la especie *A. conyzoides* posee notables propiedades antioxidantes y se complementan con los resultados obtenidos en este

trabajo donde demostramos por diferentes metodologías de medición antioxidante que los extractos de acetato de etilo y metanol de la especie *A. conyzoides* L. actúan mediante la donación de electrones atrapando radicales libres y mediante sus propiedades quelantes que pueden proporcionar protección contra el daño oxidativo. Adicionalmente, los resultados obtenidos por el método ORAC tienen en cuenta la capacidad antioxidante de los extractos con y sin fases de retardo, aspecto importante en una muestra compleja como lo es un extracto, donde los antioxidantes pueden ser de acción lenta y rápida. Por lo que se recomienda seguir explorando las características estructurales de los compuestos presentes en el extracto de acetato de etilo y metanol de la planta *A. conyzoides*, mediante un fraccionamiento bioguiado por cromatografía para aislar y purificar metabolitos que tengan una promisoriosa actividad antioxidante con la presencia de polifenoles bioactivos tales como, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides insaturados y/o triterpenos que se puedan explorar con más profundidad para un mayor entendimiento del potencial reductor de esta planta, dado que los métodos para medir la actividad antioxidante tienen en cuenta aspectos como: intervención de mecanismos, atrapamiento de radicales libres, descomposición catalítica, supresión prooxidante, porcentaje de atrapamiento y concentración efectiva (moles de radicales libres atrapados por mol de antioxidante).

CONCLUSIONES

En conclusión, los métodos seleccionados para evaluar la actividad antioxidante de diferentes extractos de la especie *A. conyzoides* L. mostraron que los extractos polares y medianamente polares de *A. conyzoides* presentaron una interesante actividad antioxidante en las metodologías evaluadas y un alto contenido de fenoles. Este tipo de muestras contienen compuestos fenólicos reductores. En el método ORAC que generalmente es considerado de alto nivel debido al uso de los radicales libres de importancia biológica y a su integración tanto de grado y tiempo de inhibición demostró que el extracto de acetato de etilo (ACExtA) fue el más activo y presentó uno de los mejores valores con la mayor potencia determinada por el ensayo ORAC de TEAC = $494048,95 \pm 29695,80 \mu\text{Mol Trolox}/100\text{g muestra}$. El presente estudio mostró que los efectos de la actividad antioxidante de los extractos de *A. conyzoides* L. mediante las mediciones por diferentes

técnicas ofrecen ventajas en términos de la predicción de la capacidad antioxidante *in vitro* de esta planta y de la dependencia de la presencia de polifenoles bioactivos constituidos principalmente por taninos, flavonoides, saponinas, esteroides insaturados y/o triterpenos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Antioquia y a la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

REFERENCIAS

- Alam MN, Nusrat JB, Rafiqzaman M. 2013. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmac J** 21: 143 - 152.
- Adebayo HA, Tan NH, Akindahunsi AA, Zeng GZ, Zhang YM. 2010. Anticancer and antiradical scavenging activity of *Ageratum Conyzoides* L. (Asteraceae). **Pharmacogn Mag** 6: 62 - 66.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. **Anal Biochem** 239: 70 - 76.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Sci Tecnol** 28: 559 - 562.
- Chung K, Wong T, Huang Y, Lin Y. 1998. Tannins and human health: a review. **Crit Rev Food Sci Nutr** 38: 421 - 464.
- Puertas M, Mesa AM, Saez J. 2005. In Vitro radical scavenging activity of two Columbian Magnoliaceae. **Naturwissenschaften** 92: 381 - 384.
- Carocho M, Ferreira ICFR. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem Toxicol** 51: 15 - 25.
- Freiburghaus F, Kaminsky R, Nkonya MHH, Brun R. 1996. Evaluation of African plants for their in vitro trypanocidal activity. **J Ethnopharmacol** 55: 1 - 11.
- Gaviria C, Ochoa C, Sánchez N, Medina C, Lobo M, Galeano P, Mosquera A, Tamayo A, Lopera Y, Rojano B. 2009. Actividad antioxidante e inhibición de la peroxidación lipídica de extractos de frutos de mortiño (*Vaccinium*

- meridionale SW). **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 8: 519 - 528.
- Karre L, Lopez K, Getty GJK. 2013. Natural antioxidants in meat and poultry products. **Meat Science** 94: 220 - 227.
- Koheil MA, Hussein MA, Othman SM, El-Haddad A. 2011. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Moringa peregrina* Seeds. **Free Rad Antioxid** 1: 10 - 12.
- Kohli RK, Batish DR, Singh HP, Dogra KS. 2006. Status, invasiveness and environmental threats of three tropical American invasive weeds (*Parthenium hysterophorus* L., *Ageratum conyzoides* L., *Lantana camara* L.) in India. **Biol Invas** 8: 1501 - 1510.
- Kong C, Hu F, Xu X, Liang W, Zhang C. 2004. Allelopathic plants.XV. *Ageratum conyzoides* L. **Allelo-pathy J** 14: 1 - 12.
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant Species. **Food Bioprod Process** 8: 217 - 233.
- Madureira MDC, Martins AP, Gomes M, Paiva J, Da Cunha AP, Do Rosario V. 2002. Antimalarial activity of medicinal plants used in S. Tome and principle islands. **J Ethnopharmacol** 84: 2 - 29.
- Moon J, Shibamoto T. 2009. Antioxidant assays for plant and food components. **J Agric Food Chem** 57: 1655 - 1666.
- Nasrin F. 2013. Antioxidant and cytotoxic activities of *Ageratum conyzoides* stems. **Int Curr Pharmac J** 2: 33 - 37.
- Nweze NE, Obiwulu IS. 2009. Anticoccidial effects of *Ageratum conyzoides*. **J Ethnopharmacol** 122: 6 - 9.
- Okunade AL. 2002. *Ageratum conyzoides* L. Asteraceae. **Fitoterapia** 73: 1 - 16.
- Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J Agric Food Chem** 49: 4619 - 4626.
- Peyrat-Maillard MN, Bonnely S, Berset C. 2000. Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection. **Talanta** 51: 709 - 716.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med** 26: 1231 - 1237.
- Shirwaikar A, Bhilegaonkar PM, Malini S, Sharath KJ. 2003. The gastroprotective activity of the ethanol extract of *Ageratum conyzoides*. **J Ethnopharmacol** 86: 117 - 121.
- Singleton V, Rossi J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Amer J Enol Viticult** 16: 144 - 158.
- Suhaj M. 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. **J Food Composition Anal** 19: 531 - 537.