**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (DPPH Y ABTS) DE DIFERENTES EXTRACTOS DE *TITHONIA DIVERSIFOLIA*.**

**COMPARISON OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY (DPPH AND ABTS) OF DIFFERENT *TITHONIA DIVERSIFOLIA* EXTRACTS**

Liliet Gonzáles Sierra1, Inelvis Castro Cabrera1, Maykelis Díaz Solares1, Yudit Lugo Morales1, Leydi Fonte Carballo1 y Nancy Altunaga Pérez1

 \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

*1Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, Universidad de Matanzas. Ministerio de Educación Superior. Central España Republicana 44280, Matanzas, Cuba. Correo electrónico:* *liliet.gonzalez@ihatuey.cu*

 \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**Resumen**

*Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray es una especie con un alto potencial por sus propiedades fitoquímicas que le confieren importantes aplicaciones terapéuticas, valor nutricional y plasticidad ecológica. Los metabolitos secundarios presentes en las diferentes partes de la planta actúan como potentes antioxidantes. Por ello, el objetivo fue determinar la capacidad antioxidante de hojas, tallo y raíz mediante dos métodos: captura del radical ABTS y DPPH. La colecta del material vegetal se realizó al azar en la finca de un productor de la provincia de Matanzas, Cuba. Las muestras de hojas, tallo y raíz fueron secadas, pulverizadas y se realizó extracción con etanol comercial mediante maceración. Posteriormente el solvente fue retirado utilizando rotoevaporador sobre vacío. En ambas determinaciones se midió en porcentaje de actividad antioxidante a diferentes concentraciones del patrón (ácido ascórbico) y de los extractos. La cuantificación se efectuó por triplicado en microplacas de 96 pocillos. La lectura espectrofotométrica se llevó a cabo a 620 nm y 520 nm respectivamente. Se utilizó el ANOVA de clasificación simple y la prueba de rangos múltiples de Duncan para la comparación de medias (P<0,05). Los resultados mostraron que existe mayor sensibilidad al método DPPH con respecto al ABTS. La cuantificación mostró que la raíz es el órgano que mayor capacidad antioxidante posee por los dos métodos estudiados, seguido de las hojas y por último el tallo. *Tithonia diversifolia* constituye una fuente importante de diversidad natural dada la variedad de compuestos sintetizados, lo que favorece la salud y la nutrición animal.

**Palabras clave:** *Tithonia diversifolia*, capacidad antioxidante, DPPH, ABTS.

**Abstract**

T*ithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray is a species with high potential due to its phytochemical characteristics which ascribe important therapeutic applications, nutritional value and ecological plasticity to it. The secondary metabolites present in the different parts of the plant act as strong antioxidants. For such reason, the objective was to determine the antioxidant capacity of leaves, stem and root by two methods: capture of the radical ABTS and DPPH. The collection of the plant material was randomly carried out in a farm from Matanzas province, Cuba. The leaf, stem and root samples were dried, pulverized and extraction with commercial ethanol was performed through maceration. In both determinations measurement was made in percentage of antioxidant activity at different concentrations of the pattern (ascorbic acid) and the extracts. The quantification was done in triplicate in 96-well microplates. The spectrophotometric reading was carried out at 620 and 520 nm, respectively. The simple classification ANOVA and Duncan’s multiple range test for mean comparison were used (P<0,05). The results showed that there is higher sensitivity to the DPPH method with regards to ABTS. The quantification showed that the root is the organ which has higher antioxidant capacity by the two studied methods, followed by the leaves and finally, the stem. Tithonia diversifolia constitutes an important source of natural diversity given the variety of synthesized compounds, which favors animal health and nutrition.

Keywords: *Tithonia diversifolia*, plant extracts, antioxidant capacity, DPPH, ABTS.

**INTRODUCCIÓN**

*Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray es una arbustiva robusta o herbácea, no leguminosa perteneciente a la familia Asteraceae, originaria de Centroamérica (Pérez y col., 2009). Se trata de una planta perenne con potencialidades medicinales que posee gran plasticidad ecológica debido a la variedad de metabolitos secundarios que van a ser sintetizados por la planta de acuerdo al ambiente (Sampaio *y* col., 2016, Tagne y col., 2018). Muchos de estos compuestos bioactivos aportan altos valores de actividad antioxidante. Los antioxidantes son sustancias que permiten proteger al organismo de la acción de los radicales libres los cuales provocan estrés oxidativo y la aparición de determinadas enfermedades (Di Giacomo y col., 2015).

Esta forrajera empleada en la alimentación animal ha mostrado numerosos beneficios debido a su valor nutricional y a la diversidad en su composición química. Su uso en la dieta animal permite la reducción de metanógenos y ejerce efectos beneficios en la ecología microbiana ruminal (Galindo y col., 2017). Lezcano-Más y col. (2016) plantean que contribuye a la disminución de la carga parasitaria en bovinos jóvenes. Por otra parte, estudios realizados muestran su aplicabilidad como antimicrobiano, antiinflamatorio (Sousa y col., 2019), para combatir la malaria (Afolayan y col., 2016), la diabetes (Sari y col., 2018) y el cáncer (Di Giacomo y col., 2015., Wahyuningsih y col.,2015). También se ha empleado como abono verde por su rápido crecimiento, alta capacidad de fijar nitrógeno y acumulación de fósforo con impacto en suelos pobres (Scrase y col., 2019). Constituye una alternativa para el control de insectos mostrando actividad insecticida contra hormigas cortadoras de hojas (Pulido y col., 2017).

Las numerosas bondades de *T. diversifolia* expuestas anteriormente dan lugar a la siguiente investigación que tiene como objetivo determinar la capacidad antioxidante de hojas, tallos y raíces mediante dos métodos: captura del radical ABTS•+ y DPPH•. Lo que nos permitirá comparar los porcentajes de actividad antioxidante de las diferentes partes de la planta y mostrar el órgano con mejores características para posteriores estudios. Así como comparar la sensibilidad de ambos métodos frente a los extractos.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**Obtención del material vegetal**

Las hojas, los tallos y las raíces de *T. diversifolia* se recolectaron en la finca de un productor, en la provincia de Matanzas, Cuba. Las muestras fueron lavadas y secadas en estufa a 50°C durante 24 horas para las hojas y 72 horas en el caso de los tallos y las raíces.

**Preparación de los extractos**

El material vegetal seco y molido se sometió a maceración pasiva con etanol durante 24 horas (tres veces). Posteriormente se filtraron al vacío y el solvente fue retirado utilizando rotoevaporador. Los ensayos se realizaron con extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *T. diversifolia* en el laboratorio de Biotecnología de la EEPF Indio Hatuey, Matanzas, Cuba.

**Determinación de la actividad antioxidante mediante captura del radical ABTS**

La capacidad de inhibir el radical 2,2’-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato de amonio (ABTS•+) de los extractos estudiados se determinó siguiendo la metodología propuesta por Re y col. (1999) con algunas modificaciones. El radical se generó mediante la oxidación del ABTS•+ a 3,5 mM con persulfato de potasio a 1,25 mM. Para la realización del ensayo, se tomaron 6 µL del extracto a 3 mg/mL realizando diluciones seriadas (93,75; 187,5; 375; 750; 1500; 3000µg/ml) y se mezclaron con 194 µL de la solución de ABTS•+ previamente preparada y ajustada a un valor de absorbancia de 0,700 ± 0,002 con etanol. Esta mezcla se dejó reaccionar durante media hora en ausencia de luz y a temperatura ambiente. Como control negativo, se utilizó el solvente en el cual habían sido solubilizados los extractos (A control (-)) y como control positivo el ácido ascórbico a 3 mg/mL y empleando de igual manera diluciones seriadas, permitiendo la comparación entre los extractos y el patrón. La reducción del radical fue medida a una longitud de onda de 620 nm por ELISA. Cada muestra fue evaluada por triplicado y el ensayo se efectuó dos veces. El porcentaje de decoloración del ABTS•+ se determinó mediante la siguiente ecuación:

% Actividad antioxidante = [(A Control (-) – A muestra)/ A Control (-)] x 100

**Determinación de la** **actividad antioxidante mediante captura del radical DPPH**•

 La actividad antioxidante se midió a través del método del radical DPPH• descrito por Bondet y col., (1997) con modificaciones. La capacidad captadora de electrones se determinó mediante la reacción de 200 µL de una solución de a 0,05 mg/mL y 80 µL de una solución del extracto a partir de 3 mg/mL realizando diluciones seriadas (93,75; 187,5; 375; 750; 1500; 3000µg/ml) durante 30 minutos en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente (A muestra). La reducción del DPPH• se medió a 520 nm. Cada muestra fue evaluada por triplicado y con dos repeticiones. Los controles negativo y positivo fueron los mismos utilizados en el ensayo con ABTS•+ al igual que la ecuación empleada para la determinación de la actividad antioxidante.

**Estadística**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple para la determinación de diferencias entre las concentraciones y la actividad antioxidante de los extractos. Las desigualdades entre las medias se determinaron mediante una prueba de rangos múltiples de Duncan (1955) (P<0,05). Se utilizó el programa estadístico InfoStat 2012.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Figura 1 se observa la capacidad antioxidante medida por el porcentaje de captación de radicales libres ABTS para los extractos de hojas, tallos y raíces de *Tithonia diversifolia* a diferentes concentraciones (93,75; 187,5; 375; 750; 1500; 3000µg/ml)

**Figura 1:** Captura del radical ABTS de extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Tithonia diversifolia* utilizando como patrón el ácido ascórbico.

Aunque la mayoría de las concentraciones evaluadas de los extractos poseen capacidad antioxidante, la comparación con el patrón los hace ver con menor potencial. Sin embargo, es necesario destacar que se trata de un compuesto puro y que los extractos poseen valores significativos a partir de 1500µg/ml, que las raíces poseen mayor actividad en comparación con las hojas y estas a su vez son mayores que el tallo. Las concentraciones negativas solo se expresan para una posterior comparación con el método de DPPH

En la tabla 1 se presenta el análisis estadístico (ANOVA) realizado que permite concluir que las mejores concentraciones recomendadas son las superiores a 1500 µg/ml tanto de la raíz, el tallo y las hojas pues no existen diferencias significativas con el patrón (ácido ascórbico). Y las concentraciones que por este método no reportaron actividad fueron a partir de 187,5 µg/ml para las hojas y el tallo y de 93.75 µg/ml para la raíz.

**Tabla 1:**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Concentraciones | Ac. ascórbico | AA. Hojas | AA. Tallo |  AA. Raíz |
| 3000 | 99.96a | 36.88abcde | 26.59abcdef | 61.77abcd |
| 1500 | 99.87ab | 20.71abcdefg | 16.53abcdefgh | 27.85abcdef |
| 750 | 99.37ab | 7.50cdefghi | 8.18cdefghi | 14.82bcdefghi |
| 375 | 90.43abc | 2.61efghi | 2.96efghi | 6.96defghi |
| 187.5 | 48.07abcd | -1.17hi | -0.36ghi | 2.43fghi |
| 93.75 | 22.24abcdefg | -2.65i | -2.29i | -0.27ghi |

En la Figura 2 se muestra la capacidad antioxidante por otro método captura del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) a las mismas concentraciones empleadas en el método anterior y utilizando el ácido ascórbico como patrón, lo que permite una comparación entre ambos métodos.

**Figura 2:** Captura del radical DPPH de extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Tithonia diversifolia* utilizando como patrón el ácido ascórbico.

Obsérvese que en este caso existe una mayor sensibilidad al método empleado, aunque la raíz continúa siendo la de mayor actividad seguida de las hojas y por último el tallo, la comparación con el ácido ascórbico como patrón es menos desventajosa con respecto al método anterior. Los porcentajes de actividad antioxidante son superiores a los mostrados por el método ABTS. Se muestra además que la raíz a 750µg/ml ya posee una actividad prácticamente igual al patrón. Que con valores de 100 µg/ml posee actividad lo que no se observa de igual manera con el método de ABTS. Esto puede deberse a la labilidad del reactivo ABTS, una estructura completamente plana que reacciona fácilmente con reductores (Mesa-Vanegas y col., 2015), que puede actuar a favor o en contra pues a altas concentraciones existe una alta reacción sin embargo a bajas podemos ver que no ocurre de igual manera.

En la tabla 2 se reporta el análisis estadístico realizado para la captura del radical DPPH las mejores concentraciones son a partir de 750 µg/ml para la raíz pues no existen diferencias con el patrón seguido de las hojas a 1500 µg/ml y el tallo a 3000 µg/ml. Es necesario resaltar que se evidencian altas concentraciones de actividad incluso a las más bajas se reportan valores significativos.

**Tabla 2:**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Concentraciones | Ac. ascórbico | AA. Hojas |  AA. Tallo | AA. Raíz |
| 3000 | 99.62a | 95.25abcdef | 94.04abcdefgh | 94.92abcdef |
| 1500 | 99.23ab | 94.81abcdefg | 76.99bcdefghij | 94.81abcdef |
| 750 | 98.79abc | 58.31cdefghij | 37.16efghij | 91.91abcdefghi |
| 375 | 98.19abcd | 29.13efghij | 17.54fghij | 56.34defghij |
| 187.5 | 98.09abcd | 14.59ghij | 8.91ij | 26.99fghij |
| 93.75 | 97.43abcde | 7.54ij | 4.26j | 11.26hij |

**CONCLUSIONES**

Los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Tithonia diversifolia* muestran altos valores de capacidad antioxidante por el método de captura del radical DPPH. Las raíces constituyen el órgano con mayor actividad seguido de las hojas y por último el tallo, lo que concuerda con los resultados reportados por ambos métodos (ABTS y DPPH). Sin embargo, existe mayor sensibilidad de los extractos al método DPPH con respecto al ABTS. *T. diversifolia* es una fuente importante de diversidad natural dada la variedad de compuestos que es capaz de sintetizar muchos de los cuales poseen actividad antioxidante, lo que favorece la salud, la nutrición animal y la medicina natural y tradicional.

**REFERENCIAS:**

1. Afolayan, F. I., Adegbolagun, O. M., Irungu, B., Kangethe, L., Orwa, J., & Anumudu, C. I. (2016). Antimalarial actions of Lawsonia inermis, Tithonia diversifolia and Chromolaena odorata in combination. *Journal of ethnopharmacology*, *191*, 188-194.
2. Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. L. W. T. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, *30*(6), 609-615.
3. Di Giacomo, C., Vanella, L., Sorrenti, V., Santangelo, R., Barbagallo, I., Calabrese, G., ... & Acquaviva, R. (2015). Effects of Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray extract on adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Plos one*, *10*(4), e0122320.
4. Galindo, J., González, N., Scull, I., Marrero, Y., Moreira, O., & Ruiz, T. E. (2017). Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray and its effect on the rumen population and microbial ecology. *Mulberry, moringa and tithonia in animal feeds and others. Results in Latin American and its Caribbean. Cuba: FAO, ICA, EDICA*, 251-256.
5. Lezcano-Más, Y., Soca-Pérez, M., Roque-López, E., Ojeda-García, F., Machado-Castro, R., & Fontes-Marrero, D. (2016). Forraje de Tithonia diversifolia para el control de estrongílidos gastrointestinales en bovinos jóvenes. *Pastos y Forrajes*, *39*(2), 133-138.
6. Mesa-Vanegas, A. M., Zapata-Uribe, S., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalve, Z. y Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferentes polaridad de Ageratum conyzoides L. Boletín Latinoamaericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 14(1): 1-10.
7. Pérez, A., Montejo, I., Iglesias, J. M., López, O., Martín, G. J., García, D. E., ... & Hernández, A. (2009). Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray. *Pastos y Forrajes*, *32*(1), 1-1.
8. Pulido, K. D. P., Dulcey, A. J. C., & Martínez, J. H. I. (2017). New caffeic acid derivative from Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray butanolic extract and its antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, *109*, 1079-1085.
9. 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 radical biology and medicine*, *26*(9-10), 1231-1237.
10. Sampaio, B. L., Edrada-Ebel, R., & Da Costa, F. B. (2016). Effect of the environment on the secondary metabolic profile of Tithonia diversifolia: a model for environmental metabolomics of plants. *Scientific reports*, *6*, 29265.
11. Sari, A. R., Saraswati, T. R., & Yuniwarti, E. Y. W. (2018). Antihyperglycemic Activity of Aqueous Extract of Insulin Leaves (Tithonia diversifolia) on Hyperglycemic Rats (Rattus norvegicus). *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, *10*(3).
12. Scrase, F. M., Sinclair, F. L., Farrar, J. F., Pavinato, P. S., & Jones, D. L. (2019). Mycorrhizas improve the absorption of non-available phosphorus by the green manure Tithonia diversifolia in poor soils. *Rhizosphere*, *9*, 27-33.
13. Sousa, I. P., Chagas-Paula, D. A., Tiossi, R. F. J., Silva, E. D. O., Miranda, M. A., de Oliveira, R. B., & Da Costa, F. B. (2019). Essential oils from Tithonia diversifolia display potent anti-oedematogenic effects and inhibit acid production by cariogenic bacteria. *Journal of Essential Oil Research*, *31*(1), 43-52.
14. Tagne, A. M., Marino, F., & Cosentino, M. (2018). Tithonia diversifolia (Hemsl.) A. Gray as a medicinal plant: A comprehensive review of its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacotoxicology and clinical relevance. *Journal of ethnopharmacology*, *220*, 94-116.
15. Wahyuningsih, M. S. H., Wijayanti, M. A., Budiyanto, A. R. I. E. F., & Hanafi, M. U. H. A. M. M. A. D. (2015). Isolation and Identification of Potential Cytotoxic Compound from Kembang bulan [Tithonia diversifolia (Hemsley) A. Gray] Leaves. *Int J Pharm Pharm Sci*, *7*(6), 298-301.