



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS HIPOLIPÊMICO E ANTIOXIDANTE *IN VIVO* DOS  
EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA FOLHA E RAIZ DO YACON  
(*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*)**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PATRÍCIA MARTINEZ OLIVEIRA**

**URUGUAIANA**

**2015**

**PATRÍCIA MARTINEZ OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS HIPOLIPÊMICO E ANTIOXIDANTE *IN VIVO* DOS  
EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA FOLHA E RAÍZ DO YACON  
(*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanusa Manfredini

**URUGUAIANA**

**2015**

O48a Oliveira, Patrícia Martinez  
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS HIPOLIPÊMICO E ANTIOXIDANTE IN VIVO  
DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA FOLHA E RAIZ DO YACON  
(SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS) / Patrícia Martinez Oliveira.  
106 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,  
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2015.

"Orientação: Vanusa Manfredini".

1. Yacon. 2. Estresse oxidativo. 3. Antioxidante. 4.  
Hipolipêmico. I. Título.

**PATRÍCIA MARTINEZ OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS HIPOLIPÊMICO E ANTIOXIDANTE *IN VIVO* DOS  
EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA FOLHA E RAÍZ DO YACON  
(*SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS*)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

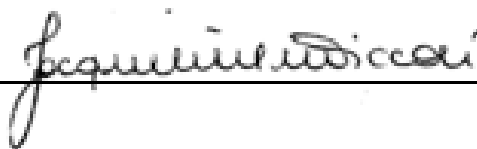
Área de concentração: Bioprospecção molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 27 de Julho de 2015.

Banca examinadora:



Prof. Dra. Vanusa Manfredini  
Orientadora  
(UNIPAMPA)



Prof. Dra. Jacqueline Piccoli  
(UNIPAMPA)



Prof. Dra. Luciane Noal Calil  
(UFRGS)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar vida e saúde para correr atrás dos meus sonhos.

Aos meus pais, Ercília e Francisco, pelo amor, carinho e apoio incondicional. Muito obrigada!! Amo vocês!!

Ao meu namorado, Josir, pelo amor, incentivo e companheirismo. Te amo!

Ao meu vô, Eloi, *in memoriam*, pelo carinho e amor.

À minha querida orientadora, Prof. Dra. Vanusa Manfredini pela oportunidade, amizade e principalmente pela confiança. Muito obrigada!!

Aos colegas do Gestox, em especial a Ritiéle, Aline, Letícia, Bruna, Alessandra, Angélica, Patrícia e Andrielle, sem vocês não poderia desenvolver esse projeto. Muitíssimo obrigada!

A UNIPAMPA e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica (PPGBIOQ) pela oportunidade.

À Melissa Shwanz, pela realização de experimentos. Obrigada!

Ao grupo Biotech em especial Prof. Dra. Francielli Cibin e Aryele Izaguirry pelo auxílio nos experimentos. Obrigada!

Ao grupo LEFQPN, em especial ao Prof. Dr. Elton Denardin e Jefferson Soares pelo empréstimo de equipamentos.

À prof. Maristela Cortez pelo empréstimo de equipamentos.

Ao Rodrigo Fontoura pela revisão do inglês nos artigos científicos.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição científica ao avaliarem este trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa. Muito obrigada!!

A mente que se abre  
a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Fundação Universidade Federal do Pampa

Autora: Patrícia Martinez Oliveira

Orientadora: Vanusa Manfredini

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 27 de julho de 2015

As doenças cardiovasculares (DCV) lideram as causas de morte em todo o mundo, sendo a dislipidemia o principal fator de risco. A alimentação é reconhecida como a intervenção mais importante na prevenção de patologias e as plantas são consideradas a melhor fonte de antioxidantes naturais. Entre elas, um alimento funcional que tem se destacado é o Yacon, uma raiz tuberosa, originária da região Andina que possui frutooligossacarídeos (FOS) como principal carboidrato de reserva, diferenciando-se da maioria das espécies tuberosas que estocam energia na forma de amido. Além desses compostos, o Yacon apresenta polifenóis em quantidade significativa tanto nas raízes como nas folhas. Estudos demonstram que o Yacon possui atividade hipoglicêmica, entretanto pouco se sabe sobre outras propriedades. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos hipolipêmico e antioxidante *in vivo* dos extratos hidroalcoólicos da folha e raiz do Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). Foram utilizados ratos Wistar, machos, divididos em: G1 (controle dieta normal), G2 (controle dieta hipercalórica (NaCl 0,9%), G3: suspensão oral de sinvastatina 10 mg/Kg (SIM), G4: extrato folha Yacon 20 mg/kg (EFY20), G5: extrato folha Yacon 40 mg/kg (EFY40), G6: extrato folha Yacon 20 mg/kg + sinvastatina (EFY20+SIM), G7: extrato folha Yacon 40 mg/kg + sinvastatina (EFY40+SIM), G8: extrato raiz Yacon 20 mg/kg (ERY20), G9: extrato raiz Yacon 40 mg/kg (ERY40), G10: extrato raiz Yacon 20 mg/kg + sinvastatina (ERY20+SIM) e G11: extrato raiz Yacon 40 mg/kg + sinvastatina (ERY40+SIM). As formulações foram administradas uma vez ao dia por gavagem durante 14 dias consecutivos. Os parâmetros hematológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo foram determinados através de metodologias clássicas. Os grupos que receberam o extrato de Yacon apresentaram melhora do perfil glicêmico e lipídico. A dieta



hipercolesterolêmica aumentou os níveis séricos da creatina-quinase, CK-MB, homocisteína e LDH porém a administração do extrato diminuiu significativamente os níveis destes marcadores quando comparado ao grupo não tratado. Além disso, o extrato, reduziu a peroxidação lipídica, a carbonilação proteica, e frequência de micronúcleos induzida por hipercolesterolemia e aumentou as defesas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GSH, vitamina C e polifenóis) no sangue. Verificou-se ainda que, a suplementação do Yacon não mostrou efeito hepatotóxico ou nefrotóxico. A dieta hipercolesterolêmica aumentou o processo inflamatório, avaliado através de seus marcadores, e a administração do extrato melhorou esse parâmetro. Além disso, a suplementação com a raiz do Yacon controlou o ganho de peso dos animais. Assim, os resultados sugerem que o extrato liofilizado do Yacon apresentou uma atividade hipoglicêmica, hipolipêmica e antioxidante, possivelmente devido ao seu alto conteúdo de compostos fenólicos.

Palavras-chave: Yacon, glicemia, antioxidante, lipídeos sanguíneos, estresse oxidativo

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree Program of Post-Graduation in Biochemistry Federal University of Pampa

### **EVALUATION OF EFFECTS HIPOLIPÊMICO AND ANTIOXIDANT IN VIVO OF EXTRACTS HYDROALCOHOLIC LEAF AND ROOT OF YACON (SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS)**

Author: Patrícia Martinez Oliveira

Advisor: Vanusa Manfredini

Date and Place of Defense: Uruguaiiana, July 27, 2015.

Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide, and dyslipidemia a major risk factor. Feeding is recognized as the most important intervention in the prevention of diseases and plants are considered the best source of natural antioxidants. Among them, a functional food that has been highlighted is the Yacon, a tuberous root, originate in the Andean region with fructooligosaccharides (FOS) as the main reserve carbohydrate, differing from most tuberous species which store energy in the form of starch. In addition to these compounds, Yacon presents significant amount of polyphenols in both roots and leaves. Studies show that Yacon has hypoglycemic activity, however little is known about other properties. The objective of this study was to investigate the hypolipemic and antioxidant effects *in vivo* of hydroalcoholic extracts of leaf and root of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). Male Wistar rats were used, divided into: G1 (normal control diet), G2 (control calorie diet) (NaCl 0.9%), group 3: oral suspension of simvastatin 10 mg/kg (SIM), group 4: Yacon leaf extract 20 mg/kg (YLE20), group 5: Yacon leaf extract 40 mg/kg (YLE50), group 6: Yacon leaf extract 20 mg/kg and simvastatin 10 mg/kg (YLE20+SIM), group 7: Yacon leaf extract 40 mg/kg and simvastatin 10 mg/kg (YLE40+SIM), group 8: Yacon root extract 20 mg/kg (YRE20), G9: Yacon root extract 40 mg/kg (YRE40), G10: Yacon root extract 20 mg/kg and simvastatin 10 mg/kg (YRE20+SIM), G11: Yacon root extract 40 mg/kg and simvastatin 10 mg/kg (YRE40+SIM), The formulations were administered once daily by gavage for 14 consecutive days. Hematological, biochemical and oxidative stress parameters were determined by classical methods. The groups that received the Yacon extract showed improvement of glycemic and lipid profile. The hypercholesterolemic diet increased serum levels of creatine kinase, CK-MB,

homocysteine and LDH, but the extract administration decreased the levels of these markers significantly when compared to the untreated group. Moreover, the extract, reduced lipid peroxidation, protein carbonylation and frequency of micronucleus induced by hypercholesterolemia and increase antioxidant defenses (CAT, SOD, GPx, GSH, vitamin C, polyphenols) in the blood. Moreover, supplementation of Yacon showed no hepatotoxic or nephrotoxic effect. The hypercholesterolemic diet increased the inflammatory process, evaluated through your markers, and extract administration has improved this parameter. Furthermore, supplementation with the root of Yacon controlled weight gain of animals. Thus, the results suggest that the lyophilized Yacon extract showed a hypoglycemic, hypolipemic and antioxidant activity, possibly due to its high content of phenolic compounds.

**Keywords:** Yacon, glycemia, antioxidant, blood lipids, oxidative stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Fontes e respostas celulares às espécies reativas (ER). .....	27
<b>Figura 2</b> – Espécies reativas de oxigênio (ERO) induzem dano oxidativo em lipídios, proteínas e DNA.....	30
<b>Figura 3</b> – Estrutura química geral das polifenóis.....	33
<b>Figura 4</b> - Folha Yacon.....	35
<b>Figura 5</b> – Raiz Yacon.....	35

### Manuscrito I

<b>Figura 1</b> – Biochemical profile of hypercholesterolemic rats supplemented with Yacon.. .....	61
<b>Figura 2</b> – Biochemical markers of liver and kidney function.....	62
<b>Figura 3</b> – Markers of cardiac damage in the hypercholesterolemic rats exposed to different treatments .....	63
<b>Figura 4</b> – Biomarkers of oxidative damage in hypercholesterolemic rats after treatment of Yacon extract.....	64
<b>Figura 5</b> – Antioxidant defenses markers in hypercholesterolemic rats after treatment of Yacon extract .....	65

### Manuscrito II

<b>Figura 1</b> – In vitro tests determined at different concentrations extract of Yacon leaves... .....	84
<b>Figura 2</b> – Effect of Yacon extract in hypercholesterolemic rats after treatment. ....	87
<b>Figura 3</b> – Biochemical markers of liver and kidney function.....	88
<b>Figura 4</b> – Markers of cardiac damage in the hypercholesterolemic rats exposed to different treatments. ....	89

<b>Figura 5</b> – Biomarkers of oxidative damage in hypercholesterolemic rats after treatment of Yacon extract.....	90
<b>Figura 6</b> – Antioxidant defenses markers in in hypercholesterolemic rats after treatment of Yacon extract.....	91

## LISTA DE TABELAS

### Manuscrito I

<b>Table 1</b> - Body weight of rats during the induction of hypercholesterolemia (weeks 1-4) and during treatment (weeks 5-6) with extract of Yacon root .....	59
<b>Table 2</b> - Hematological parameters of the hypercholesterolemic rats exposed to different treatments with extract of Yacon roots.....	60

### Manuscrito II

<b>Table 1</b> - Body weight of rats during the induction of hypercholesterolemia (weeks 1-4) and during treatment (weeks 5-6) with extract of Yacon leaves.....	85
<b>Table 2</b> - Hematological parameters of the hypercholesterolemic rats exposed to different treatments with extract of Yacon leaves.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ALT** - Alanina transaminase

**AST** - Aspartato transaminase

**Asc<sup>-</sup>** - Ascorbato

**ATP** - Adenosina trifosfato

**CAT** – Catalase

**CK-MB** – Creatino-quinase MB

**ClO<sup>-</sup>** - Hipoclorito

**CT** - Colesterol total

**Cu<sup>+</sup>** - Íons cobre

**DCV** - Doença cardiovascular

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**DPPH** - Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

**DNPH** - 2,4 Dinitrofenilhidrazina

**eNOS** - Óxido nítrico sintase endotelial

**ERO** - Espécies reativas de oxigênio

**ERN** - Espécies reativas de nitrogênio

**Fe<sup>2+</sup>** - Íons ferro

**FOS** - Frutooligossacarídeos

**GPx** - Glutationa peroxidase

**GR** – Glutationa redutase

**GSH** - Glutationa reduzida

**GSSG** – Glutationa oxidada

**LDH** – Lactato desidrogenase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio

**HAS** - Hipertensão arterial sistêmica

**HClO** - Ácido hipocloroso

**HDL** - Lipoproteína de alta densidade

**HMG-CoA redutase** - 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase

**HNO<sub>2</sub>** - Ácido nitroso

**IC** - Insuficiência cardíaca

**IDL** - Intermediário lipoproteína de baixa densidade

**IM** - Infarto do miocárdio

**IL-1** - interleucina-1

**LDL** - Lipoproteína de baixa densidade

**LDL-ox** - Lipoproteína de baixa densidade oxidada

**MDA** - Malondialdeído

**MM-LDL-ox** - Lipoproteína de baixa densidade minimamente oxidada

**LDL-R** - Receptor de LDL

**NADPH oxidase** - Nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato-oxidase

**N<sub>2</sub>O** - Óxido nitroso

**NO•** - Óxido nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** - Nitrito

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** - Nitrato

**NOS** - Óxido nítrico sintase

**O<sub>2</sub>** - Oxigênio singleto

**O<sub>2</sub><sup>-•</sup>** - Ânion superóxido

**OH•** - Radical hidroxila

**ONOO<sup>-</sup>** - Peroxinitrito

**PPO** - Polifenol oxidase

**RL** - Radicais livres

**RO•** - Radical alcoxila

**ROO•** - Radical peroxila

**SH** - Grupo sulfidril

**SOD** - superóxido dismutase

**STZ** - Estreptozotocina

**TG** - Triglicerídeos

**UPLC-DAD** - Cromatografia à líquido de ultra eficiência com detecção por arranjo de diodos

**VLDL** - Lipoproteína de muito baixa densidade



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 Doença Cardiovascular</b> .....	<b>22</b>
<i>2.1.1 Aterosclerose</i> .....	<b>22</b>
<b>2.2 Estresse Oxidativo</b> .....	<b>24</b>
<i>2.2.1 Dano Oxidativo a Biomoléculas</i> .....	<b>29</b>
<b>2.3. Defesas Antioxidantes</b> .....	<b>30</b>
<i>2.3.1 Sistema enzimático</i> .....	<b>30</b>
<i>2.3.2 Sistema Não Enzimático</i> .....	<b>31</b>
<b>2.4 Yacon</b> .....	<b>33</b>
<i>2.4.1 Origem</i> .....	<b>33</b>
<i>2.4.2 Aspectos Agronômicos</i> .....	<b>34</b>
<i>2.4.3. Composição Nutricional</i> .....	<b>36</b>
<i>2.4.4 Atividades Biológicas</i> .....	<b>37</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Geral</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Específicos</b> .....	<b>39</b>
<b>4. MANUSCRITO I</b> .....	<b>40</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>42</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>43</b>
<b>2. Materials and Methods</b> .....	<b>43</b>
<b>3. Results</b> .....	<b>47</b>
<b>4. Discussion</b> .....	<b>50</b>
<b>References</b> .....	<b>53</b>
<b>5. MANUSCRITO II</b> .....	<b>66</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>68</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>69</b>
<b>2. Materials and Methods</b> .....	<b>70</b>
<b>3. Results and Discussion</b> .....	<b>74</b>
<b>References</b> .....	<b>78</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>92</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>94</b>

<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>106</b>
<b>8.1 Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA.....</b>	<b>106</b>

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi dividida em três partes principais. Na **parte I** encontram-se a **INTRODUÇÃO**, o **REFERENCIAL TEÓRICO** e os **OBJETIVOS**. As seções **MATERIAL E MÉTODOS**, **RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** e as respectivas **REFERÊNCIAS** estão apresentadas sob a forma de manuscritos, os quais encontram-se nos itens **MANUSCRITO I** e **MANUSCRITO II**, compondo a **parte II** deste trabalho e representando a íntegra deste estudo. As seções **CONCLUSÃO**, **PERSPECTIVAS** e **REFERÊNCIAS** encontram-se na **parte III** desta dissertação, sendo que as referências referem-se somente às citações utilizadas na introdução e referencial teórico desta dissertação. As perspectivas correspondem aos possíveis estudos que podem ser realizados para dar continuidade a este trabalho.

## PARTE I

### 1 INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular (DCV) é a maior causa de morbimortalidade a nível mundial, sendo responsável por milhares de mortes a cada ano (HE et al., 2005; STRONG et al., 2005; NICHOLS et al., 2014). O Brasil acompanha este fenômeno internacional, apresentando estatísticas (MANSUR, & FAVARATO, 2012), pois segundo o Banco de Dados do Sistema Único de Saúde (DATASUS) a taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório foi de cerca de 335.213 só no ano de 2011, responsável por quase 30% das mortes no País (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

São vários os fatores de risco associados ao desenvolvimento das DCV como tabagismo, obesidade, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e dislipidemia (EZZATI et al., 2005; MOREIRA, et al., 2013). Porém a dislipidemia vem sendo apontada como a principal causa no desenvolvimento da aterosclerose (BERBEÉ et al., 2015). A dislipidemia ocorre da alteração do metabolismo lipídico e é caracterizada por altos níveis plasmáticos de colesterol total (CT), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TG), associados a baixas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (ASCASO et al., 2007).

Estudos apontam que o estresse oxidativo está envolvido na progressão de inúmeras patologias como diabetes mellitus (MANFREDINI et al., 2010), doenças neurodegenerativas (YAN et al., 2013), câncer (KAUR et al., 2013), no envelhecimento humano (SREENA et al., 2012) e também, nas doenças cardiovasculares (SCHWERTZ et al., 2012). O estresse oxidativo é consequência do desequilíbrio no estado redox do organismo, com a produção excessiva de radicais livres (RL) (HALLIWELL, 2006). Os RL são definidos como quaisquer espécies que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na última camada molecular (HALLIWELL 2011). Este elétron não emparelhado torna o RL altamente instável e muito reativo, sendo os derivados de oxigênio os representantes mais importantes das espécies de radicais gerados em sistemas vivos (VALKO et al., 2007).

Esses RL buscam a estabilidade através do emparelhamento de elétrons com biomoléculas resultando na oxidação de lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (FERREIRA et al., 2011).

Os antioxidantes são cruciais nesses processos, pois são moléculas que protegem o alvo biológico do dano oxidativo causado pelos RL (GOMATHI, 2013), e são classificados em enzimáticos, como a catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase

(SOD), e não enzimáticos, como glutathiona reduzida (GSH), vitamina E, vitamina A, vitamina C,  $\beta$ -caroteno, polifenóis, etc. (HALLIWELL, 2011).

O consumo de antioxidantes naturais vem sendo associado com redução da incidência de várias doenças (GOMATHI, 2012). Diante destas constatações, cresce o interesse pelo desenvolvimento e pesquisas de “novos produtos com propriedades funcionais”. Neste contexto, surge o Yacon (*Smallanthus sonchifolius*), que vem despertando interesse principalmente por suas propriedades medicinais, sendo utilizado popularmente como auxiliar no tratamento do diabetes (VILHENA et al., 2000).

Suas raízes tuberosas apresentam aspecto da batata doce, possuem gosto adoçado e polpa consistente, sendo muito consumidas na forma *in natura*, e as folhas são popularmente consumidas na forma de infusão (MARTINS et al., 2011). A ingestão do Yacon foi ignorada até por volta dos anos 80, quando foram descobertas particularidades em sua composição química que poderiam trazer benefícios à saúde humana. A raiz apresenta alto conteúdo de água e baixo valor calórico e, se caracteriza por possuir frutooligossacarídeos (FOS) como principal carboidrato de reserva diferenciando-se da maioria das espécies tuberosas que estocam energia na forma de amido. Esses FOS têm sido motivo de destaque por exercerem atividade bifidogênica (SANTANA & CARDOSO; 2008).

Além disso, estudos apontam que as propriedades benéficas do Yacon se devem à presença de antioxidantes e compostos fenólicos (OLIVEIRA et al., 2009), que embora sua concentração nas raízes seja alta, a concentração se apresenta ainda mais elevada em outros órgãos da planta, como as folhas e a cepa (ARNÃO et al., 2012). Estudos fitoquímicos confirmaram a presença de compostos fenólicos como ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido caféico, tanto nas folhas como nas raízes tuberosas de Yacon (SIMONOVSKA et al., 2003). Sendo assim, estudos que demonstrem os efeitos hipolipêmico e antioxidante *in vivo* dos extratos hidroalcoólicos da folha e raiz do Yacon são escassos na literatura internacional, o que justifica o desenvolvimento desta pesquisa.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Doença Cardiovascular

A doença cardiovascular (DCV) é considerada principal causa de morte no mundo (BERBEÉ et al., 2015). De acordo com a I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular os principais fatores de risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares são tabagismo, obesidade, hipertensão arterial sistêmica (HAS), *diabetes mellitus*, e dislipidemias. Além disso, outros fatores de risco vêm sendo associados com as DCV, como a concentração de homocisteína e de lipoproteína A no sangue, fibrinogênio, período pós menopausa, estresse oxidativo da LDL, e fatores psicossociais.

Existem vários tipos de lipoproteínas, tais como quilomícron, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), intermediária lipoproteína de baixa densidade (IDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL), todos desempenham funções diferentes. IDL forma um intermediário entre VLDL e LDL, o nível de IDL na prática é muito baixo. LDL é a forma mais relevante de lipoproteína encontrada na corrente sanguínea e tem como função transportar o colesterol do fígado para os tecidos periféricos (McLAREN et al., 2011) enquanto o HDL tem a função de coletar, esterificar e transportar o colesterol indesejado dos tecidos periféricos para excreção através do fígado, esse processo é conhecido como transporte reverso do colesterol, devido à essa função fundamental, o HDL é considerado um bom colesterol (WAN AHMAD et al., 2015).

O perfil lipídico, segundo V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose constitui na avaliação do colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e colesterol-HDL e cálculo do colesterol-LDL através da fórmula de Friedwald. A partir dos resultados destes parâmetros, pode-se estabelecer a classificação laboratorial das dislipidemias: hipercolesterolemia isolada, hipertrigliceridemia isolada, hiperlipidemia mista e colesterol-HDL baixo. As principais doenças cardiovasculares, incluem a aterosclerose, insuficiência cardíaca (IC), infarto do miocárdio (IM), e hipertrofia cardíaca (SCHIANO et al., 2015).

#### 2.1.1 Aterosclerose

Dentre as patologias pertencentes ao grupo das doenças cardiovasculares, a aterosclerose é indiscutivelmente, um problema de saúde pública no Brasil sendo responsável

por milhares de morte a cada ano (OLIVEIRA et al., 2010). É caracterizada por uma resposta inflamatória crônica da parede arterial em resposta a uma agressão endotelial, e possui caráter multifatorial, porém o papel das dislipidemias é fundamental na gênese da doença aterosclerótica, e nos consequentes riscos cardiovasculares e cerebrovasculares (DE SOUZA et al., 2003).

Dislipidemia aterogênica se caracteriza pela diminuição dos níveis de colesterol-HDL e pelo aumento de triglicerídeos e colesterol-LDL, que são menores e mais densos (PLANA et al., 2014). A abundância da LDL no plasma pode ser consequência de uma dieta não balanceada e rica em gorduras, da síntese endógena de colesterol ou mesmo pela redução do catabolismo da LDL pelo fígado, ocasionado por um defeito gênico que provoca deficiência na expressão ou na função dos seus receptores, resultando na hipercolesterolemia. Os sintomas da doença aterosclerótica frequentemente atingem as artérias que irrigam o coração, o cérebro, os rins, as extremidades e o intestino delgado. (CORRÊA-CAMACHO et al., 2007).

A palavra aterosclerose deriva do grego *atero*, que significa caldo ou pasta, e *esclerose*, que corresponde a endurecimento, assim o termo se refere ao espessamento da camada íntima das artérias pelo acúmulo de gordura na mesma (RAFIEIAN-KOPAEI et al., 2014).

Em adição à dislipidemia, o estresse oxidativo vem sendo associado com a progressão da aterosclerose (GRADINARU et al., 2015). Existem muitos indícios sobre o importante papel da lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDL-ox), na aterosclerose participando de todas as etapas do processo, desde a disfunção endotelial até a formação das placas ateroscleróticas (SIQUEIRA et al., 2006). A disfunção endotelial é caracterizada por uma redução da biodisponibilidade de vasodilatadores, em especial, o óxido nítrico (NO) (BONETTI et al., 2003). A LDL-ox tem vários efeitos biológicos; é pró-inflamatória, provoca a inibição da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), promove vasoconstrição e adesão, estimula citocinas tais como a interleucina-1 (IL-1) e aumenta a agregação plaquetária (BONOMINI et al., 2008).

Com a elevação dos níveis de LDL, essas partículas são depositadas nas artérias sendo oxidadas e formando a LDL-ox. A modificação oxidativa da LDL acontece na íntima do vaso e aparenta ocorrer em duas fases. Na primeira fase, ou fase inflamatória, os lipídeos da LDL sofrem oxidação, formando a LDL minimamente oxidada (MM-LDL-ox) não havendo grandes modificações, o colesterol ainda é o esterol predominante e apolipoproteína B ainda se liga ao receptor de LDL (LDL-R). Nesta fase, a MM-LDL-ox contribui para o estado inflamatório da parede vascular, pois estimula a produção de glicoproteínas que promovem a quimiotaxia de

monócitos circulantes (BONOMINI et al., 2008). Monócitos circulantes são componentes da imunidade inata, e muitas citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão facilitam a sua aderência e migração para a parede vascular endotelial (PAMUKCU et al., 2010).

Os monócitos penetram na parede vascular e diferenciam-se em macrófagos, sendo responsáveis pela conversão de MM-LDL-ox em LDL-ox caracterizando, assim, a segunda fase da modificação oxidativa da LDL. (ABDALLA & DE SENA, 2008). As LDL-ox passam a ser reconhecidas pelos receptores do tipo “scavenger” dos macrófagos, sendo captadas indiscriminadamente, levando ao acúmulo de colesterol nos macrófagos, formando assim, as células espumosas (DUARTE et al., 2008).

As células espumosas contribuem para resposta imune inata e adaptativa à aterosclerose, e também acumulam-se originando estrias gordurosas que é a lesão inicial da aterosclerose (McLAREN et al., 2011). As estrias levam à inflamação e espessamento da parede arterial. Essa lesão inicial pode progredir à medida que ocorrem ciclos de acúmulo de células mononucleares, migração e proliferação das células musculares lisas e formação de um tecido fibroso, formando assim uma capa fibrosa ao redor de um núcleo lipídico e de tecido necrótico, caracterizando a lesão avançada (ROSS, 1999). Essas placas ou estrias gordurosas frequentemente levam a obstrução das artérias, e são chamadas de ateromas. A formação de trombos é consequência do rompimento de placas (GOTTLIEB et al., 2005), sendo estes frequentemente os responsáveis pelos acidentes vasculares e pelos infartos, as consequências mais graves da aterosclerose (DUARTE et al., 2008).

Atualmente, as estatinas são uma das classes de medicamentos mais prescritas a nível mundial e a terapia leva a um decréscimo dos eventos cardiovasculares em 25% a 45%, sendo normalmente bem toleradas e os efeitos adversos são mínimos (JUKEMA et al., 2012). Originalmente descoberta na década de 1970, as estatinas inibem potencialmente a 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase), uma enzima chave na biossíntese do colesterol. Além da capacidade de reduzir os níveis de colesterol-LDL do plasma, as estatinas também podem atenuar diretamente na formação de células espumosas, captação de LDL-ox e no efluxo de colesterol (McLAREN et al., 2011).

## **2.2 Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e defesa antioxidante (HALLIWELL & WHITEMAN 2004)



A oxidação é parte fundamental da via aeróbica e do metabolismo e, assim, os RL são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. (BARREIROS et al., 2006). Segundo HALLIWELL (2011), RL é qualquer espécie capaz de existência independente, que contém um ou mais elétrons desemparelhados na última camada. Esses RL, cujo elétron não emparelhado se encontra centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO) de maior importância, ou espécies reativas de nitrogênio (ERN) (VALKO et al., 2006).

Os radicais são caracterizados por grande instabilidade e elevada reatividade e tendem ligar o elétron não-pareado, doando (redutores) ou retirando (oxidantes) elétrons a partir de outras moléculas próximas da sua formação (REIS et al., 2008 ; YOUNG & WOODSIDE, 2001).

Os mecanismos de geração de RL, acontecem principalmente nas mitocôndrias, podendo ocorrer também em membranas celulares e no citoplasma. Na mitocôndria, o oxigênio sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água. A enzima catalisadora dessa reação é a citocromo oxidase. Aproximadamente 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra rota metabólica, e reduzidos de forma univalente, originando os RL como o ânion superóxido (BARBOSA et al., 2010). Eles também podem derivar de fontes externas, tais como a exposição aos raios X, ozônio, tabagismo, álcool e produtos químicos industriais (OTUNOLA et al., 2014).

No organismo, a geração de RL está envolvida em processos fisiológicos importantes como a produção de energia via adenosina trifosfato (ATP), fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS et al., 2006). Porém em altas concentrações, essas espécies reativas (ER) podem conduzir ao estresse oxidativo resultando em dano oxidativo em macromoléculas celulares, incluindo DNA, proteínas e lipídios, podendo levar à morte celular subsequente. (GASPAROTTO et al., 2014). Devido à essa capacidade de oxidar diretamente biomoléculas, estudos vem demonstrando que o estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de várias patologias, entre elas o câncer, aterosclerose, doenças cardiovasculares e inflamatórias, diabetes, obesidade, doenças neurodegenerativas e também para o envelhecimento humano (BARBOSA et al., 2008; YOUNG & WOODSIDE, 2001).

As principais ERO dividem-se em dois grupos, os radicalares (com um ou mais elétrons desemparelhados): hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^{\bullet}$ ); e os não-radicalares: oxigênio ( $\text{O}_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ).

Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios (ARUOMA, 1998).

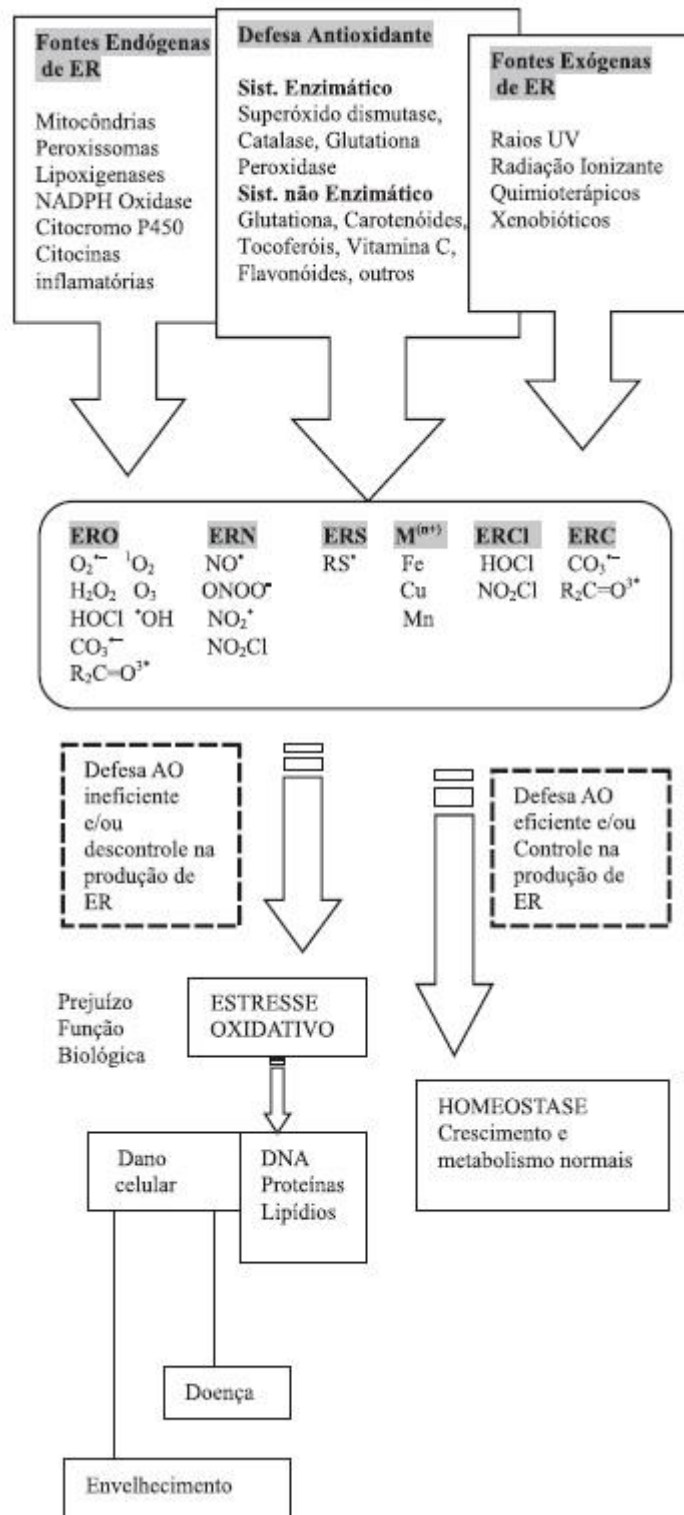


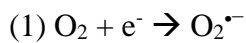
Figura 1 – Fontes e respostas celulares às Espécies Reativas (ER).

Fonte: Adaptado de VASCONCELOS et al., 2007.

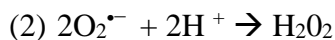
Muitos sistemas enzimáticos parecem ser importantes neste processo como a NADPH oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase, cicloxigenase, lipoxigenase e óxido nítrico sintase

(NOS) e, também contam com a participação dos íons ferro e de cobre (SILVA et al., 2011). Em resumo, estas enzimas utilizam vários substratos como fontes de elétrons que, posteriormente, reduzem o oxigênio molecular para formar uma variedade de ERO (CIPOLLONE et al., 2007).

A redução de um elétron de oxigênio leva à produção do radical  $O_2^{\bullet-}$  (Reação 1). O mecanismo importante pelo qual o  $O_2^{\bullet-}$  é tóxico para as células é de liberar o ferro necessário para a reação de Fenton. Outro mecanismo de destaque é a sua rápida reação com o  $NO^{\bullet}$  para gerar o não radical  $ONOO^-$ . (YOUNG & WOODSIDE, 2001.; HALLIWELL, 2012)

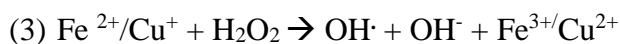


O radical  $O_2^{\bullet-}$  recebe íons de hidrogênio, formando  $H_2O_2$ , essa reação é catalisada pela enzima SOD (Reação 2). O  $H_2O_2$  é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o  $OH^{\bullet}$  (BARREIROS et al., 2006).

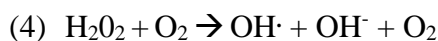


O radical  $OH^{\bullet}$  é gerado principalmente pela reação de  $H_2O_2$  com íons ferro ( $Fe^{2+}$ ) ou cobre ( $Cu^+$ ), reação é conhecida como Reação de Fenton (HALLIWELL, 2012) (Reação 3). O radical  $OH^{\bullet}$  por meio da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, desempenha importante papel na lipoperoxidação, sendo considerado o principal causador desse processo (HALLIWELL & CHIRICO, 1993).

O radical  $OH^{\bullet}$  é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser seqüestrado *in vivo* (BARREIROS et al., 2006).



Íons  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^+$  também podem catalisar a reação entre  $H_2O_2$  e  $O_2$  originando igualmente  $OH^{\bullet}$  essa reação é chamada de Haber-Weiss (Reação 4) (BARBOSA et al., 2010).



O produto da reação do radical  $O_2^{\cdot-}$  com NO é o ONOO<sup>-</sup> (Reação 5). O NO é lento em suas reações com a maioria das biomoléculas, mas muito reativo com os radicais livres, incluindo superóxido (HALLIWELL, 2012). NO é produzido por vários tipos de células (especialmente fagócitos e células endoteliais vasculares) atua sobre células do músculo liso nas paredes dos vasos para produzir relaxamento. Já o  $O_2^{\cdot-}$ , age em oposição ao NO pode atuar como um vasoconstritor, levando a efeitos nocivos em algumas circunstâncias clínicas (HALLIWELL & CHIRICO, 1993). O peroxinitrito é um poderoso agente oxidante e de nitração que pode danificar diretamente proteínas, lipídios e DNA (HALLIWELL, 2006).



### 2.2.1 Dano Oxidativo a Biomoléculas

A peroxidação lipídica é um processo complexo que envolve a interação de ERO com ácidos graxo poliinsaturados, o que resulta em uma grande variedade de aldeídos eletrófilos altamente reativos. O malondialdeído (MDA) é um dos principais subprodutos da lipoperoxidação (HALLIWELL & CHIRICO, 1993). Tem como resultado a alteração na fluidez e na permeabilidade da membrana (SHARMA et al., 2012). Já a carbonilação de proteínas é um tipo de oxidação proteica que pode ser mediada por ERO. Ela normalmente se refere a um processo que forma cetonas ou aldeídos reativos, nos quais são produzidos quando as cadeias laterais das proteínas são oxidadas, e estes podem reagir com 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas, produto detectável (STADTMAN & LEVINE, 2000). O aumento da susceptibilidade à proteólise e a inativação enzimática são algumas das principais consequências da oxidação proteica SHARMA et al., 2012).

Também pode ocorrer oxidação direta dos ácidos nucleicos, levando a dano no DNA pela quebra das cadeias ou por ligações cruzadas. Quando os mecanismos celulares essenciais são afetados pode levar a morte celular, ou mutações genômicas sendo transmitidas para as gerações futuras. Além disso, essas mutações podem gerar efeitos genotóxicos graves e, conseqüentemente, gerar instabilidade genômica e até aparecimento de câncer (BERRA & MENCK, 2006). Uma das formas de avaliar o dano no DNA é através da frequência de micronúcleos, que são cromossomos ou fragmentos de cromossomos que ficam para trás durante a anáfase e não estão incluídos no núcleo principal, sendo menores, porém morfológicamente semelhantes (SCHMID, 1975; MILIC et al., 2015).

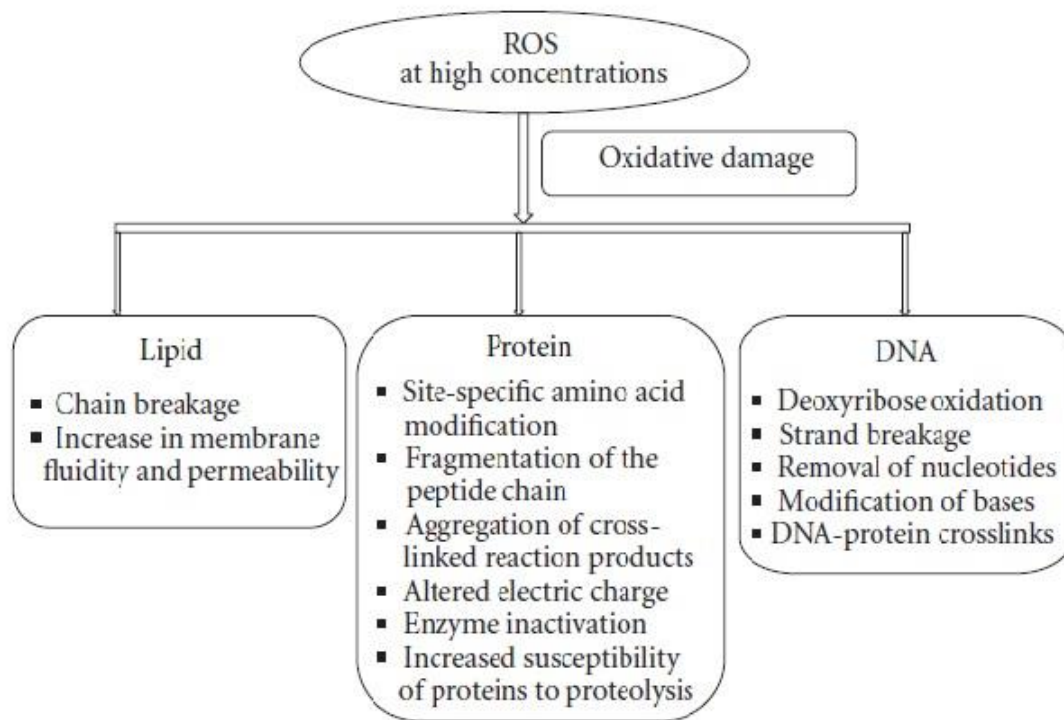


Figura 2 – Espécies reativas de oxigênio (ROS) induzem dano oxidativo em lipídios, proteínas e DNA.

Fonte: Adaptado de SHARMA et al., 2012.

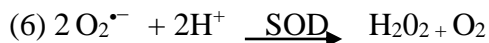
### 2.3. Defesas Antioxidantes

O excesso de RL no organismo é combatido por mecanismos de defesas antioxidantes que são produzidos *in vivo* ou absorvidos da dieta (Halliwell, 2008). Os antioxidantes impedem danos nos tecidos induzidos por RL prevenindo a formação desses radicais, através da atividade sequestradora ou promovendo a sua decomposição (YOUNG & WOODSIDE, 2001). Antioxidante é definido como qualquer substância que, quando presentes em baixas concentrações em comparação com as de um substrato oxidável, atrasa significativamente ou evita a oxidação do referido substrato. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). O sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático minimiza o efeito nocivo das ERO por vários mecanismos antioxidantes (SEN et al., 2010).

#### 2.3.1 Sistema enzimático

Dentre os antioxidantes enzimáticos mais importantes estão SOD, CAT e GPX (SHARMA et al., 2012). O sistema antioxidante enzimático e a GSH estão presentes, predominantemente, no meio intracelular, utilizando o eritrócito para sua análise. (VASCONCELOS et al., 2007).

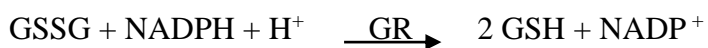
A SOD foi descoberta por MacCord e Fridovich em 1968, sendo identificada como a primeira enzima conhecida por atuar em um substrato de RL (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000). As principais formas de SOD encontradas em humanos são a Cu/ZnSOD localizada no citosol, e a MnSOD encontrada na mitocôndria (VASCONCELOS et al., 2007). A SOD é uma importante enzima antioxidante endógena atuando como o primeiro sistema de linha de defesa contra ERO, pois catalisa a dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  à  $H_2O_2$  e  $O_2$  (Reação 6) (SEN et al., 2010).



A CAT é uma enzima antioxidante localizada principalmente em peroxisomos celulares e citoplasma, e catalisa a conversão de  $H_2O_2$  a  $O_2$  e  $H_2O$  (Equação 7) (CHEN et al., 2012).



A GPx é uma das 25 classes conhecidas de selenoproteínas (BATTIN & BRUMAGHIM, 2009). Elas catalisam a redução de peróxidos em geral à água ou álcoois utilizando GSH como um doador de elétron sendo oxidada a dissulfeto da glutathiona (GSSG). Os elétrons podem ser regenerados através glutathiona redutase (GR) que promove a transferência de hidrogênio do NADPH (MARGIS et al., 2008)



### 2.3.2 Sistema Não Enzimático

O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a GSH, sintetizado no organismo, e os antioxidantes ingeridos pela dieta como, ascorbato, tocoferóis e compostos fenólicos (SHARMA et al., 2012). Sistema antioxidante não enzimático localiza-se, principalmente, no meio extracelular, sendo por isso analisado em plasma e soro (VASCONCELOS et al., 2007).

A GSH é um tripeptídeo ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), que existe no organismo em suas formas reduzida e oxidada, atuando direta ou indiretamente em muitos processos

biológicos importantes, (ROVER-JUNIOR et al., 2001), destacando-se na função de cofator da família de enzimas GPx, em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a GSSG. A GSH é o único tiol não proteico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de ERO, muitas das suas reações envolvem o grupo sulfidril (SH), que é altamente polarizável (HUBER et al., 2008).

Vitamina C (ácido ascórbico) é definida como o principal antioxidante hidrossolúvel que desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro contra o dano oxidativo (PUERTOLLANO et al., 2011). Em pH fisiológico nos sistemas biológicos, 99,95% da vitamina C encontra-se na forma de ascorbato ( $\text{Asc}^-$ ), que é a forma que atua como antioxidante, ao doar um  $\text{H}^\bullet$  ou  $[\text{H}^+ + \text{e}^-]$  para um radical. Atua eficientemente sobre o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ) e os radicais  $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{ROO}^\bullet$ . O  $\text{Asc}^-$  pode atuar diretamente nas membranas celulares, por impedir a iniciação da peroxidação lipídica ou indiretamente por regenerar a vitamina E, que atua como antioxidante na face lipofílica da membrana (VASCONCELOS et al., 2007).

A vitamina E é constituída, principalmente, por quatro tocoferóis, e secundariamente por quatro tocotrienóis, sendo o  $\alpha$ -tocoferol o mais ativo. A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel e um potente inibidor da peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas e lipoproteínas (BARREIROS et al., 2006). Estas substâncias agem como doadores de H para o radical  $\text{ROO}^\bullet$ , resultante com formação do radical tocoferila, que pode ser regenerado por outros antioxidantes como ascorbato, GSH e tocoferol (HAMID et al., 2010).

Os polifenóis ou compostos fenólicos são os antioxidantes mais abundantes na dieta. (SCALBERT et al., 2005). E são produtos do metabolismo secundário de plantas. A expressão "compostos fenólicos" se deve as substâncias que possuam um anel aromático tendo um ou mais substituinte hidroxila (Figura 3) (URQUIAGA & LEIGHTON, 2000). São divididos em várias classes diferentes sendo os flavonóides uma das mais importantes e diversificadas (GELEIJNSE & HOLLMAN, 2008).

Os flavonóides têm poderosas atividades antioxidantes *in vitro*, sendo capaz de inibir uma ampla variedade de ERO e ERN. Os flavonóides também podem quelar íons metálicos, diminuindo atividade pró-oxidante desses metais (HALLIWELL, 2008).



Estudos sugerem fortemente uma contribuição de polifenóis para a prevenção de várias doenças, entre elas está a capacidade de inibir a oxidação do LDL, mostrando um importante potencial na prevenção da aterosclerose (URQUIAGA & LEIGHTON, 2000).

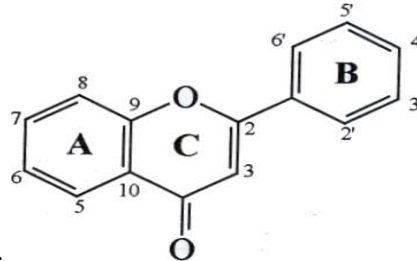


Figura 3 - Estrutura química geral das polifenóis apresentando anel aromático podendo ter um ou mais substituintes hidroxila.

Adaptado de: SIMÕES et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2007.

## 2.4 Yacon

### 2.4.1 Origem

O Yacon possui grandes raízes tuberosas, e é originário da região Andina, cultivada principalmente na Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e noroeste da Argentina. Nessa região, é cultivado desde a antiga civilização Inca, e utilizado como alimento e como planta medicinal para a população local. Também é conhecido como “llaqon”, “llacum”, “llacuma”, “yacumpi”, “aricoma”, “Chicama”, “jiquima” e “jiquimilla” nos Andes, além de poire de terre (francês) e Yacon strawberry (Estados Unidos) (OJANSIVU et al., 2011).

Essa planta pertence à família *Asteraceae* – também denominada de *Compositae* – e seu nome científico é *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson. Na literatura científica, também é utilizado *Polymnia sonchifolia* Poepp. & Endl. e *Polymnia edulis* Wedd (SANTANA & CARDOSO, 2008). É uma planta que cresce em 3500 metros de altitude, em uma faixa ideal de temperatura de 18 a 25 °C, não requer fertilizantes, pesticidas ou mais cuidados, estas facilidades permite o cultivo agrônômico em diferentes localidades (ARNÃO et al., 2012) tendo seu cultivo expandido para diversas regiões do mundo (Nova Zelândia, Japão, República Checa, Coreia do Sul, Tailândia, Filipinas, Rússia, Estônia, Eslováquia, China, Taiwan, dentre outros) (BORGES, et al., 2012). No Brasil, a espécie foi introduzida por volta de 1989, na região de Capão Bonito (SP), por imigrantes japoneses, que utilizam suas folhas e raízes tuberosas (OLIVEIRA et al., 2009).

#### 2.4.2 Aspectos Agronômicos

O Yacon é uma espécie do tipo perene, cujos caules aéreos são cilíndricos, de coloração esverdeada, apresentam pilosidade em toda superfície, e chegam a medir até 2 a 3 m de altura. A planta apresenta eixos aéreos, com folhas (Figura 4) e gemas vegetativas e florais (DUARTE et al., 2008). O sistema subterrâneo é constituído de três partes distintas: os rizóforos que são ricos em frutanos e fibras não digeríveis, dos quais originam-se gemas que darão origem a uma nova planta; as raízes de absorção e fixação; e as raízes tuberosas ou de reserva, também ricas em frutanos, porém menos fibrosas, mais suculentas, translúcidas (VILHENA et al., 2000).

Por ter sabor doce na parte comestível é considerado um fruto, porém um estudo anatômico realizado por Machado e seus colaboradores em 2004 demonstrou que a organização do sistema vascular desta planta é típica de raiz, e com isso justifica-se apenas a utilização do termo raiz tuberosa (Figura 5).



Figura 4- Folhas do Yacon

Fonte: o autor



Figura 5- Raízes do Yacon

Fonte: o autor

Estudos têm demonstrado que o melhor período para a colheita de Yacon em regiões tropicais é entre 31 e 35 semanas após o cultivo, devido à uma maior quantidade de frutanos (OLIVEIRA & NISHIMOTO, 2004).

Em vários países existe uma grande variedade de produtos derivados das raízes de Yacon, como farinha, produtos desidratados, fatias ou "Chips", chá (folhas secas), sucos, purês e adoçantes na forma de xarope com um alto teor de FOS (DELGADO et al., 2013).

Durante o processamento destes produtos, é preciso controlar o escurecimento enzimático que está relacionada com a oxidação de compostos fenólicos principalmente pela enzima polifenol oxidase (PPO), sendo este, o maior responsável pela perda da qualidade do produto, atualmente as principais alternativas para contornar esse problema é por tratamento térmico, uso de antioxidantes ou ambos (NEVES & SILVA, 2007). A desidratação é o mais indicado, sendo realizada o mais rápido possível após a colheita (SCHER et al., 2009).

#### *2.4.3. Composição Nutricional*

As raízes tuberosas vêm sendo consideradas um alimento funcional devido à grande quantidade de frutanos (inulina e frutooligossacarídeos) (MOURA et al., 2012). Alimentos funcionais, são aqueles que podem contribuir para a manutenção da saúde além de desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças (MORAES & COLLA 2006).

As raízes tuberosas do Yacon podem pesar de 0,1 a 2 Kg cada, sendo composto principalmente por água e carboidratos. O conteúdo de água geralmente excede 70% do peso fresco. Na matéria seca das raízes o principal componente (40 a 70%) é FOS, que são polímeros curtos de frutose com uma polimerização de 3 a 10 frutanos, diferentemente da maioria das outras raízes tuberosas no qual o principal carboidrato de reserva é o amido (OJANSIVU et al., 2011). A inulina é diferente dos FOS, pois apresenta longas cadeias, é menos solúvel e pouco doce (DA SILVA et al., 2007).

Os FOS são designados como fibras alimentares solúveis e prebióticos, (BORGES et al., 2012). Prébióticos foi definido por Gibson e Roberfroid (1995) como "Ingredientes nutricionais não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado bactérias benéficas do cólon, melhorando a saúde do seu hospedeiro".

Um estudo demonstrou que o conteúdo de carboidratos em 1 g de Yacon é de 750 mg sendo que 58% desses carboidratos são FOS, 24,7% frutose, 8,5% glicose e 7,6% de sacarose (GENTA et al., 2005).

Os FOS, vem despertando interesse devido à presença das ligações  $\beta - (2 \rightarrow 1)$  e à ausência de enzimas capazes de quebrar essas ligações em humanos, resistem à hidrólise das

enzimas digestivas sendo fermentados no cólon (TEIXEIRA et al., 2009). Esse processo fermentativo leva estímulo seletivo do crescimento e atividade de bactérias não patogênicas produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) que podem interferir no metabolismo lipídico (ROLIM et al., 2010). Estudo demonstrou seletividade por bifidobactérias e lactobacilos (CAMPOS et al., 2012)

Em geral, os FOS têm sido relacionados a efeitos benéficos na saúde humana, como baixo valor energético, aumento da absorção de minerais como cálcio, magnésio e ferro, inibição dos estágios iniciais do câncer de colón, e também redução de lipídios plasmáticos (COUNDRAY et al., 2003; MARTINS et al., 2011). Um dos mecanismos possíveis para explicar a redução de lipídios, é que esses compostos reduzam a absorção intestinal do colesterol (ROSELINO et al., 2012).

#### 2.4.4 Atividades Biológicas

O Yacon possui várias atividades biológicas descritas. Estudos desenvolvidos por Genta et al. (2005) analisou os efeitos subcrônicos (4 meses) do consumo da raiz de Yacon em ratos normais, duas doses diárias foram utilizadas equivalente a 340 e 6800 mg FOS/ peso corporal, não havendo resposta negativa, toxicidade ou efeitos adversos nessas doses, apenas foi observado hipertrofia do ceco nos animais que receberam a maior dose. Outro estudo realizado por Genta et al. (2009) avaliou o consumo diário de xarope do Yacon em mulheres dislipidêmicas e obesas na pré-menopausa, esse xarope é obtido pela concentração do suco de raízes de Yacon, suas características físicas e sensoriais são semelhantes aos de mel. Nesse estudo, observou-se que o consumo diário recomendado do xarope do Yacon é de 0.14 g FOS/kg, havendo decréscimo no peso corporal, aumento da frequência de defecação, sensação de saciedade e melhora na resistência à insulina desses pacientes.

Um estudo realizado por Honoré et al. (2012) verificou que a decocção das folhas do Yacon (10%) administradas uma vez ao dia por 4 semanas em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, apresentou efeito protetor contra a lesão renal na nefropatia diabética, além de diminuir a glicose plasmática e melhorar a produção de insulina.

Na medicina popular, raízes tuberosas do Yacon são consumidas *in natura* ou cozidas e as folhas secas são consumidos na forma de infusão por pessoas diabéticas, com distúrbios do colesterol, digestivos ou renais (VALENTOVÁ et al., 2006).

Além disso, o Yacon é rico em compostos fenólicos, estudos fitoquímicos com a raiz e suas folhas demonstraram que os principais compostos antioxidantes presentes são o ácido

clorogênico, ferúlico, caféico e triptofano (SIMONOVSKA et al., 2003; TAKENAKA et al., 2003; ARNÃO et al., 2012). O conteúdo de compostos varia de acordo com o tipo de extração (VALENTOVÁ et al., 2003).

Devido ao exposto acima, o Yacon vem sendo considerado um alimento com múltiplas funções, uma vez que possui compostos bioativos que apresenta atividade antimicrobiana, antidiabética, antioxidante e prebiótica (PAULA et al., 2015).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar os efeitos hipolipêmico e antioxidante *in vivo* dos extratos hidroalcoólicos da folha e raiz do Yacon (*Smallanthus sonchifolius*).

#### 3.1 Específicos

- Obter o extrato liofilizado das folhas e raízes de *Smallanthus sonchifolius*;
- Obter o perfil antioxidante *in vitro* do extrato da folha e raiz do Yacon através do radical DPPH, e conteúdo de polifenóis totais;
- Realizar a análise hematológica e contagem total de plaquetas;
- Traçar o perfil glicêmico e lipídico (colesterol total e frações e triglicerídeos), antes e após 14 dias de suplementação;
- Determinar marcadores de função hepática, renal e cardíaca;
- Determinar os níveis da homocisteína;
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes em eritrócitos: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx);
- Obter os níveis de vitamina C, GSH e polifenóis;
- Determinar o dano oxidativo em proteínas, lipídios e no material genético.

## PARTE II

### 4. MANUSCRITO I

**Supplementation with the Yacon root extract (*Smallanthus sonchifolius*) improves lipid, glycemic profile and antioxidant parameters in Wistar rats hypercholesterolemic.**

Patrícia Martinez Oliveira, Ritiele P. Coelho, Bruna C. Pilar, Alessandra M Golke, Angélica A Güllich, Vanusa Manfredini.

Em fase de preparação para submissão na revista Clinical Nutrition





**Supplementation with the Yacon root extract (*Smallanthus sonchifolius*) improves lipid, glycemic profile and antioxidant parameters in Wistar rats hypercholesterolemic.**

Patrícia Martinez Oliveira<sup>a</sup>, Ritiele P. Coelho<sup>a</sup>, Bruna C. Pilar<sup>a</sup>, Alessandra M Golke<sup>a</sup>,  
Angélica A Güllich<sup>a</sup>, Vanusa Manfredini<sup>a, b, \*</sup>.

Affiliation

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>b</sup> Course of Pharmacy, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

\* To whom correspondence should be addressed: Vanusa Manfredini, Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana, BR 472, Km 585, Uruguaiana, RS, Brazil, CEP: 97500-970. Tel.: 5555 3413-4321. Fax: 55553414-1484

E-mail address: [vanusamanfredini@unipampa.edu.br](mailto:vanusamanfredini@unipampa.edu.br)

## Abstract

**Background / Objectives:** Cardiovascular diseases (CVD) are the leading cause of death worldwide, and dyslipidemia is one of the main risk factor. Feeding is recognized as the most important intervention in the prevention of pathologies. A food which has been highlighted is the Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) a tuberous root that has large amounts of fructooligosaccharides (FOS) and polyphenols, substances that can bring benefits to human health. The aim of this study was to evaluate the hypolipemic and antioxidant effects *in vivo* of the Yacon roots extract.

**Methods:** For this study it were used male wistar rats, divided into 7 groups of 6 rats each: G1: normal diet (NaCl 0,9%); G2: hypercaloric diet (control) (NaCl 0,9%); G3: oral suspension of simvastatin 10 mg/Kg (SIM); G4: Yacon extract 20mg/Kg (YE20); G5: Yacon extract 40mg/Kg (YE40); G6: YE20 + SIM; G7: YE40 + SIM. The lyophilized extracts were administered once daily by gavage for 14 consecutive days. The hematological and biochemical parameters of oxidative stress were determined by classical methodologies. The extract administration (40 mg / kg) of the Yacon root improved lipid and glycemic profile, decreased weight gain and levels of cardiac markers (CK, CK-MB, LDH, homocysteine). It also showed a decrease in lipid peroxidation, protein carbonyls, and frequency of micronucleus, as well as an increase in antioxidant defenses (CAT, SOD, GPx, GSH, vitamin C, polyphenols) in the blood. Moreover, supplementation of Yacon showed no hepatotoxic or nephrotoxic effect during the study period.

**Conclusions:** The results suggest that the lyophilized Yacon roots extract has hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant activity, showing a promising food.

**Keywords:** Yacon, root, lipid profile, glycemia, antioxidant.

## 1. Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is considered the main cause of death worldwide. Dyslipidemia is a major risk factor for the development of atherosclerosis, the main cause of CVD [1].

Feeding is recognized as the most important intervention in the prevention of diseases and plants are considered the best source of natural antioxidants. Among them, a functional food that has been highlighted due to its medicinal properties is the Yacon, a tuberous root, originated from Andean regions, which has been used in folk medicine as an aid in the treatment of type 2 diabetes [2].

Yacon has fructooligosaccharides (FOS) as its main reserve of carbohydrate, which have links  $\beta$  - (2  $\rightarrow$  1) resisting the hydrolysis of digestive enzymes and fermented in the colon. In general, the FOS have been linked to beneficial effects on human health. In addition to the FOS and other compounds, Yacon presents significant amount of polyphenols in leaves and roots [3].

Studies have shown that the Yacon roots have hypoglycemic activity [4], however little is known about other properties. Thus, the objective of this study was to investigate the hypolipidemic and antioxidant effects of Yacon root hydroalcoholic extract (*Smallanthus sonchifolius*) in rats with hypercholesterolemia.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Chemicals

All the chemicals were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and of analytical grade. Solvents for UPLC analysis were purchased from Tedia Company (OH, EUA).

### 2.2. Sample plant

The Yacon roots were provided by the Emater/RS, and cultivated in a property in Alegrete/RS. The roots were duly transported fresh to Uruguaiana/RS, Brazil, where they were processed immediately.

### 2.3 Preparation of the extract

The Yacon root hydroalcoholic extract, obtained from 70% ethanol (v / v). The roots were washed, peeled and dried at 37 ° C for 72 hours and placed in contact with the solvent for 7 days in the dark, according to a slightly modified method previously described by Baroni et al. [5]. After the extract was filtered and concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator at 40 °C, and the remaining water portion was lyophilized. The lyophilized was stored at -70 °C until further use.

### 2.4 Phytochemical analysis

Ultra-performance liquid chromatography with diode array detection (UPLC-DAD) was performed to evaluate the main components of the Yacon. The chemical reference substances used in this study were rutin hexahydrate, quercetin, kaempferol, gallic acid, gallo catechin, epicatechin, luteolin, gallic acid and chlorogenic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis/EUA).

### 2.5 Animal Experimentation

For this study it was used male Wistar rats (60-65 g), 30 days old, obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. During treatment, rats were housed at a constant room temperature, humidity, and light cycle (12:12h light-dark), free access to tap water and fed with standard chow *ad libitum*.

### 2.6 Ethical issues

All experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology and approved by the Ethics Committee on Animal Use Experimentation of the Federal University of Pampa, CEUA, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil (Protocol 034/2013).

### 2.7 Preparation of feed and Induction of hypercholesterolemia

The rats had free access to water and a hypercholesterolemic diet for 30 days as described by Fietz and Salgado [6].

After 30 days of induction, blood samples were collected (puncture in the rat tail), before the start of experiments to confirm hypercholesterolemia, and then initiating treatment with the extracts. After inducing hypercholesterolemia, the groups continued to receive the same diet until the end of the experiment.

## 2.8 Experimental Design

Forty-two rats were divided into 7 groups of 6 animals each: Group 1 (normal diet) and group 2 (hypercaloric diet control) received saline at a dose of 1 ml, group 3: oral suspension of simvastatin 10 mg/kg (SIM), group 4: Yacon extract 20 mg/kg (YE20), group 5: Yacon extract 40 mg/kg (YE50), group 6: Yacon extract 20 mg/kg and simvastatin 10 mg/kg (YE20+SIM), group 7: Yacon extract 40 mg/kg and simvastatin 10 mg/kg (YE40+SIM). All treatments were administered daily by gavage. Only G1 received normal diet, while the other groups received hypercholesterolemic diet until the end of the experiment.

Body weight registration of the animals was performed during all experimental period.

## 2.9 Yacon extract prepare and administration

The Yacon-based solution was obtained by the dissolution of the lyophilized extract in water. The solutions were daily prepared immediately before the administration. The extracts were administered by gavage for 14 consecutive days. Animals were euthanized 24 h after the last treatment, in fasting, to obtain the whole blood.

## 2.10 Parameters analyzed

### 2.10.1 Evaluation of antioxidant potential from Yacon extract *in vitro*

The antioxidant activity *in vitro* was determined by the classical method of DPPH and content of total polyphenols was measured in six different concentrations (0,05mg/mL, 0,10 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, 1,0 mg/mL, 2,0 mg/mL) of the extract.

#### 2.10.1.1 Determination of total polyphenols content

The concentration of total polyphenols in Yacon extract was measured spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu [7], with modifications. Briefly, 125  $\mu$ L of 1 N Folin-Ciocalteu reagent was added to a 125  $\mu$ L of sample, and this mixture was allowed to stand for 6 min before the addition of 1,25 mL of 7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The solution was then allowed to stand for 90 minutes before reading at 760 nm in Spectrophotometer (UV-1800 Shimadzu, Japan).

The standard curve of gallic acid was prepared in the same manner and total polyphenolic content was expressed in milligram of gallic acid equivalent per milliliter (mg

GAE mL<sup>-1</sup>). The equation obtained for standard curve of gallic acid in the range of 0.001 – 0.020 mg/mL was  $y = 40.112x + 0.0581$  ( $R^2 = 0.9994$ ).

#### 2.10.1.2 DPPH radical scavenging activity

The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging activity of Yacon extract was determined as described by Sharma and Bhat [8]. The DPPH radical solution (50 $\mu$ L) was dissolved in methanol and added to a medium containing Yacon extract at different concentrations. The medium was incubated at room temperature for 30 min. The decrease in absorbance was measured at 517 nm, which depicted the scavenging activity of Yacon extract against DPPH. The DPPH scavenging capacity of the compound was calculated as

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = 100 - [(ABS_{\text{SAMPLE}} - ABS_{\text{BLANK}}) / ABS_{\text{CONTROL}}] \times 100$$

Where,  $ABS_{\text{SAMPLE}}$  is the absorbance of the test compound,  $ABS_{\text{BLANK}}$  is the absorbance of the blank and  $ABS_{\text{CONTROL}}$  is the absorbance of the control reaction. IC<sub>50</sub> value (concentration of sample where absorbance of DPPH decreases 50% with respect to absorbance of blank) of the sample was determined. Ascorbic acid was used as positive control.

#### 2.10.2 Evaluation of Yacon extract *in vivo*

##### 2.10.2.1 Biochemical and hematological analysis

The hemograms (complete blood count) were determined using an automated hematology analyzer Cell-Dyn 3200 (Abbott Diagnostic, Abbot Park, IL, USA). Total cholesterol, HDL-cholesterol, triacylglycerol total, and glucose levels were carried out using automatic analyzer A-25 Biosystems (Biosystems SA, Barcelona, Spain) for *in vitro* diagnostics. LDL cholesterol values were computed according to the Friedewald formula.

Enzymatic markers for liver function (aspartate transaminase - AST, alanine transaminase - ALT), renal (creatinine, uric acid) and heart (creatine kinase - CK, its isoform CK-MB and lactate dehydrogenase - LDH) were determined by automated equipment (A25 Biosystem) for *in vitro* diagnostics. Homocystein levels were measured by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS), according to Nelson *et al.* [9]. All biochemical assays were carried out in triplicate.

##### 2.10.2.2 Evaluation of oxidative stress parameters

#### 2.10.2.2.1 *Oxidative damage*

The oxidative parameters, lipid peroxidation [10] and protein carbonyls [11] in plasma were measured using spectrophotometric methods. The assessment of DNA damage was made by frequency of micronucleus [12] in leukocytes.

#### 2.10.2.3.2 *Antioxidants defenses*

The levels of polyphenols [7], vitamin C [13] in plasma were quantified by spectrophotometry.

The levels of reduced glutathione (GSH) [14], the activity of superoxide dismutase (SOD) (kit RANSOD - RANDOX Brasil LTDA), catalase (CAT)[15] and glutathione peroxidase (kit RANSEL - RANDOX Brasil LTDA) were determined in erythrocytes. All assays were carried out in triplicate.

### 2.11 *Statistical Analysis*

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Comparisons between groups were performed using two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's Multiple Comparison test for *post hoc* analysis. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . The statistical analysis was performed using GraphPad Prism (version 5.0, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1 *Totals Polyphenols content*

It was observed that the content of total phenolic in Yacon root hydroalcoholic extract ranged from 0,087 a 16,49 mg GAE/mL, showing dose-dependent behavior.

### 3.2 *DPPH assay*

The Yacon root extract obtained a percentage of inhibition of 12.20% to 77,67% against the DPPH radical.

### 3.3 *Phytochemical analysis*

Analyzing the spectral profiles of the major peaks in the chromatogram it was observed compounds with characteristics of flavonoids and phenolic acids.

### *3.4 Effects of YE on body weight gain*

At the end of the experiment, all groups showed body weight gain. In G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 weight gain was 33%, 91%; 43%; 46%; 40%; 38%; 34% respectively. In G6, G7 there was a small reduction in body weight at week 6. Results are shown in **Table 01**.

### *3.5. Effect of the YE treatment on Hematological Profile*

Table 02 shows that after 14 days of supplementation, there was a significant decrease in the number of leukocytes in all groups treated with the Yacon extract (G4, G5, G6, G7) when compared to the control group (G2), whereas the groups that received the extract at the highest dose with or without simvastatin (G5, G7) had the greatest reduction. There was a statistically significant difference in monocyte count in the control group (G2) compared to other groups.

The same happened to platelet count, the groups that received supplementation showed the number of platelets significantly lower ( $p < 0.05$ ) compared to the control group (G2).

The other parameters evaluated were not significant.

## **TABLE 2**

### *3.6 Effect of the YE treatment on Biochemical Profile*

#### *3.6.1 Lipid and glycemie profiles*

There was a significant decrease ( $p < 0,05$ ) in plasma glucose in groups G5, G6, G7 in relation to the control group (G2) (Figure 01A).

After 14 days of extract administration there was a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the total of serum cholesterol levels (Figure 01B), triacylglycerol levels (Figure 01C), LDL cholesterol levels (Figure 01D), as well as increase significant ( $p < 0.05$ ) of HDL-cholesterol levels (Figure 01E) in relation to the control group (G2).

## **FIGURE 1**

#### *3.6.2 Markers of renal and hepatic function*



Serum biochemical markers that evaluated hepatic function (Figure 02A, 02B) and renal (Figure 02C, 02D) of the animals, are within normal limits. There were no significant differences ( $p < 0.05$ ) in these parameters.

## FIGURE 2

### 3.6.3 Markers of cardiac damage

The hypercholesterolemic diet induced an increase in CK, CK-MB, homocysteine and LDH in the control group (G2). The groups receiving Yacon extract showed a decrease ( $p < 0.05$ ) in the levels of these markers when compared with G2 and the groups receiving the extract associated with simvastatin (G6, G7), they obtained a greater reduction of these levels. Results shown in Figure 03 A, B, C and D.

## FIGURE 3

### 3.7. Evaluation of oxidative stress parameters

#### 3.7.1 Oxidative damage

Figure 04A shows the results of lipid peroxidation and Figure 04B shows carbonylation of proteins. The groups receiving Yacon extract showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the levels of MDA and oxidation of the protein in relation to G2.

Figure 04C shows the frequency of micronucleus in peripheral blood leukocytes. The results showed that G2 had a higher frequency of micronucleus compared with other groups ( $p < 0.05$ ).

## FIGURE 4

#### 3.7.2 Antioxidants defenses

Figure 05 shows the results of the biomarkers of antioxidant defenses.

Figures 05A, B, and C, show the results of SOD, CAT, GPx. There was a significant increase ( $p < 0.05$ ) of activity on these enzymes in the groups treated with Yacon extract compared to G2.

It is possible to observe in Figure 5 D, E and F an increase in GSH, polyphenols and vitamin C levels in the groups treated with Yacon.

## FIGURE 5

#### 4. Discussion

Atherosclerosis is the major cause of cardiovascular disease [1]. Studies have shown that atherosclerosis is a consequence of hyperlipidemia and lipid oxidation and good control of dyslipidemia is crucial in the prevention of CVD [16].

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) has been considered a food with multiple functions, since it has bioactive compounds that may have beneficial effects on human health [17]. Most of the benefits of consuming Yacon, have been attributed to its content of phenolic compounds, antioxidants and prebiotics (FOS) [3].

There was a small weight gain in animals supplemented with the Yacon root compared to G2, it was also observed by Genta et al. [18] which evaluated daily consumption of Yacon syrup in dyslipidemic and obese premenopausal women, there was a decrease in body weight of these patients, suggesting that this effect is due to the high content of FOS, which may modulate the production of gastrointestinal peptides, leading to suppression of glucagon secretion, delay gastric emptying and regulate food intake.

Studies have shown that inflammation plays a major role in the pathogenesis of atherosclerosis, and platelets, which are formed in response to inflammation, they are responsible for the occurrence of atherothrombotic events, both determinants of CVD [19]. This study demonstrated that there was a decrease in the total leukocyte count and platelet counts in hypercholesterolemic rats receiving the Yacon extract. There was a statistically significant difference in the monocyte count in G2 in relation to the groups supplemented with Yacon. Monocytes are cells extremely involved in the atherosclerotic lesion process, as they accumulate lipids forming foam cells rich in cholesterol, and they may also promote the growth of atherosclerotic plaques [20]. Therefore, these results showed that administration of Yacon extract in hypercholesterolemic rats reduced the inflammation and thrombotic complications, consequently the risk of developing atherosclerosis.

Plasma glucose levels were elevated in G2. Supplementation with Yacon decreased these levels, and the groups associated with simvastatin evidenced a greater reduction ( $p < 0.05$ ).

This study demonstrated that the administration of Yacon root extract in hypercholesterolemic rats could improve lipid and glucose profile. These findings corroborate with a study by Oliveira et al. [21], which evaluated the effect of aqueous extract of Yacon roots in healthy and diabetic rats at 7-day intervals, for 30 days and it was observed a decrease in the levels ( $p < 0.05$ ) of blood glucose, total cholesterol, VLDL-C (very low-density lipoprotein), LDL-C and triacylglycerol in the diabetic rats. Another study by Habib et al. [22] analyzed the

beneficial effects of subchronic oral consumption Yacon root flour as a diet supplement in diabetic Wistar rats. There was a significant decrease in plasma levels of triacylglycerol and VLDL.

The analysis of serum biochemical markers that evaluated the renal and hepatic function of the animals demonstrated, during the study period, that this extract is not hepatotoxic and nephrotoxic.

CK, CK-MB, homocysteine and LDH are biomarkers of heart disease and are associated with increased risk of atherothrombotic events [23,24,25]. The results of the study showed that the hypercholesterolemic diet induced a significant increase ( $p < 0.05$ ) in the levels of these markers in the control group (G2). The groups receiving Yacon extract evidenced a decrease ( $p < 0.05$ ) in the levels of these markers, not only when compared to G2 (hypercaloric diet), but also in relation to G1, and the groups which received the extract associated with simvastatin (G6, G7) obtained a greater reduction of these levels. The reduction in the levels of cardiac markers in the groups treated with the Yacon extract indicates a probable reversal of damage caused by the hypercaloric diet.

Oxidative stress has been associated with the progression of numerous pathologies, including CVD, and occurs when there is an imbalance in redox status of the organism, producing an excess of free radicals (FR). These FR oxidize biomolecules [26]. The results show that in the control group (G2), there was a significant increase in the content of protein carbonyls in the levels of lipid peroxidation and frequency of micronucleus. Groups (G4, G5, G6, G7) which received the Yacon extract showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in protein oxidation levels compared to G2, and groups (G4, G6) which received the lowest dose of the extract with or without simvastatin showed better results, being similar to the G1.

It has also been observed in the evaluation of the levels of lipid peroxidation that the groups treated with Yacon extract demonstrated significant decreases ( $p < 0.05$ ) in MDA levels in plasma, when compared to the G2, and the groups (G4, G5) which were not associated to simvastatin showed the greatest decrease in these levels. Assessing the frequency of micronucleus, it was observed that all the groups supplemented with Yacon had a decrease in the frequency of micronuclei while G4 and G7 obtained values similar to the healthy group (G1).

The body has a system of antioxidant defense against reactive species. These are molecules that protect the biological target from the oxidative damage and may be classified as enzymatic and non-enzymatic [27]. The antioxidant enzymes SOD, GPx, CAT, demonstrated low activity in G2. However SOD and GPx activity increased significantly ( $p < 0.05$ ) in the

supplemented groups with Yacon, similar to the G1. The catalase activity also demonstrated a significant increase compared to G2. A study by Habib et al. [28] evaluated the antioxidant activity of Yacon using a model of streptozotocin-induced diabetic rats, and supplemented with Yacon root flour for 90 days, oxidative stress markers were measured in homogenates of liver and kidney, there was a high antioxidant activity *in vivo* through its markers (CAT, SOD, GPx and GSH) as well as a reduction in lipid peroxidation in both organs.

After supplementation for 14 consecutive days, the groups treated with Yacon extract showed high levels of GSH, significant increase in the levels of ascorbic acid when compared to G2 and similar to the healthy group (G1). Plasma polyphenol levels also increased significantly compared to G2, and G7 was similar to G1. These results show that supplementation of the Yacon has the ability to enhance antioxidant defenses in hypercholesterolemic rats. This study shows for the first time that supplementation of Yacon root extract improves biochemical parameters and oxidative stress in hypercholesterolemic rats. It also demonstrated that the Yacon root extract has high antioxidant activity *in vitro*, which may be related to the large amount of phenolic compounds. Since the majority of root compounds have characteristics of flavonoids and phenolic acids, however, none of the compounds showed retention time or spectral profile of the standards used. These results differ from those presented by Simonovska et al. [29] and Campos et al. [3] demonstrating the presence of caffeic acid, ferulic acid, quercetin, among others. The different forms used in the extraction studies or the origin of the plant material can explain this.

In conclusion, the results indicate that supplementation with Yacon roots extract in hypercholesterolemic rats improved the glycemic and lipid profile, offered protection against heart damage and showed no hepatotoxicity and nephrotoxicity. This study also showed a reduction in inflammation, oxidative damage to biomolecules, and an increase in the antioxidant defenses in the groups treated with Yacon. Thus, supplementation with Yacon root is a promising alternative in the treatment of dyslipidemia.

#### Ethical standards

This study are approved by the Ethics Committee on Animal Use Experimentation of the Federal University of Pampa, CEUA, Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil (Protocol 034/2013).

#### Conflictofinterest

The authors declare that they have no conflict of interest

## References

1. Angelovich TA, Hearps AC, Jaworowski A (2015) Inflammation-induced foam cell formation in chronic inflammatory disease. *Immunology and Cell Biology* doi:10.1038/icb.2015.26.
2. Delgado GT, Tamashiro WM, Maróstica Junior MR, Pastore GM (2013) Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a functional food. *Plant foods for human nutrition* 68(3):222-228. doi: 10.1007/s11130-013-0362-0.
3. Campos D, Betalleluz-Pallardel I, Chirinos R, Aguilar-Galvez A, Noratto G, Pedreschi R (2012) Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry* 135(3):1592-1599. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.088.
4. Satoh H, Audrey Nguyen MT, Kudoh A, Watanabe T (2013) Yacon diet (*Smallanthus sonchifolius*, Asteraceae) improves hepatic insulin resistance via reducing Trb3 expression in Zucker fa/fa rats. *Nutrition & Diabetes* 3(5):e70 doi: 10.1038/nutd.2013.11
5. Baroni S, Suzuki-Kemmelmeier F, Caparroz-Assef SM, Cuman RKN, Bersani-Amado CA (2008) Effect of crude extracts of leaves of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) on glycemia in diabetic rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 44(3):521-530 dx.doi.org/10.1590/S1516-93322008000300024.
6. Fietz VR, Salgado JM (1999) Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicérides em ratos hiperlipidêmicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 19(3): 318-321 dx.doi.org/10.1590/S0101-20611999000300004.
7. Singleton V L, Orthofer R., Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299(1) 152–178. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1

8. Sharma OP, Bhat TK (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113(4): 1202-1205 doi:10.1016/j.foodchem.2008.08.008
9. Nelson BC, Pfeiffer CM, Sniegowski LT, Satterfield MB (2003) Development and evaluation of an isotope dilution LC/MS method for the determination of total homocysteine in human plasma. *Analytical Chemistry* 75(4):775-784 doi: 10.1021/ac0204799.
10. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry* 95(2): 351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
11. Levine RL (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine* 32(9):790-796. doi:10.1016/S0891-5849(02)00765-7.
12. Schmid W (1975) The micronucleus test. *Mutation research* 31 (1):9-15. doi:10.1016/0165-1161(75)90058-8.
13. Jacques-Silva MC, Nogueira CW, Broch LC, Flores EM, Rocha JB (2001) Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacology & Toxicology* 88(3):119-125.
14. Akerboom TPM, Sies H (1981) Assay of glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymology* 77: 373-382.
15. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121–127.
16. Plana N, Ibarretxe D, Cabré A, Ruiz E, Masana L (2014) Prevalence of atherogenic dyslipidemia in primary care patients at moderate-very high risk of cardiovascular disease. Cardiovascular risk perception. *Clinica Investigación en Arteriosclerosis* 26(6):274-284. doi: 10.1016/j.arteri.2014.04.002.
17. de Almeida Paula HA, Abranches MV, de Lucas Fortes Ferreira CL (2015) Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a food with multiple functions. *Critical reviews in food science and nutrition* 55(1):32-40. doi: 10.1080/10408398.2011.645259.

18. Genta S, Cabrera W, Habib N, Pons J, Carillo IM, Grau A, Sánchez S (2009) Yacon syrup: beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition* 28(2):182-187. doi: 10.1016/j.clnu.2009.01.013.
19. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Douidi M, Baradaran A, & Nasri, H (2014) Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(8), 927–946.
20. Pamukcu B, Lip GY, Devitt A, Griffiths H, Shantsila E (2010) The role of monocytes in atherosclerotic coronary artery disease. *Annals of medicine* 42(6):394-403. doi: 10.3109/07853890.2010.497767.
21. Oliveira GO, Braga CP, Fernandes AA (2013) Improvement of biochemical parameters in type 1 diabetic rats after the roots aqueous extract of yacon [*Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.)] treatment. *Food and chemical toxicology* 59:256-260. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.050.
22. Habib NC, Honoré SM, Genta SB, Sánchez SS (2011) Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: biochemical approach. *Chemico-biological interactions* 194(1):31-39. doi: 10.1016/j.cbi.2011.08.009.
23. Ghormade PS, Kumar NB, Tingne CV, Keoliya AN (2014) Distribution & diagnostic efficacy of cardiac markers CK-MB & LDH in pericardial fluid for postmortem diagnosis of ischemic heart disease. *Journal of forensic and legal medicine*. 28:42-46. doi: 10.1016/j.jflm.2014.09.011.
24. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC (2004) Homocisteína. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 40(5):311-320 dx.doi.org/10.1590/S1676-2444200400050000
25. Huijgen HJ, Sanders GT, Koster RW, Vreeken J, Bossuyt PM (1997) The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry* 35(8):569-579.
26. Halliwell, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? (2006) *Journal of Neurochemistry* 97(6) 1634–1658 doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x

27. Halliwell, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? (2011) *Trends in Pharmacological Sciences* 32 (3):125-130 doi: 10.1016/j.tips.2010.12.002.

28. Habib NC, Serra-Barcellona C, Honoré SM, Genta SB, Sánchez SS (2015) Yacon roots (*Smallanthus sonchifolius*) improve oxidative stress in diabetic rats. *Pharmaceutical biology* 8:1-11.

29. Simonovska B, Vovk I, Andresek S, Valentová K, Ulrichová J (2003). Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A*, 1016 (1): 89-98.



## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1.** Biochemical profile of hypercholesterolemic rats supplemented with Yacon. In A: glucose levels; B: serum total cholesterol levels; C: triglycerides levels; D: LDL-cholesterol levels; E: HDL-cholesterol levels. Data are expressed as means±S.D. Comparisons were made as a: Significantly different from Group 1; b: Significantly different from Group 2; c: Significantly different from Group 3; d: Significantly different from Group 4; e: Significantly different from Group 5; f: Significantly different from Group 6. P<0.05 was considered significant.

**FIGURE 2.** Biochemical markers of liver and kidney function. A: AST; B: ALT; C: Urea D: creatinine. Data are expressed as means±S.D.

**FIGURE 3.** Markers of cardiac damage in the hypercholesterolemic rats exposed to different treatments. A: CK-Total; B: CK-MB; C: Homocysteine; D: LDH Comparisons were made as a: Significantly different from Group 1; b: Significantly different from Group 2; c: Significantly different from Group 3; d: Significantly different from Group 4; e: Significantly different from Group 5; f: Significantly different from Group 6. P<0.05 was considered significant.

**FIGURE 4 -** Biomarkers of oxidative damage in hypercholesterolemic rats after treatment of Yacon extract. In A: lipid peroxidation levels; B: carbonyl protein contents; C: frequency of micronucleus; Comparisons were made as a: Significantly different from Group 1; b: Significantly different from Group 2; c: Significantly different from Group 3; d: Significantly different from Group 4; e: Significantly different from Group 5; f: Significantly different from Group 6. P<0.05 was considered significant.

**FIGURE 5 -** Antioxidant defenses markers in hypercholesterolemic rats after treatment of Yacon extract. In A: SOD activity; B: CAT activity; C: GPx activity; D: GSH levels; E:

ascorbic acid contents; F: polyphenols contents. Comparisons were made as a: Significantly different from Group 1; b: Significantly different from Group 2; c: Significantly different from Group 3; d: Significantly different from Group 4; e: Significantly different from Group 5; f: Significantly different from Group 6.  $P < 0.05$  was considered significant.

**TABLE 1** - Body weight of rats during the induction of hypercholesterolemia (weeks 1-4) and during treatment (weeks 5-6).

Groups	BODY WEIGHT					
	INDUCTION OF HYPERCHOLESTEROLEMIA				TREATMENT	
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6
<b>G1=Normal Diet</b>	269 ± 9.2	303 ± 5.8	321 ± 2.7	336 ± 5.1	344 ± 7.5	358 ± 7.7
<b>G2=Calorie Diet</b>	201 ± 14.4	242 ± 19.1	305 ± 30.9	347 ± 35.3	359 ± 38.6	385 ± 30.4
<b>G3=SIM</b>	208 ± 4.4	229 ± 24.9	240 ± 24.0	262 ± 28.0	270 ± 55.5	298 ± 50.3
<b>G4=YE20mg/kg</b>	299 ± 17.3	341 ± 17.5	378 ± 18.3	407 ± 20.2	425 ± 28.4	439 ± 28.6
<b>G5=YE40mg/kg</b>	284 ± 7.9	322 ± 8.8	347 ± 7.3	375 ± 12.8	394 ± 12.1	399 ± 17.4
<b>G6=YE20mg/kg+Sim</b>	292 ± 10.7	337 ± 12.6	364 ± 14.0	394 ± 15.6	406 ± 18.4	404 ± 19.6
<b>G7=YE40mg/kg+Sim</b>	260 ± 15.9	297 ± 18.8	322 ± 22.2	349 ± 24.0	356 ± 26.5	350 ± 9.2

Values are expressed as Mean ± SD of each group (n=6).

**TABLE 2** - Hematological parameters of the hypercholesterolemic rats exposed to different treatments

PARAMETERS	GROUPS						
	G1= CONTROL (ND)	G2= CONTROL (HD)	G3= SIM	G4= YE20mg/kg	G5=YE40mg/kg	G6=YE20mg/kg+SIM	G7=YE40mg/kg+SIM
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	15 ± 0.4	14 ± 0.6	13 ± 1.5	14 ± 0.4	14 ± 0.4	14 ± 0.5	14 ± 0.4
<b>Hematocrit (%)</b>	50 ± 1.3	39 ± 1.0	40 ± 4.2	44 ± 2.2	46 ± 1.0	47 ± 1.1	47 ± 2.2
<b>MCV(fL)</b>	57 ± 0.4	57 ± 1.2	54 ± 0.8	54 ± 0.3	55 ± 0.5	54 ± 0.7	55 ± 1.1
<b>MHC (pg)</b>	18 ± 0.4	20 ± 0.5	18 ± 0.4	17 ± 0.4	17 ± 0.5	17 ± 0.5	17 ± 0.3
<b>MCHC (%)</b>	31 ± 0.4	35 ± 0.8	34 ± 0.4	31 ± 0.5	31 ± 0.7	31 ± 0.5	31 ± 0.2
<b>RDW</b>	13 ± 0.2	14 ± 0.4	13 ± 0.8	13 ± 0.2	13 ± 0.4	13 ± 0.7	12 ± 0.4
<b>Erythrocytes (10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	8 ± 0.4	6 ± 0.5	7 ± 0.8	8 ± 0.4	8 ± 0.1	8 ± 0.3	8 ± 0.3
<b>Leukocytes (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	6 ± 0.2	8 ± 0.5*	6 ± 0.5	7 ± 0.1	5 ± 0.8	6 ± 0.1	5 ± 0.4
<b>Lymphocytes (%)</b>	69 ± 2.5	67 ± 10.5	69 ± 7.2	74 ± 5.2	69 ± 6.3	68 ± 6.1	64 ± 3.8
<b>Neutrophils (%)</b>	26 ± 1.5	26 ± 6.2	25 ± 7.1	17 ± 1.5	24 ± 3.8	19 ± 2.8	26 ± 4.5
<b>Monocytes (%)</b>	7 ± 1.7	12 ± 5.8*	4,5 ± 0.7	4 ± 1.8	5 ± 3.2	7 ± 2.9	6 ± 3.7
<b>Eosinophils (%)</b>	1 ± 0.3	1 ± 0.5	2 ± 0.4	1 ± 0.5	1 ± 0.0	1 ± 0.4	1 ± 0.5
<b>Basophil (%)</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>Platelets (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	392 ± 23.1	531 ± 12.5*	400 ± 18.2	405 ± 72.0	391 ± 9.4	445 ± 35.9	291 ± 37.6

Data are expressed as means±SD Asterisks indicate statistically significant differences (p<0.05) between the groups by two-way ANOVA followed by Bonferroni's comparison pos hoc test.

FIGURE 1

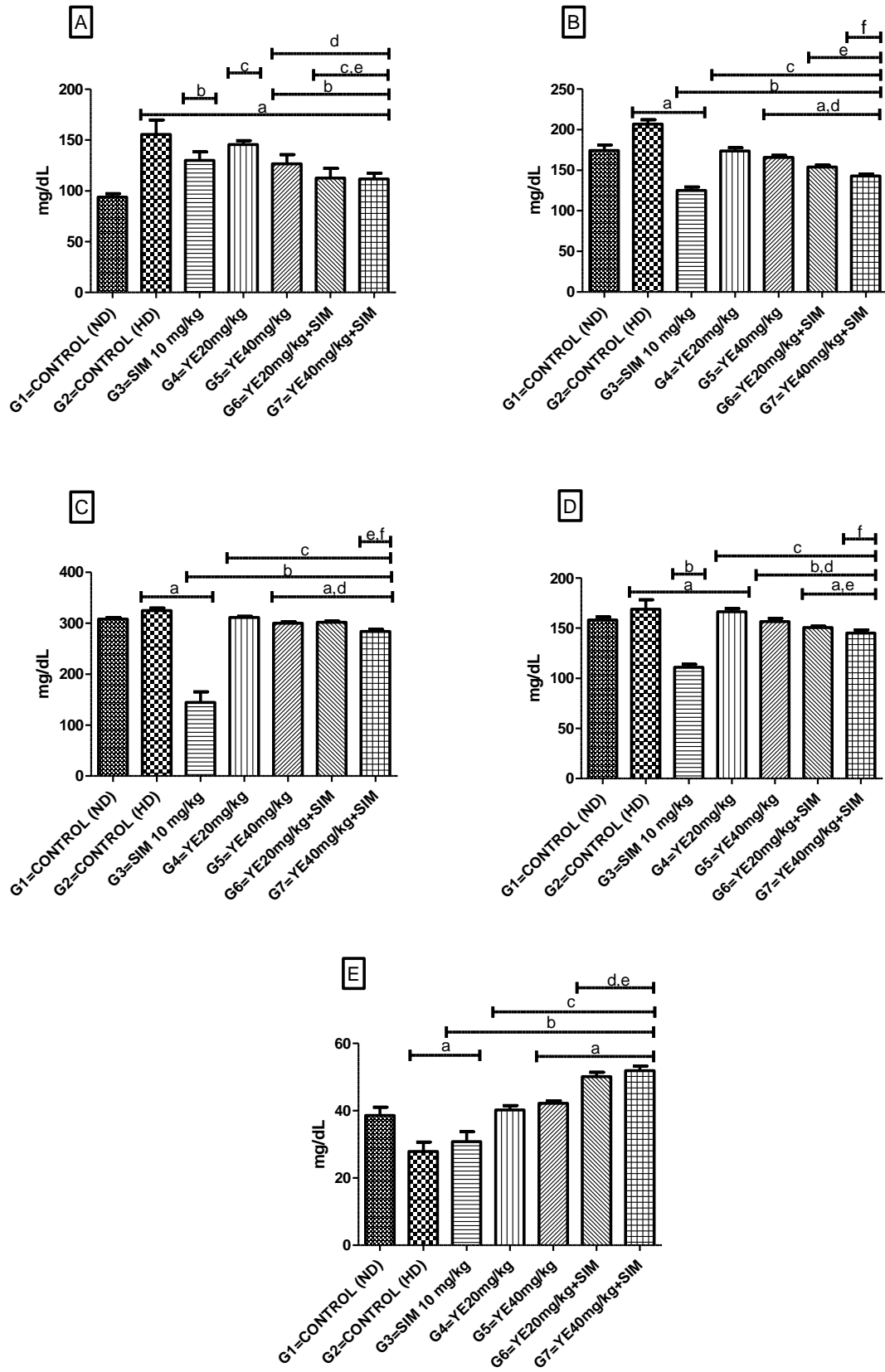


FIGURE 2

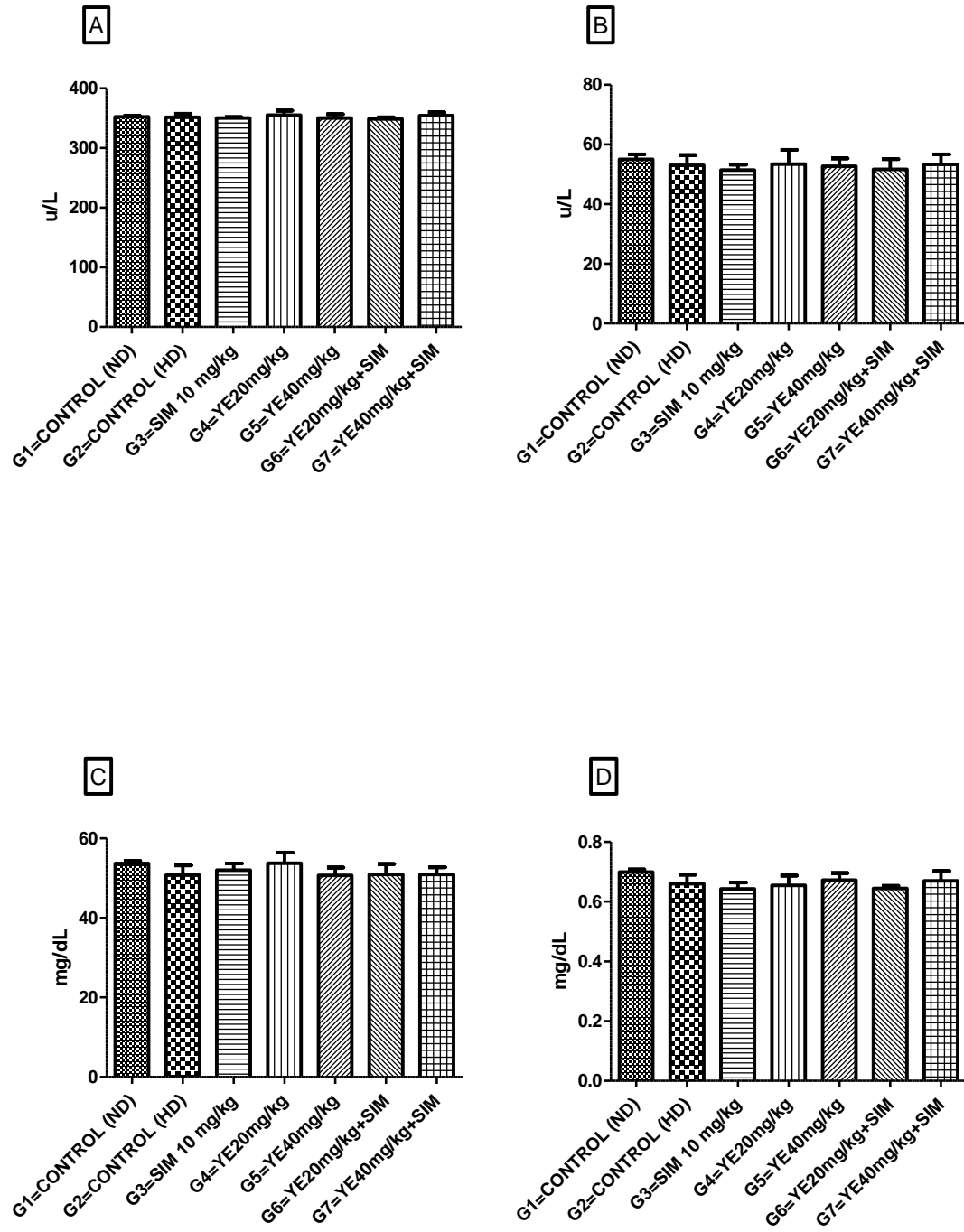


FIGURE 3.

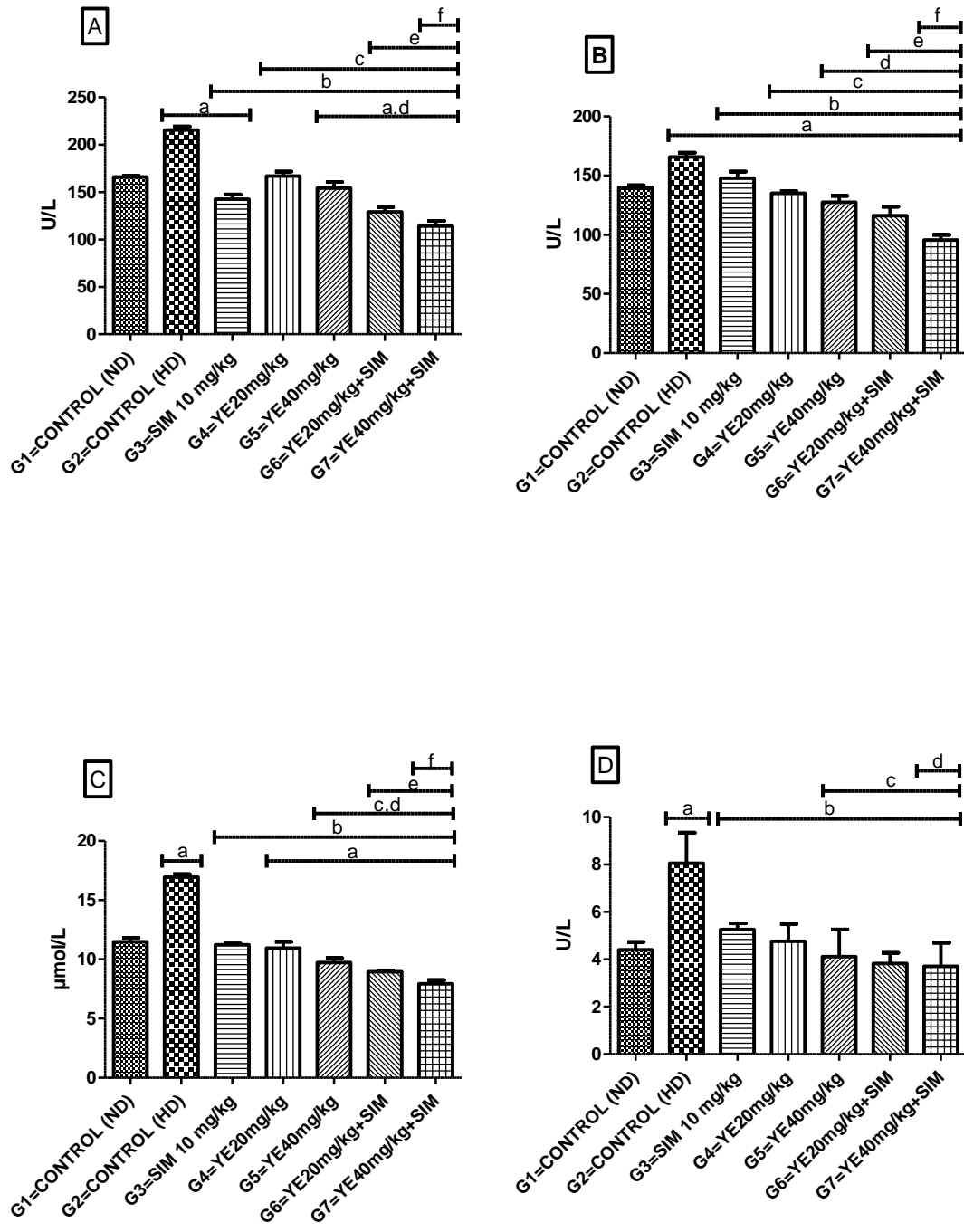


FIGURE 4

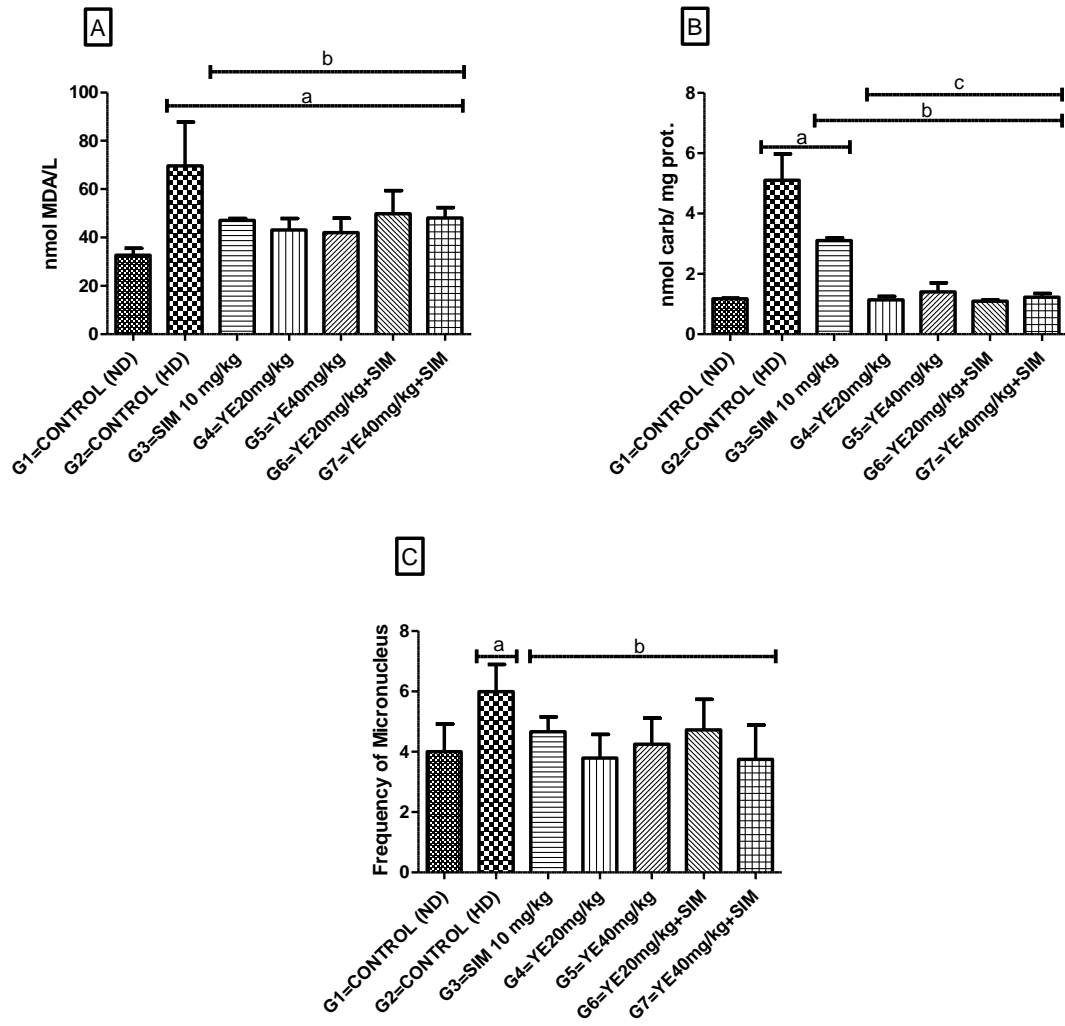
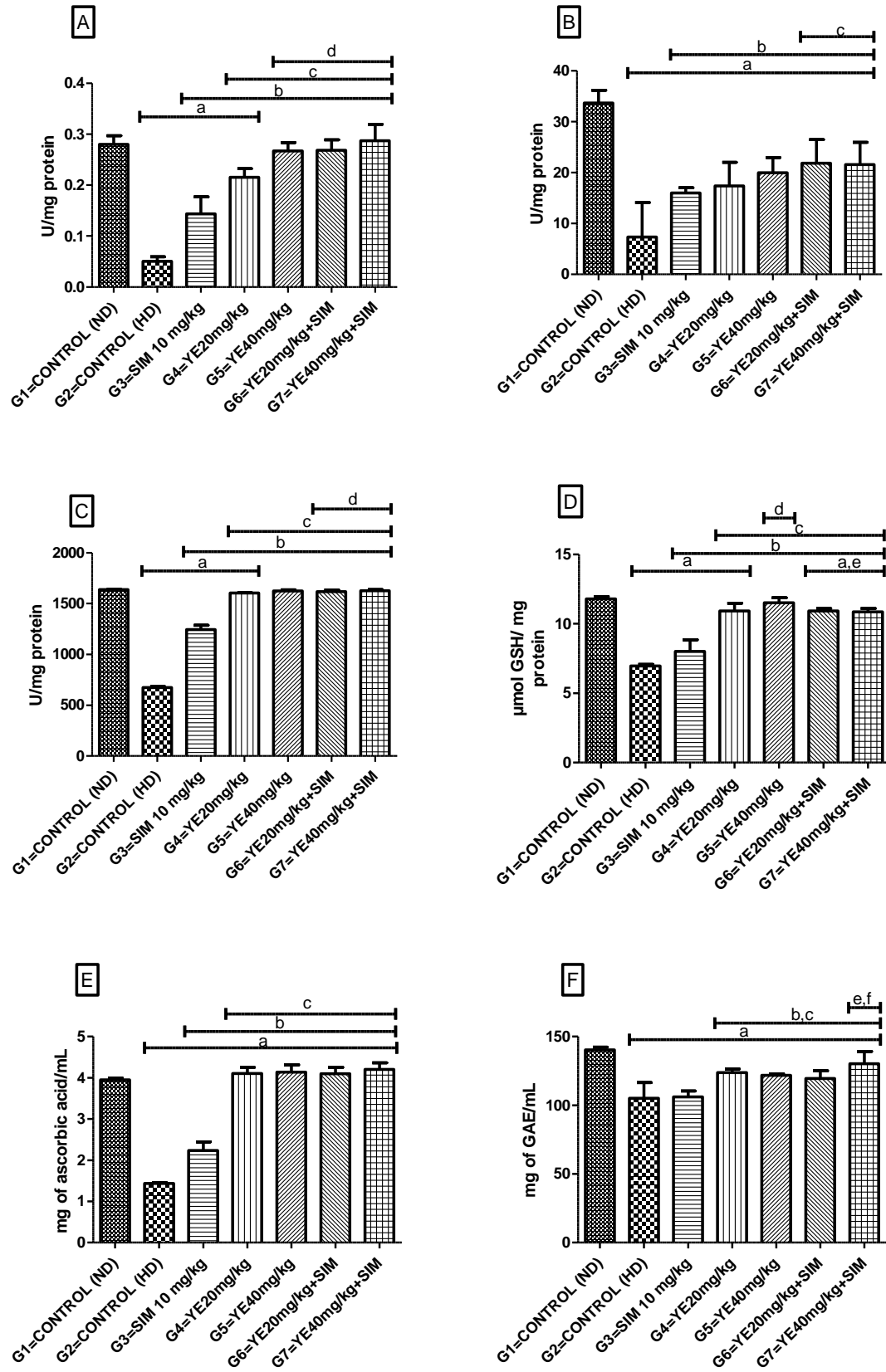




FIGURE 5



## 5. MANUSCRITO II

### **14-days of supplementation with Yacon leaf extract (*Smallanthus sonchifolius*) shows antioxidative properties and improved lipid profile and oxidative parameters in hypercholesterolemic rats model**

Patrícia Martinez Oliveira, Ritiele P. Coelho, Bruna C. Pilar, Alessandra M Golke, Angélica A Güllich, Vanusa Manfredini.

Em fase de preparação para submissão para Journal of Functional Foods



**14-days of supplementation with Yacon leaf extract (*Smallanthus sonchifolius*) shows antioxidative properties and improved lipid profile and oxidative parameters in hypercholesterolemic rats model**

Patrícia Martinez Oliveira<sup>a</sup>, Ritiele P. Coelho<sup>a</sup>, Bruna C. Pilar<sup>a</sup>, Alessandra M Golke<sup>a</sup>,  
Angélica A Güllich<sup>a</sup>, Vanusa Manfredini<sup>a, b, \*</sup>.

**Affiliation**

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Biochemistry, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>b</sup> Course of Pharmacy, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil.

**\*Corresponding author:**

Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) - Campus Uruguaiana

Laboratório de Hematologia e Citologia Clínica

BR 472, Km 585

Uruguaiana, RS, Brazil, 97500-970

Telephone: +55 55 3413 4321

E-mail: vanusamanfredini@unipampa.edu.br

**Abbreviations:**

YE, Yacon extract; CVD, cardiovascular disease; FR, free radical; RE, reactive species; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; SOD, superoxide dismutase; GSH, reduced glutathione; FOS, fructooligosaccharides; UPLC-DAD, Ultra-performance liquid chromatography with diode array detection; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; CK, creatine kinase; LDH, lactate dehydrogenase; HPLC, high performance liquid chromatography; STZ, streptozotocin; LDL low density lipoproteins; HDL, high density lipoproteins.

## Abstract

The Yacon leaves (*Smallanthus Sonchifolius*) are rich in phenolic compounds which have antioxidant activity. The objective of this study was to evaluate the hypolipidemic and antioxidant effects of Yacon leaves hydroalcoholic extract in hypercholesterolemic rats. It were used male wistar rats, divided into 7 groups: G1: normal diet (NaCl 0,9%); G2: hypercaloric diet control (NaCl 0,9%); G3: oral suspension of simvastatin 10 mg/Kg (SIM); G4: Yacon extract 20mg/Kg (YE20); G5: Yacon extract 40mg/Kg (YE40); G6: YE20 + SIM (YE20+SIM); G7: YE40 + SIM (YE40+SIM). The lyophilized extracts were administered once daily by gavage for 14 consecutive days. The hematological, biochemical and oxidative parameters were determined by classical methodologies. The groups that received the Yacon extract showed a decrease in glucose and lipid levels. The extract administration significantly decreased serum levels of cardiac markers and showed a reduction of the inflammatory process. Moreover, it reduced lipid peroxidation, protein carbonylation, frequency of micronucleus and increased antioxidant defenses. Thus, the results suggest that the lyophilized Yacon extract showed a hypoglycemic, hypolipemic and antioxidant activity, possibly due to its high content of phenolic compounds.

Keywords: Yacon, leaves, lipid profile, antioxidant.

## 1. Introduction

Oxidative stress is involved in the progression of several diseases, including cardiovascular disease (CVD) (Singh & Jialal, 2006), and is the consequence of an imbalance in redox status of the organism, with excessive production of free radicals (FR). The FR may be defined as any species containing one or more unpaired electrons in the last molecular layer (Halliwell, 2006). This unpaired electron make the FR highly unstable and very reactive and may oxidize directly biomolecules (Valko, et al., 2007).

The body, in turn, has an antioxidant defense system against reactive species. Antioxidants are molecules which protect the biological target of oxidative damage and can be classified in enzymatic such as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) and nonenzymatic as reduced glutathione (GSH), vitamin E, vitamin A, vitamin C, polyphenols, among others (Halliwell, 2011).

The intake of natural antioxidants is associated with decreased incidence of various diseases (Gomathi, Ravikumar, Kalaiselvi, Vidya, & Uma, 2012). In this context, arises the Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) that is attracting interest especially for its medicinal properties. The Yacon is a tuberous root that has fructooligosaccharides (FOS) as a reserve carbohydrate, these have links  $\beta - (2 \rightarrow 1)$  that resist hydrolysis of digestive enzymes being fermented in the colon, exercising bifidogenic activity (Campos, et al., 2012). Moreover, studies have investigated that the beneficial properties of Yacon are due to the presence of phenolic compounds (Ojansivu, Ferreira, & Salminen, 2011), while the concentration in the roots is high, it is even higher in the leaves (Arnao, Suarez, Cisneros, & Trabucco, 2012).

Studies have shown that Yacon leaves (*Smallanthus sonchifolius*) have antimicrobial (Lin, Hasegawa, & Kodama, 2003), antifungal (Inoue et al., 1995), anti-hyperglycemic (Aybar, Riera, Grau, & Sanchez, 2001) and antioxidant activity (Lachman, Fernández, Viehmannová, Sulc, & Èepková, 2009), however studies that evaluate other effects *in vivo* are rare in the literature. Thus, the objective of this study was to evaluate the hypolipidemic and antioxidant effects of Yacon leaves hydroalcoholic extract in hypercholesterolemic Wistar rats.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Chemicals

All the chemicals were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and of analytical grade. Solvents for UPLC analysis were purchased from Tedia Company (OH, EUA).

### 2.2. Sample plant

The Yacon roots were provided by the Emater/RS, and cultivated in a property in Alegrete / RS. The leaves were duly transported fresh to Uruguaiiana, RS, Brazil, where they were processed immediately.

### 2.3 Preparation of the extract

The Yacon leaves hydroalcoholic extract was obtained from 70% ethanol (v / v). The leaves were washed, peeled and dried at 37 ° C for 5 hours and placed in contact with the solvent for 7 days in the dark, according to a slightly modified method previously described by Baroni et al., (Baroni, Suzuki-Kemmelmeier, Caparroz-Assef, Cuman & Bersani-Amado, 2008). After the extract was filtered and concentrated under reduced pressure using a rotary evaporator at 40 °C, and the remaining water portion was lyophilized. The lyophilized was stored at -70 °C until further use.

### 2.4 Phytochemical analysis

Ultra-performance liquid chromatography with diode array detection (UPLC-DAD) was performed to evaluate the main components of the Yacon. The chemical reference substances used in this study were rutin hexahydrate, quercetin, kaempferol, gallic acid, gallo catechin, epicatechin, luteolin, gallic acid and chlorogenic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis/EUA).

### 2.5 Animal Experimentation

For this study it was used male Wistar rats (60-65 g), 30 days old, obtained from the Central Animal Laboratory of the Federal University of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. During treatment, rats were housed at a constant room temperature, humidity, and light cycle (12:12h light-dark), free access to tap water and fed with standard chow ad libitum.

## 2.6 Ethical issues

All experiments were conducted in compliance with the guidelines for biomedical research stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology and approved by the Ethics Committee on Animal Use Experimentation of the Federal University of Pampa, CEUA, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brazil (Protocol 034/2013).

## 2.7 Preparation of feed and Induction of hypercholesterolemia

The rats had free access to water and a hypercholesterolemic diet for 30 days as described by Fietz and Salgado (Fietz & Salgado, 1999).

After 30 days of induction, blood samples were collected (puncture in the rat tail), before the start of experiments to confirm hypercholesterolemia, and then initiating treatment with the extracts. After inducing hypercholesterolemia, the groups continued to receive the same diet until the end of the experiment.

## 2.8 Experimental Design

Forty-two rats were divided into 7 groups of 6 animals each: Group 1 (normal diet) and group 2 (hypercaloric diet control) received saline at a dose of 1 ml, group 3: oral suspension of simvastatin 10 mg/kg (SIM), group 4: Yacon extract 20 mg/kg (YE20), group 5: Yacon extract 40 mg/kg (YE50), group 6: Yacon extract 20 mg/kg and simvastatin 10 mg/kg (YE20+SIM), group 7: Yacon extract 40 mg/kg and simvastatin 10 mg/kg (YE40+SIM). All treatments were administered daily by gavage. Only G1 received normal diet, while the other groups received hypercholesterolemic diet until the end of the experiment.

Body weight registration of the animals was performed during all experimental period.

## 2.9 Yacon extract prepare and administration

The Yacon-based solution was obtained by the dissolution of the lyophilized extract in water. The solutions were daily prepared immediately before the administration. The extracts were administered by gavage for 14 consecutive days. Animals were euthanized 24 h after the last treatment, in fasting, to obtain the whole blood.

## 2.10 Parameters analyzed

### 2.10.1 Evaluation of antioxidant potential from Yacon extract *in vitro*

The antioxidant activity in vitro was determined by the classical method of DPPH and content of total polyphenols was measured in six different concentrations (0,05mg/mL, 0,10 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,50 mg/mL, 1,0 mg/mL, 2,0 mg/mL) of the extract.

#### *2.10.1.1 Determination of total polyphenols content*

The concentration of total polyphenols in Yacon extract was measured spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999), with modifications. Briefly, 125  $\mu$ L of 1 N Folin-Ciocalteu reagent was added to a 125  $\mu$ L of sample, and this mixture was allowed to stand for 6 min before the addition of 1,25 mL of 7% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The solution was then allowed to stand for 90 minutes before reading at 760 nm in Spectrophotometer (UV-1800 Shimadzu, Japan).

The standard curve of gallic acid was prepared in the same manner and total polyphenolic content was expressed in milligram of gallic acid equivalent per milliliter (mg GAE mL<sup>-1</sup>). The equation obtained for standard curve of gallic acid in the range of 0.001 – 0.020 mg/mL was  $y = 40.112x + 0.0581$  ( $R^2 = 0.9994$ ).

#### *2.10.1.2 DPPH radical scavenging activity*

The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging activity of Yacon extract was determined as described by Sharma and Bhat (Sharma & Bhat 2009). The DPPH radical solution (50 $\mu$ L) was dissolved in methanol and added to a medium containing Yacon extract at different concentrations. The medium was incubated at room temperature for 30 min. The decrease in absorbance was measured at 517 nm, which depicted the scavenging activity of Yacon extract against DPPH. The DPPH scavenging capacity of the compound was calculated as:

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = 100 - \left[ \frac{(\text{ABS}_{\text{SAMPLE}} - \text{ABS}_{\text{BLANK}})}{\text{ABS}_{\text{CONTROL}}} \times 100 \right]$$

Where, ABS<sub>SAMPLE</sub> is the absorbance of the test compound, ABS<sub>BLANK</sub> is the absorbance of the blank and ABS<sub>CONTROL</sub> is the absorbance of the control reaction. IC<sub>50</sub> value (concentration of sample where absorbance of DPPH decreases 50% with respect to absorbance of blank) of the sample was determined. Ascorbic acid was used as positive control.

#### *2.10.2 Evaluation of Yacon extract in vivo*

##### *2.10.2.1 Biochemical and hematological analysis*



The hemograms (complete blood count) were determined using an automated hematology analyzer Cell-Dyn 3200 (Abbott Diagnostic, Abbot Park, IL, USA). Total cholesterol, HDL-cholesterol, triacylglycerol total, and glucose levels were carried out using automatic analyzer A-25 Biosystems (Biosystems SA, Barcelona, Spain) for *in vitro* diagnostics. LDL cholesterol values were computed according to the Friedewald formula.

Enzymatic markers for liver function (aspartate transaminase - AST, alanine transaminase - ALT), renal (creatinine, uric acid) and heart (creatine kinase - CK, its isoform CK-MB and lactate dehydrogenase - LDH) were determined by automated equipment (A25 Biosystem) for *in vitro* diagnostics. Homocystein levels were measured by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS), according to Nelson *et al.* (Nelson, Pfeiffer, Sniegowski, & Satterfield, 2003). All biochemical assays were carried out in triplicate.

#### 2.10.2.2 Evaluation of oxidative stress parameters

##### 2.10.2.2.1 Oxidative damage

The oxidative parameters, lipid peroxidation (Ohkawa, Ohishi, & Yagi, 1979) and protein carbonyls (Levine, 2002) in plasma were measured using spectrophotometric methods. The assessment of DNA damage was made by frequency of micronucleus (Schmid, 1975) in leukocytes.

##### 2.10.2.3.2 Antioxidants defenses

The levels of polyphenols (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999), vitamin C (Jacques-Silva, Nogueira, Broch, Flores, & Rocha 2001) in plasma were quantified by spectrophotometry.

The levels of reduced glutathione (GSH) (Akerboom & Sies, 1981) the activity of superoxide dismutase (SOD) (kit RANSOD - RANDOX Brasil LTDA), catalase (CAT) ((Aebi, 1984), and glutathione peroxidase (kit RANSEL - RANDOX Brasil LTDA) were determined in erythrocytes. All assays were carried out in triplicate.

#### 2.11 Statistical Analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Comparisons between groups were performed using two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni's

Multiple Comparison test for post hoc analysis. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . The statistical analysis was performed using GraphPad Prism (version 5.0, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Totals Polyphenols content and DPPH assay

**Figure 1A** shows that total phenolics in Yacon leaves hydroalcoholic extract range from 2.28 to 49.26 mg of GAE/ml, showing a dose-dependent behavior.

The Yacon leaf extract obtained a percentage of inhibition of 18.15% to 86.84% against the DPPH radical (**Figure 1B**).

A study by Arnao et al. (Arnao, Seminario, Cisneros, & Trabucco, 2011), showed that hydroalcoholic extracts leaves obtained an IC<sub>50</sub> for the capture of DPPH radical, between 44.2 and 110.3 ug dry leaf/mL and its total phenols range from 7.7 to 22.7 mg GAE/g.

Thus, it is suggested that the Yacon leaf extract has high antioxidant activity *in vitro*, which may be related to the large amount of phenolic compounds.

#### 3.2 Phytochemical analysis

In the analysis of the spectral profiles of the major peaks in the chromatogram it were observed compounds with characteristics of flavonoids and phenolic acids, however, none of the compounds showed retention time or spectral profile of the standards used. These results differ from those presented by Simonovska et al. (Simonovska, Vovk, Andresek, Valentová, & Ulrichová, 2003), and Valentová et al. (Valentova, Cvak, Muck, Ulrichova, & Simanek, 2003), which revealed the presence of caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, protocatechuic, among others. The different forms of extraction and/or origin of the plant material, can explain this difference.

The rutin flavonoid was identified in the chromatogram obtained from the leaves extract. The average content of rutin in the extract of the leaves was approximately 0.81 µg/mL.

#### 3.3 Effects of YE on body weight gain

**Table 1** shows that G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 had a weight gain 33%, 91%; 43%, 87%, 73%, 64%, 76% respectively.

### 3.4. Effect of the YE treatment on Hematological Profile

After 14 days of supplementation it was observed a significant decrease in leukocyte and platelet counts in all groups treated with Yacon leaf extract both in relation to G2 control group and the healthy control G1 (**Table 2**).

There was a statistically significant difference in monocyte count in the G2 control group compared to groups supplemented with Yacon.

Inflammation is highly associated with the development of atherosclerosis, the main cause of cardiovascular disease (Berbée, et al. 2015). Monocytes are key cells in the formation of atherosclerotic plaques (McLaren, Michael, Ashlin, & Ramji, 2011).

Thus, these results demonstrated that the administration of Yacon extract decreased the inflammatory process and hence the risk of developing atherosclerosis in hypercholesterolemic rats. A study by Oliveira et al. (Oliveira et al., 2013) observed anti-inflammatory topical effect of Yacon leaves, suggesting that this effect is mainly due to its phenolic compounds.

The other parameters evaluated were not significant.

### 3.5 Effect of the YE treatment on Biochemical Profile

#### 3.5.1 Lipid and glycemie profiles

**Figure 2A** shows that there was a significant reduction in plasma glucose in all groups receiving the Yacon extract with or without combination with simvastatin compared to the control group (G2). Although this study used lower dose and for a shorter period, these findings corroborate a study by Honoré et al. (Honoré, Cabrera, Genta, & Sánchez, 2012) where the administration of the Yacon leaves extract (dry extract 70mg/kg body weight) for 4 weeks significantly reduced hyperglycemia in rats with streptozotocin-induced diabetes. In another study by Aybar et al. (Aybar, Riera, Grade, & Sanchez, 2001) it was evaluated the hypoglycemic effect of aqueous extract of the leaves of Yacon normoglycemic rats transiently hyperglycemic and streptozotocin-induced diabetic (STZ), where the administration of Yacon extract 2% for 30 days also showed a significant hypoglycemic effect in rats with STZ-induced diabetes.

An abnormal lipid profile is the major cardiovascular risk factor and is characterized by elevated levels of total cholesterol, triacylglycerol and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and a decrease in high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) (Plana, Ibarretxe, Cabré, Ruiz, & Masana, 2014).

There was a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the serum levels of total cholesterol (G4, G5, G6, G7) in relation to G2 (**Figure 2B**). Triacylglycerol (**Figure 2C**) and LDL-cholesterol levels (**Figure 2D**) had a significant reduction compared to G2, and similar values G1. It was also observed a significant increase ( $p < 0.05$ ) of HDL-cholesterol levels (G4, G5, G6, G7) (**Figure 2E**) in comparison to the control group (G2), and the groups associated with simvastatin (G6, G7) were significantly higher than the healthy control group (G1). This study demonstrated that the administration of Yacon leaf extract in hypercholesterolemic rats, improved lipid profile, thus suggesting a possible protective effect on the progression of CVD.

A study by Miura et al. (Miura, Itoh, & Ishida, 2004) noticed that the administration of the aqueous extract of Yacon leaves (500mg/kg) for 6 weeks reduced hyperglycemia and hyperlipidemia in type 2 diabetic mice.

### 3.5.2 Markers of renal and hepatic function

The results showed that serum biochemical markers that evaluated hepatic (**Figure 3A, 3B**) and renal functions (**Figure 3C, 3D**) of animals, are within normal limits, with no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) between groups.

### 3.5.3 Markers of cardiac damage

Creatine kinase (CK) and its isoform CK-MB are used as a marker of heart disease (Ghormade, Kumar, Tingne, & Keoliya, 2014). Homocysteine is an sulfhydryl amino acids formed from the liver methionine. The elevation of homocysteinemia have been associated with increased risk of atherothrombotic events (Kalra, 2004). The lactate dehydrogenase (LDH) is a key enzyme in the metabolism of carbohydrates that can be found in many tissues. The serum levels of LDH are elevated in a variety of disorders, especially in cardiac and hepatic disease (Huijgen, Sanders, Koster, Vreeken, & Bossuyt, 1997). The hypercholesterolemic diet induced an increase in the levels of CK (**Figure 4A**), CK-MB (**Figure 4B**), homocysteine (**Figure 4C**) and LDH (**Figure 4D**) in the G2. The groups receiving Yacon extract showed a decrease ( $p < 0.05$ ) in the levels of these markers when compared to the G2, and the groups being associated with simvastatin (G6, G7) had lower levels than G1.

## 3.6. Evaluation of oxidative stress parameters

### 3.6.1 Oxidative damage

The FR directly oxidize lipids (lipid peroxidation), proteins (carbonylation and/or nitration) and genetic material (DNA) (oxidation of nitrogenous bases) (Halliwell, 2006). Lipid

peroxidation is a complex process that involves interaction of reactive oxygen species (ROS) with poly-unsaturated fat acids, resulting in a wide variety of highly reactive electrophiles aldehydes and malondialdehyde (MDA), the main product (Halliwell, & Chirico, 1993). **Figure 5A** shows that the control group (G2) has high levels of MDA. However, the groups treated with Yacon extract showed significant decreases ( $p < 0.05$ ) in MDA levels in plasma ( $p < 0.05$ ) compared to the control group (G2). The decrease in MDA levels in plasma indicates the reduction of the lipid peroxidation. The groups supplemented with Yacon also showed a significant reduction ( $p < 0.05$ ) in protein carbonyls and frequency of micronucleus in relation to G2. **Figure 5B, 5C**, respectively.

### 3.6.2 Antioxidants defenses

The ER continuous production by metabolic processes resulted in the development of various antioxidant defense mechanisms to protect the biomolecules from oxidative damage (Sies, 1993).

The biomarkers of enzymatic antioxidant defenses (SOD, CAT, GPx) and non-enzymatic (vitamin C, GSH, and polyphenols) are shown in **Figure 6A, B, C, D, E, and F**, respectively.

The G2 demonstrated low activity of antioxidant enzymes and reduced levels of vitamin C, GSH, and polyphenols. After 14 days of supplementation the enzymatic activity increased significantly ( $p < 0.05$ ) (SOD, CAT, GPx) in the groups treated with Yacon compared to G2, and the GPx levels were similar to G1. The levels of GSH, vitamin C and polyphenols were significantly higher in the supplemented groups compared to G2, polyphenols levels in the groups supplemented with Yacon which received the highest dose (G5, G7) with or without simvastatin had values similar to G1. These results show that Yacon is capable of increasing the antioxidant defenses in hypercholesterolemic rats.

## 5. Conclusion

Administration of the Yacon leaves extract in hypercholesterolemic rats improved glycemic and specially lipid profiles. Moreover, the extract supplementation offered protection against heart damage, and it was not hepatotoxic or nephrotoxic. It also showed a reduction in the oxidative damage to lipids, proteins, DNA and was able to enhance antioxidant defenses. The extract of the leaves showed a high antioxidant activity *in vitro*, possibly due to its high content of polyphenols, including rutin, it may be the main metabolite responsible for the positive effects of this plant.

### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

### References

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.

Akerboom, T.P.M., Sies, H. (1981) Assay of glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymology*, 77: 373-382.

Arnao, I., Seminario, J., Cisneros, R., & Trabucco, J. (2011) Potencial antioxidante de 10 accesiones de yacón, *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson, procedentes de Cajamarca – Perú. *Anales de la Facultad de Medicina*, 72, 239-243.

Arnao, I., Suarez, S., Cisneros, R., & Trabucco, J. (2012) Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de la raíz y las hojas de *Smallanthus sonchifolius* (yacón). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 78, 120-125.

Aybar, M. J., Riera, A. N. S., Grau, A., & Sanchez, S. S. (2001). Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 74, 125-132.

Baroni, S., Suzuki-Kemmelmeier, F., Caparroz-Assef, S.M., Cuman, R.K.N., Bersani-Amado, C.A. (2008) Effect of crude extracts of leaves of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) on glycemia in diabetic rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44, 521-530.

Berbée, J.F., Boon, M.R., Khedoe, P.P., Bartelt, A., Schlein, C, Worthmann, A., Kooijman, S., Hoeke, G., Mol, I.M., John, C., Jung, C., Vazirpanah, N., Brouwers, L.P., Gordts, P.L., Esko, J.D., Hiemstra, P.S., Havekes, L.M., Scheja, L., Heeren, J., & Rensen, P.C. (2015) Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nature communications*, 6, 6356.

Campos, D., Betalleluz-Pallardel, I., Chirinos, R., Aguilar-Galvez, A., Noratto, G., Pedreschi, R. (2012) Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135, 1592-1599.

Fietz, V.R., Salgado, J.M. (1999) Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 19, 318-321.

Ghormade, P.S., Kumar, N.B., Tingne, C.V., & Keoliya, A.N. (2014) Distribution & diagnostic efficacy of cardiac markers CK-MB & LDH in pericardial fluid for postmortem diagnosis of ischemic heart disease. *Journal of forensic and legal medicine*, 28, 42-46.

Gomathi, D., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Vidya, B., & Uma, C. (2012). HPTLC fingerprinting analysis of *Evolvulus alsinoides* (L.) L. *Journal of Acute Medicine*, 2, 77-82.

Halliwell, B., & Chirico, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, 57, 715-724.

Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97, 1634–1658.

Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32, 125-130.

Honoré, S.M. Cabrera, W.M., Genta, S.B., & Sánchez, S.S. (2012) Protective effect of yacon leaves decoction against early nephropathy in experimental diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1704-1715.

Huijgen, H.J., Sanders, G.T., Koster, R.W., Vreeken, J., & Bossuyt, P.M. (1997) The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, 35, 569-579.

- Inoue, A., Tamogami, S., Kato, H., Nakazato, Y., Akiyama, M., Kodama, O., Akatsuka, T., & Hashidoko, Y. (1995). Antifungal melampolides from leaf extracts of *Smallanthus sonchifolius*. *Phytochemistry*, 39, 845-848.
- Jacques-Silva, M. C., Nogueira, C. W., Broch, L. C., Flores, E. M., & Rocha, J. B. (2001). Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacology & Toxicology*, 88, 119-125.
- Kalra, D. K. (2004). Homocysteine and cardiovascular disease. *Current atherosclerosis reports*, 6, 101-106.
- Lachman, J., Fernández, E.C., Viehmannová, I., Šulc, M., & Èepková, P. (2009) Total phenolic content of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) rhizomes, leaves, and roots affected by genotype. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 35, 117-123.
- Levine, R.L. (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine*, 32,790-796.
- Lin, F., Hasegawa, M., & Kodama, O. (2003). Purification and Identification of Antimicrobial Sesquiterpene Lactones from Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) Leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67, 2154–2159.
- McLaren, J.E., Michael, D.R., Ashlin, T.G., & Ramji, D.P. (2011) Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Progress in Lipid Research*, 50, 331-347.
- Miura, T., Itoh, Y., & Ishida, T. (2004) Hypoglycemic and hypolipidemic activity of the leaf of *Smallanthus sonchifolius* in genetically type 2 diabetic mice. *Journal of Traditional Medicines*, 21, 275-277.
- Nelson, B.C., Pfeiffer, C.M., Sniegowski, L.T., & Satterfield, M.B. (2003) Development and evaluation of an isotope dilution LC/MS method for the determination of total homocysteine in human plasma. *Analytical Chemistry*, 75, 775-784.



Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry* 95, 351–358.

Ojansivu, I., Ferreira, C.L., & Salminen, S. (2011) Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 40-46.

Oliveira, R. B., Chagas-Paula, D.A., Secatto, A., Gasparoto, T.H., Faccioli, L.H., Campanelli, A.P., & Da Costa, F.B. (2013). Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 497-505.

Plana, N., Ibarretxe, D., Cabré, A., Ruiz, E., Masana, L. (2014) Prevalence of atherogenic dyslipidemia in primary care patients at moderate-very high risk of cardiovascular disease. Cardiovascular risk perception. *Clinica Investigación en Arteriosclerosis*, 26, 274-284.

Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31, 9-15.

Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defence. Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, 215, 213-219.

Sharma, O.P., & Bhat, T.K. (2009) DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113, 1202-1205.

Simonovska, B., Vovk, I., Andresek, S., Valentová, K., & Ulrichová J (2003). Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A*, 1016, 89-98.

Singh, U., & Jialal, I. (2006). Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, 13, 129-142.

Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.

Valentova, K., Cvak, L., Muck, A., Ulrichova, J., & Simanek, V. (2003) Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. *European journal of nutrition*, 42, 61-66.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE 1** - In vitro tests determined at different concentrations extract of Yacon leaves. A - Polyphenols content; B- DPPH radical-scavenging activity.

**FIGURE 2** – Effect of Yacon extract in hypercholesterolemic rats after treatment. In A: glucose levels; B: serum total cholesterol levels; C: triglycerides levels; D: LDL-cholesterol levels; E: HDL-cholesterol levels. Data are expressed as means±S.D. Comparisons were made as a: Significantly different from Group 1; b: Significantly different from Group 2; c: Significantly different from Group 3; d: Significantly different from Group 4; e: Significantly different from Group 5; f: Significantly different from Group 6.  $P<0.05$  was considered significant.

**FIGURE 3** - Biochemical markers of liver and kidney function. A: AST; B: ALT; C: Urea D: creatinine. Data are expressed as means±S.D.

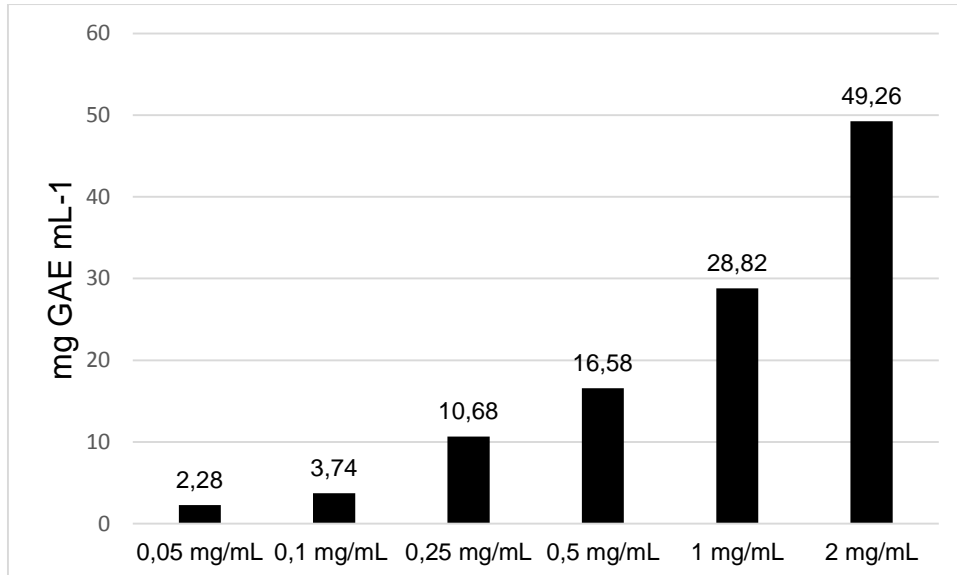
**FIGURE. 4** - Markers of cardiac damage in the hypercholesterolemic rats exposed to different treatments. A: CK-Total; B: CK-MB; C: Homocysteine; D: LDH. Comparisons were made as a: Significantly different from Group 1; b: Significantly different from Group 2; c: Significantly different from Group 3; d: Significantly different from Group 4; e: Significantly different from Group 5; f: Significantly different from Group 6.  $P<0.05$  was considered significant.

**FIGURE 5** - Biomarkers of oxidative damage in hypercholesterolemic rats after treatment of Yacon extract. In A: lipid peroxidation levels; B: carbonyl protein contents; C: frequency of micronucleus; Comparisons were made as a: Significantly different from Group 1; b: Significantly different from Group 2; c: Significantly different from Group 3; d: Significantly different from Group 4; e: Significantly different from Group 5; f: Significantly different from Group 6.  $P<0.05$  was considered significant.

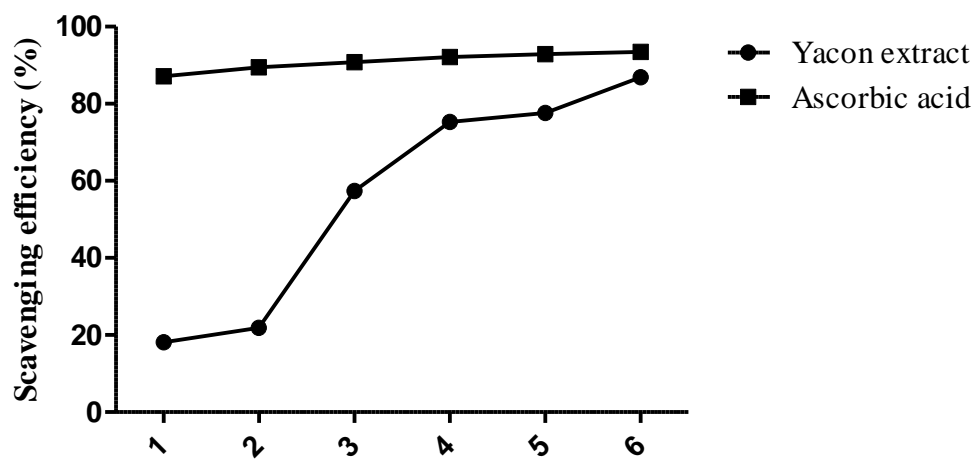
**FIGURE 6** - Antioxidant defenses markers in hypercholesterolemic rats after treatment of Yacon extract. In A: SOD activity; B: CAT activity; C: GPx activity; D: GSH levels; E: ascorbid acid contents; F: polyphenols contents. Comparisons were made as a: Significantly different from Group 1; b: Significantly different from Group 2; c: Significantly different from Group 3; d: Significantly different from Group 4; e: Significantly different from Group 5; f: Significantly different from Group 6.  $P<0.05$  was considered significant.

FIGURE 1

A



B



**Table 1- Body Weight of rats during the induction of hypercholesterolemia (weeks 1-4) and during treatment (weeks 5-6).**

Groups	Induction of Hypercholesterolemia				Treatment	
	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6
G1=Normal Diet	269 ± 9,2	303 ± 5,8	321 ± 2,7	336 ± 5,1	344 ± 7,5	358 ± 7,7
G2=Calorie Diet	201,±14,4	242 ± 19,2	305 ± 30,9	347 ± 35,3	359 ± 38,6	385 ± 30,4
G3=SIM	208 ± 4,4	229 ± 24,9	240 ± 24,0	262 ± 28,0	270 ± 55,4	298 ± 50,3
G4=YE20mg/kg	198 ± 8,0	242 ± 9,2	208 ± 10,0	352 ± 19,6	361 ± 22,2	372 ± 23,4
G5=YE40mg/kg	206 ± 14,7	246 ± 20,2	293 ± 14,5	341 ± 21,2	347 ± 26,7	357 ± 25,0
G6=YE20mg/kg+Sim	222± 34,0	246 ± 12,9	309 ± 23,1	357 ± 18,7	357 ± 25,3	365 ± 30,7
G7=YE40mg/kg+Sim	205 ± 13,9	249 ± 17,8	297± 12,6	344 ± 14,3	353 ± 13,7	362 ± 9,3

Values are expressed as Mean ± SD of each group (n=6).

**Table 2 – Hematological parameters of the hypercholesterolemic rats exposed to different treatments.**

PARAMETERS	GROUPS						
	G1= CONTROL (ND)	G2= CONTROL (HD)	G3= SIM	G4= YE20mg/kg	G5=YE40mg/kg	G6=YE20mg/kg+SIM	G7=YE40mg/kg+SIM
<b>Hemoglobin (g/dL)</b>	15 ± 0.4	14 ± 0.6	13 ± 1.5	14 ± 0.5	14 ± 0.5	14 ± 0.4	14 ± 0.6
<b>Hematocrit (%)</b>	50 ± 1.3	39 ± 1.0	40 ± 4.2	39 ± 1.2	39 ± 0.9	39 ± 0.9	39 ± 1.4
<b>MCV(fL)</b>	57 ± 0.4	57 ± 1.2	54 ± 0.8	58 ± 1.1	58 ± 1.1	58 ± 0.9	58 ± 1.3
<b>MHC (pg)</b>	18 ± 0.4	20 ± 0.5	18 ± 0.4	20 ± 0.5	20 ± 0.4	20 ± 0.7	19 ± 0.5
<b>MCHC (%)</b>	31 ± 0.4	35 ± 0.8	34 ± 0.4	35 ± 0.8	35 ± 0.8	35 ± 0.8	34 ± 0.6
<b>RDW</b>	13 ± 0.2	14 ± 0.4	13 ± 0.8	14 ± 0.5	14 ± 0.6	14 ± 0.5	14 ± 0.3
<b>Erythrocytes (10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	8 ± 0.4	6 ± 0.5	7 ± 0.8	6 ± 0.4	6 ± 0.4	6 ± 0.4	6 ± 0.3
<b>Leukocytes (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	6 ± 0.2	8 ± 0.5*	6 ± 0.5	5 ± 0.4	4 ± 0.6	4 ± 0.3	3 ± 0.2
<b>Lymphocytes (%)</b>	69 ± 2.5	67 ± 10.5	69 ± 7.2	6 ± 9.9	63 ± 10.5	63 ± 5.5	59 ± 9.8
<b>Neutrophils (%)</b>	26 ± 1.5	26 ± 6.2	25 ± 7.1	34 ± 10.1	25 ± 9.3	31 ± 6.1	31 ± 10.8
<b>Monocytes (%)</b>	7 ± 1.7	12 ± 5.8*	4 ± 0.7	4 ± 0.9	8 ± 4.7	3 ± 0.5	6 ± 5.6
<b>Eosinophils (%)</b>	1 ± 0.3	1 ± 0.5	2 ± 0.4	0.4 ± 0.8	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.2 ± 0.4
<b>Basophil (%)</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
<b>Platelets (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	392 ± 23.1	531 ± 12.5*	400 ± 18.2	318 ± 5.1	306 ± 7.0	307 ± 6.1	295 ± 2.7

Data are expressed as means±SD Asterisks indicate statistically significant differences (p<0.05) between the groups by two-way ANOVA followed by Bonferroni's comparison pos hoc test.

FIGURE 2

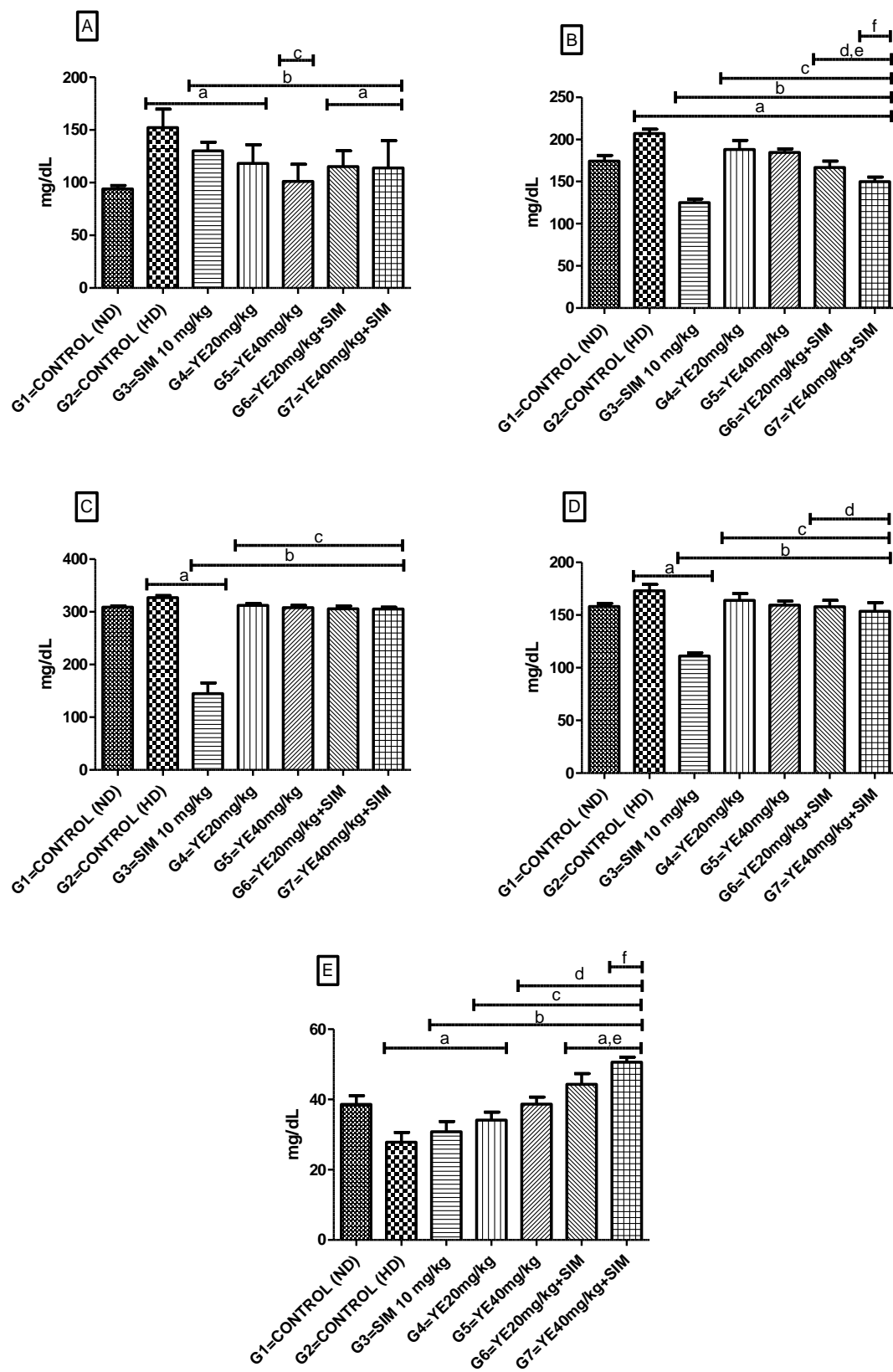


FIGURE 3

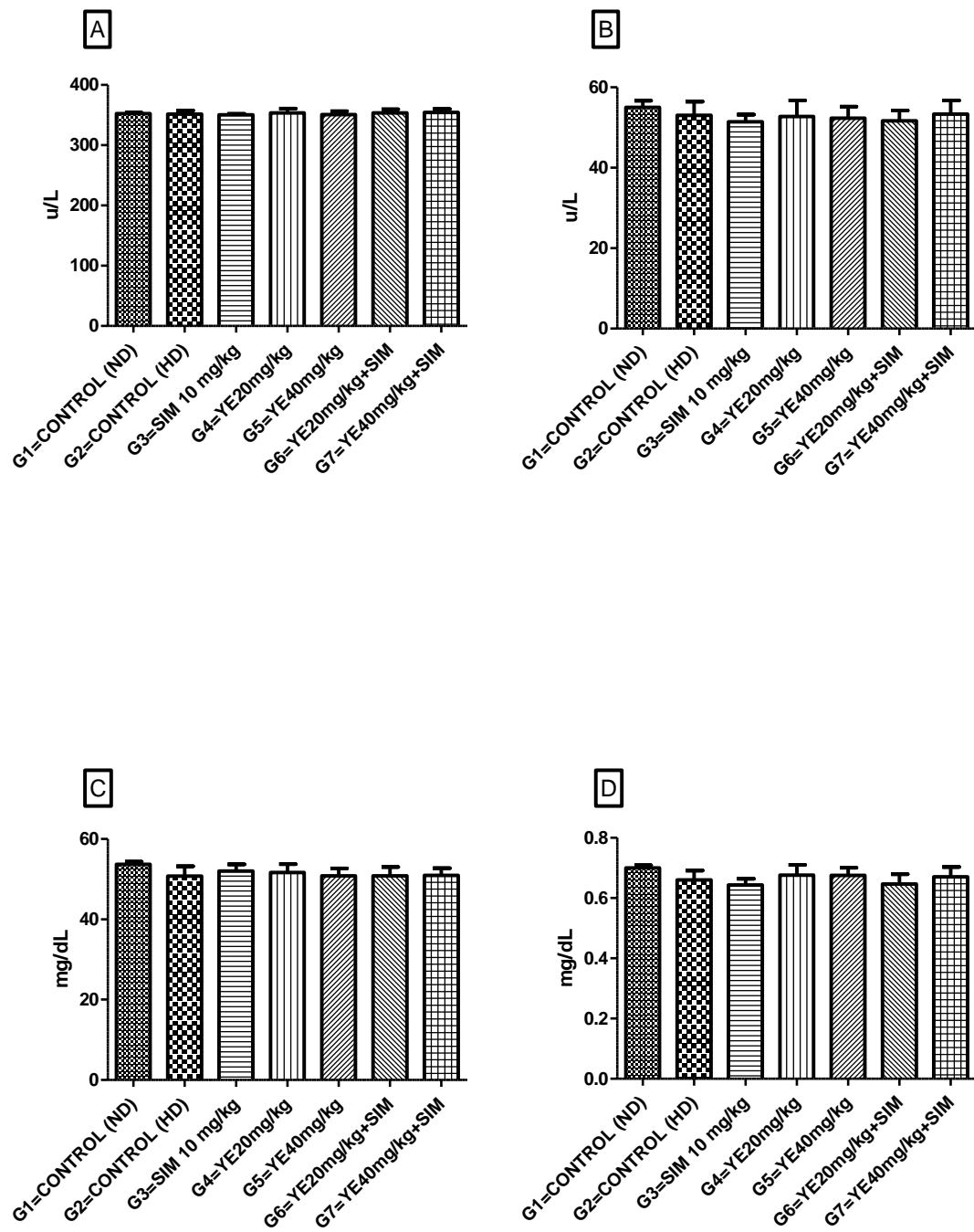




FIGURE 4

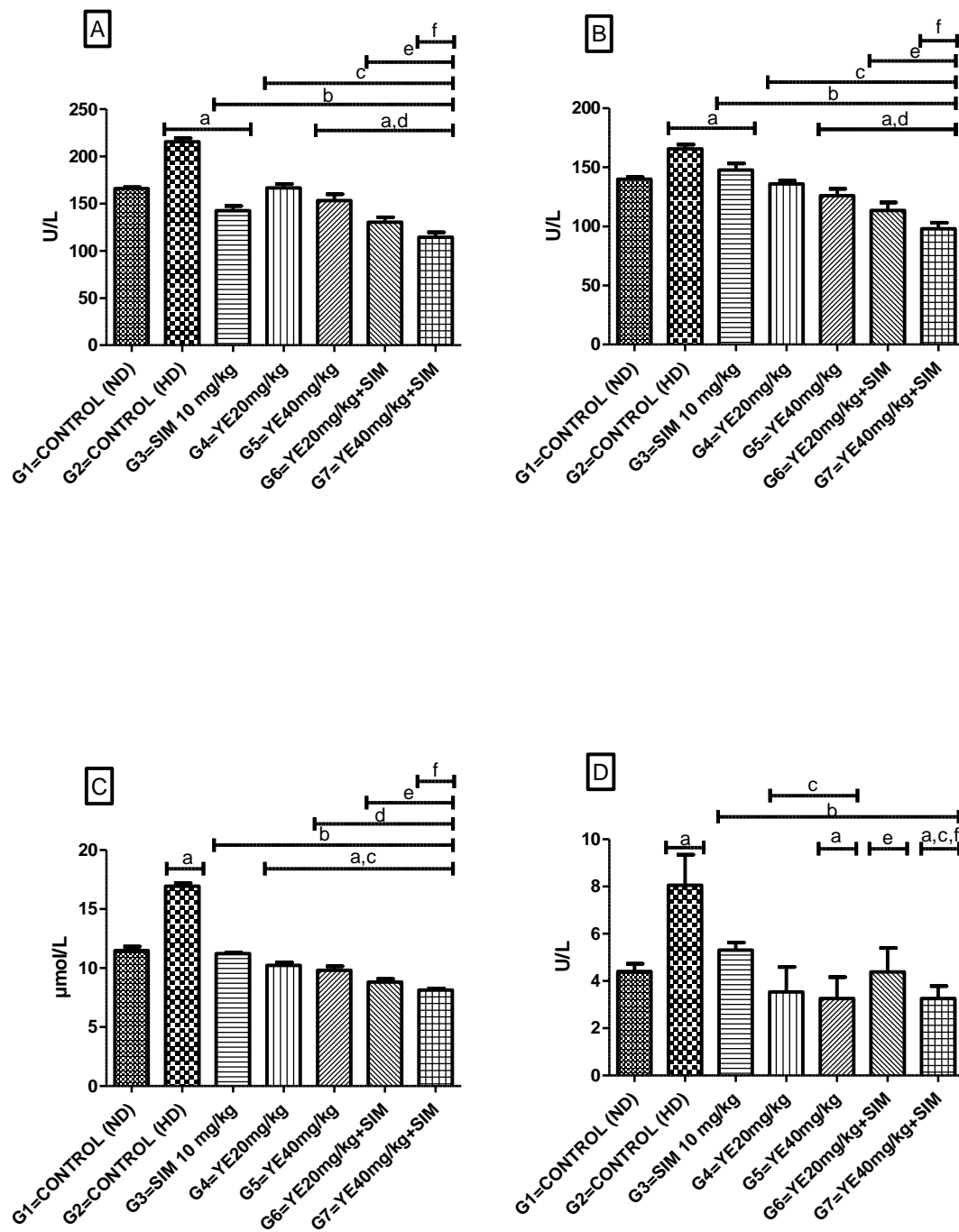


FIGURE 5

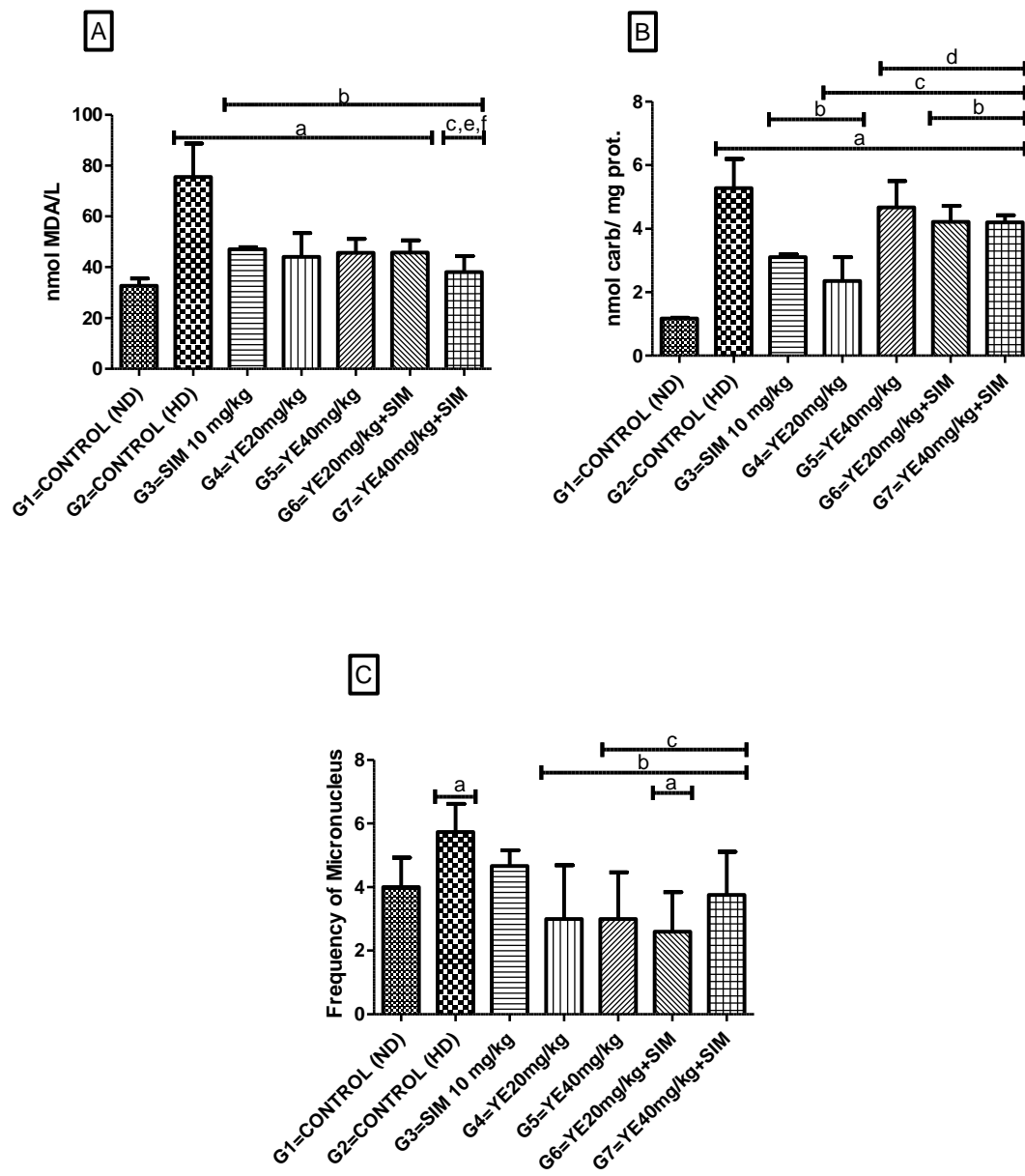
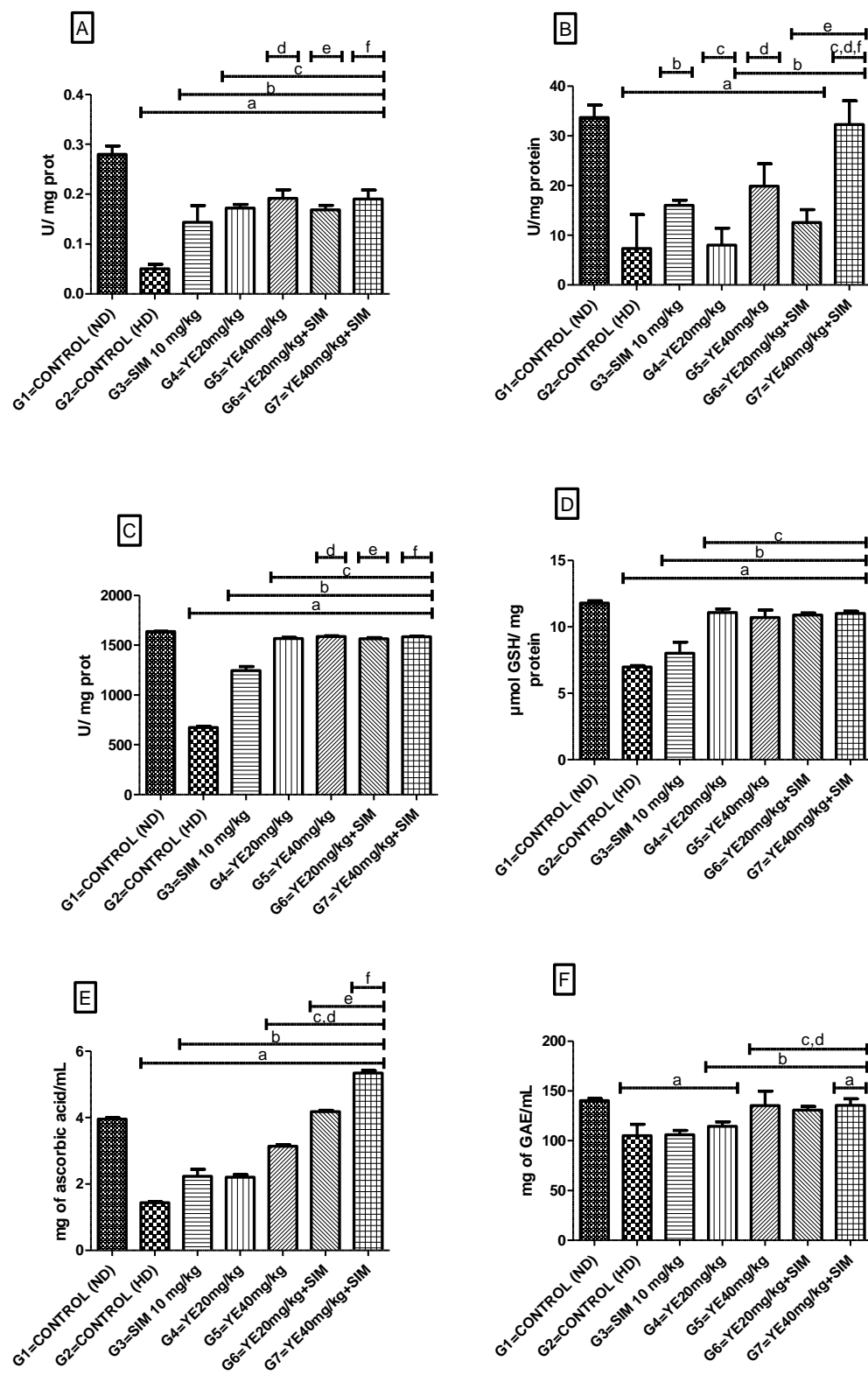


FIGURE 6



### PARTE III

## 6. CONCLUSÕES

Estes resultados indicam que o extrato das folhas e raízes do Yacon:

- possui atividade antioxidante *in vitro*, evidenciada pela atividade sequestradora do radical DPPH, o que pode ser atribuído ao seu elevado teor de compostos fenólicos totais;
- reduziu o processo inflamatório através da contagem de leucócitos totais;
- melhorou perfil lipídico e glicêmico;
- diminui os níveis dos marcadores de dano cardíaco;
- não se mostrou hepatotóxico nem nefrotóxico;
- melhorou parâmetros de estresse oxidativo, tais como peroxidação lipídica, carbonilação proteica, e frequência de micronúcleos;
- aprimorou as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas;
- a administração do extrato da raiz diminuiu o ganho de peso dos animais.

Assim, o Yacon se mostrou uma planta medicinal de futuro promissor, pois nossos resultados demonstraram ter efeito benéfico sobre vários parâmetros importantes da saúde humana.

## **7. PERSPECTIVAS**

- Determinar marcadores inflamatórios como proteína C reativa ultrasensível, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 em plasma
- Realizar a análise histopatológica das artérias, fígado e rim nos grupos já estudados;
- Avaliar os efeitos do extrato bruto e frações da folha e raiz do Yacon em modelo animal com síndrome metabólica.

## REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P.; DE SENA, K. C. M. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. *Revista de Nutrição*, v.21, n.6, p. 749-756, 2008.

ARNÃO, I. et al. Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de la raíz y las hojas de *smallanthus Sonchifolius* (Yacón). *Revista de la Sociedad Química del Perú*. v.78, n.2, p.120 -125, 2012.

ARUOMA, O. I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

ASCASO, J. et al. Management of dyslipidemia in the metabolic syndrome: recommendations of the Spanish HDL-Forum. *American journal of cardiovascular drugs* v.7, n.1, p.39-58, 2007.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v.23 n.4, p. 629-643, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química. Nova*, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BATTIN, E. E.; BRUMAGHIM, J. L. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell biochemistry and biophysics*, v.55, n.1, p.1-23, 2009.

BERBEÉ J. F. P. et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nature communications*, 2015.

BERRA, C. M. & MENCK, C. F. M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p.1340-1344, 2006.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v.23, n.2, p.168-75, 2003.

BONOMINI, F. et al. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histology and Histopathology*, v.23, n.3, p.381-390, 2008.

BORGES, J.T.S. et al. Yacon na alimentação humana: aspectos nutricionais, funcionais, utilização e toxicidade. *Scientia Amazonia*, v. 1, n.3, p. 3- 16, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. Indicadores e Dados Básicos - Brasil – 2012, IDB-2012: Indicadores de Mortalidade. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c08.def>.

CAMPOS, D. et al. Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity, *Food Chemistry*, 135, n.3, 1592-1599, 2012.

COUNDRAY, C. et al. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 51, p.375-380, 2003.

CHEN, H. et al. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. *Molecular and cellular biochemistry*, v. 363, n. 1-2, p. 85-91, 2012.

CIPOLLONE, F.; FAZIA, M. L.; MEZZETTI, A. Oxidative stress, inflammation and atherosclerotic plaque development. International Congress Series, v. 1303, p. 35-40, 2007.

CORRÊA-CAMACHO, C. R.; DIAS-MELICIO, L.A.; SOARES, AMVC. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. Arquivo de Ciências da Saúde, v.14, n.1, p. 41-48, 2007.

DA SILVA, A.S.S. et al. Frutoligossacarídeos: fibras alimentares ativas. Boletim do CEPPA, v. 25, n. 2, p. 295-304, 2007.

DE SOUZA, L. J. et al. Prevalência de Dislipidemia e Fatores de Risco em Campos dos Goytacazes – RJ. Arquivo Brasileiro de Cardiologia, v. 81, n. 3, p.249-56, 2003.

DELGADO, G.T.; et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food. Plant Foods for Human Nutrition, v.68, n. 3, p.222–228, 2013.

DUARTE, M.; MORESCO, R. N.; DE BEM, A. F. Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular. Revista Brasileira de Análises Clínicas, v.40, n.2, p.101-106, 2008.

DUARTE, M.R.; WOLF, S.; PAULA, B,G. *Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob. (yacón): identificação microscópica de folha e caule para o controle de qualidade farmacognóstico. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.44, n. 1, p. 157-164, 2008.

EZZATI, M. et al. Role of smoking in global and regional cardiovascular mortality. Circulation v.12, n.4, p. 489-497, 2005.

FERREIRA, A.L.A.; et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica. v.9, n.1, p. 54-61, 2011.



GASPAROTTO, J. et al. Effects of different products of peach (*Prunus persica* L. Batsch) from a variety developed in southern Brazil on oxidative stress and inflammatory parameters in vitro and ex vivo. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, v.55, n.2, p110-119, 2014

GELEIJNSE, J. M.; HOLLMAN, P. C. Flavonoids and cardiovascular health: which compounds, what mechanisms? *The American journal of clinical nutrition*, v.8, n.1, p. 12-13, 2008.

GENTA, S.B. et al. Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. *Food and Chemical Toxicology*. v.43, n.11, p.1657–1665, 2005.

GENTA, S.B. et al. Yacon syrup: Beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical Nutrition* v.28, n.2, p.182–187, 2009.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* v.125, n.6, p.1401–1412, 1995.

GOTTLIEB, M. G. V.; BONARDI, G.; MORIGUCHI, E. H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. *Scientia Medica*, v. 15, n. 3, p. 203 -207, 2005.

GOMATHI, D. et al. HPTLC fingerprinting analysis of *Evolvulus alsinoides* (L.) L. *Journal of Acute Medicine*, v. 2, n. 3 p.77-82, 2012.

GOMATHI, D. et al. Efficacy of *Evolvulus alsinoides* (L.) L. on insulin and antioxidants activity in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* v.12, n. 1,p. 39, 2013.

GRADINARU, D. et al. Oxidized LDL and NO synthesis Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2015.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 899, p.136-147, 2000.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American journal of clinical nutrition*, v.57, n. 5, p. 715-724, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3. ed. NY: Oxford University Press, 1999.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology*, v.142, n.2, p.231-255, 2004.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, v.141, n.2, p. 312–322, 2006.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of biochemistry and biophysics*. v.476, n.2, p.107-112, 2008.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition reviews*, v.70, n.5, p.257-265, 2012.

HAMID, A. A. et al. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological Applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, v.4, n.8, p. 142-151, 2010.

HE J. et al. Major causes of death among men and women in China. *The New England journal of medicine*, v. 353, n.11, p.1124-1134, 2005.

HONORÉ, S. M. et al. Protective effect of yacon leaves decoction against early nephropathy in experimental diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* v.50, n. 5, 1704–1715, 2012.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, v.31, n.5, p. 1170-1179, 2008.

JUKEMA, J.W. et al. The controversies of statin therapy: weighing the evidence. *Journal of the American College of Cardiology*, v.60, n.10, p.875-881, 2012.

KAUR, R. et al. Oxidative stress—implications, source and its prevention. *Environmental Science and Pollution Research*, p. 1-15, 2013.

MACHADO, S.R. et al. Morfoanatomia do sistema subterrâneo de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robinson (Asteraceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, n. 1, p. 115-123, 2004.

MANFREDINI, V. et al. Apolipoprotein, C-Reactive Protein and Oxidative Stress Parameters in Dyslipidemic Type 2 Diabetic Patients Treated or not with Simvastatin. *Archives of Medical Research*, v. 41, p. 104-109, 2010.

MANSUR, A. P.; FAVARATO, D. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 2012.

MARGIS, R. et al. Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *The FEBS journal*, v.275, n.15, p.3959-3970, 2008.

MARTINS M.L.R.; DELMASCHIO, K.L.; CORDEIRO, A.A. Efeitos da utilização de *Smallanthus sonchifolius* (yacon) no tratamento de indivíduos com *Diabetes Mellitus*. *Revista Ceres: Nutrição e Saúde*. v. 6, n.1 p. 35-43, 2011.

McLAREN, J. E. et al. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Progress in Lipid Research*, v. 50, n.4, p.331-347, 2011.

MILIC, M. et al. Polymorphisms in DNA repair genes: link with biomarkers of the CBMN cytome assay in hospital workers chronically exposed to low doses of ionising radiation. *Archives of industrial hygiene and toxicology*, v.66, n.2, p.109-120, 2015.

MORAES F. P.; COLLA L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, Legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n.2, p. 99-112, 2006.

MOREIRA, N. F. et al. Obesidade: principal fator de risco para hipertensão arterial sistêmica em adolescentes brasileiros participantes de um estudo de coorte. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 57, n. 7, p. 520-526, 2013.

MOURA, R.A. et al. Protective effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) intake on experimental colon carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, v.50, n.8 2902–2910, 2012.

NEVES, V.A.; SILVA, M.A. Polyphenol Oxidase from Yacon Roots (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, n.6, p. 2424-2430, 2007.

NICHOLS, M. et al. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *European heart journal*, v. 35, n. 42, p. 2950-2959, 2014.

OJANSIVU, I.; FERREIRA, C.L.; SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science & Technology* v.22, n.1, p.40-46, 2011.

OLIVEIRA, M.A.; NISHIMOTO, E.K. Avaliação do desenvolvimento de plantas de yacon (*Polymnia sonchifolia*) e caracterização dos carboidratos de reservas em HPLC. *Brazilian Journal of Food Technology* v.7, n.2, p. 215–220, 2004.

OLIVEIRA, L.A.; et al. Respostas glicêmicas de ratos diabéticos recebendo solução aquosa de Yacon. *Alimento e Nutrição Araraquara*, v.20, n.1, p. 61-67, 2009.

OLIVEIRA, T. T. et al. Flavonóides e aterosclerose. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.42, n.1, p. 49-54, 2010.

OTUNOLA, G. A. et al. Selected spices and their combination modulate hypercholesterolemia-induced oxidative stress in experimental rats. *Biological Research*, v. 47, n. 5, 2014.

PAMUKCU, B. et al. The role of monocytes in atherosclerotic coronary artery disease. *Annals of medicine*, v.42, n.6, p.394-403, 2010.

PAULA, H.A.A.; ABRANCHES M. V, FERREIRA, C.L.L.F. Yacon (*Smallanthus Sonchifolius*): A Food with Multiple Functions. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 55, n.1, p.32-40, 2015.

PLANA, N. et al. Prevalence of atherogenic dyslipidemia in primary care patients at moderate-very high risk of cardiovascular disease. *Cardiovascular risk perception, Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, v. 26, n. 6, p. 274-284, 2014.

PUERTOLLANO, M. A. et al. Dietary antioxidants: immunity and host defense. *Current topics in medicinal chemistry*, v.11, n.14, p.1752-1766, 2011.

RAFIEIAN-KOPAEI, M. et al. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *International Journal of Preventive Medicine*, v.5, n.8, p. 927–946, 2014.

REIS, J. S. et al. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v.52, n.7, p. 1096-1105, 2008.

ROSELINO, M.N. et al. A potential synbiotic product improves the lipid profile of diabetic rats. *Lipids in Health and Disease*. 11:114, 2012.

ROSS, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 340, n. 2, p. 115-126, 1999.

ROLIM, P.M. et al. Análise de componentes principais de pães de forma formulados com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*(Poepp.) H. Rob.). *Revista Ceres*, vol.57, n.1, pp. 12-17, 2010.

ROVER-JUNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, v.24, n.1, p. 112-119, 2001.

SANTANA, I.; CARDOSO, M.H. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. *Ciência Rural*, v.38, n.3, p.898-905, 2008.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*, v. 81, n. 1, p. 215S-217S, 2005.

SCHIANO, C. et al. Epigenetic-related therapeutic challenges in cardiovascular disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.36, n.4, p. 226-235, 2015.

SEN, S. et al. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v.3, n.1, p. 91-100, 2010.

SCHER, C.F.; RIOS, A.O.; NOREN, C.P.Z. Hot air drying of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its effect on sugar concentrations. *International Journal of Food Science and Technology* v.44, n.11, p. 2169–2175, 2009.

SCHWERTZ, M.C. et al. Hypolipidemic effect of camu-camu juice in rats. *Rev. Nutr.* v.25 n.1 p. 35-44, 2012.

SILVA, D. C. CERCHIARO, J.; HONÓRIO, K. M. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. *Química Nova*, v.34, n.2, p. 300-305, 2011.

SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, v. 2012, p.26, 2012.

SCHMID, W. The micronucleus test. *Mutation research*, v.31, n. 9, p. 9-15, 1975.

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2007.

SIMONOVSKA, B.; et al. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A*, v. 1016, n. 1, p. 89-98, 2003.

SIQUEIRA, A.F.A.; ABDALLA, D.S.P.; FERREIRA, S.R.G. LDL: da síndrome metabólica à instabilidade da placa aterosclerótica. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 50, n.2, p. 334-343, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 101, n. 6, p.1-63, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 101, n. 4, p. 1-20, 2013.

SREENA, K.P, et al. Evaluation Of In vitro free radical Scavenging efficacy of Different organic Extracts Of *Morinda Tinctoria* Leaves. *Int J Pharm Pharm Sci*, v.13, n. 3, 2011, p.207209, 2011.

STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.899, p.191-208, 2000.

STRONG K, et al. Preventing chronic diseases: how many lives can we save? *Lancet* v.366, n.9496, p.1578-1582, 2005.

TEIXEIRA, A.P, et al. O efeito da adição de yacon no suco de laranja industrializado sobre a curva glicêmica de estudantes universitários. *Alimento e Nutrição Araraquara*, v.20, n.2, p. 313-319, 2009.

TAKENAKA, M. et al. Caffeic Acid Derivatives in the Roots of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Journal of agricultural and food chemistry*, v.51, n. 3, p. 793-796, 2003.

URQUIAGA, I.; LEIGHTON, F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological research*, v.33, n.2, p.55-64, 2000.

VALENTOVÁ, K.; et al. Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. *European journal of nutrition*, v.42, n.1, p.61-66, 2003.

VALENTOVÁ, K.; et al. The biological and chemical variability of Yacon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n. 4, p.1347–1352, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, v.160, n.1, p.1-40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química. Nova*, v.30, n.5, p. 1323-1338, 2007.

VILHENA, S.M.C.; et al. O cultivo de yacon no Brasil. *Horticultura Brasileira*, v. 18, n. 1, p. 5-8, 2000.

YAN, M.H; WANG, X; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology and Medicine*. n. 62, p.90–101, 2013.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, v.54, n.3, p. 176–186, 2001.



WAN AHMAD, W. N. et al. Low serum high density lipoprotein cholesterol concentration is an independent predictor for enhanced inflammation and endothelial activation. PLoS One, v.10, n.1, 2015.

## 8. ANEXOS

### 8.1 Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

**Pró-Reitoria de Pesquisa**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: [ceua@unipampa.edu.br](mailto:ceua@unipampa.edu.br)

---

## **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: **034/2013**

Título: **Avaliação dos efeitos hipolipêmico e antioxidante in vivo dos extratos hidroalcoólicos da folha e raiz do Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**

Data da aprovação: **24/01/2014**

Período de vigência do projeto: De: **01/2014** Até: **01/2017**

Pesquisador: **VANUSA MANFREDINI**

Campus: **URUGUAIANA**

Telefone: **(55) 84075737**

E-mail: **vanusamanfredini@unipampa.edu.br**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Alessandra S. K. Tamajusuku Neis', written over a horizontal line.

Alessandra S. K. Tamajusuku Neis  
Professor Adjunto  
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA