

Capacidad antioxidante de las hojas de Jonote (*Heliocarpus Appendiculatus Turcz*) dentro de su función como forraje alternativo en un sistema agroforestal

CUNILL-FLORES, José María, GUERRA-RAMÍREZ, Diana, VILLA-GARCÍA, Matilde, REYES-TREJO, Benito, ZULETA-PRADA, Holber, SALCIDO, Graciela y SALGADO-ESCOBAR, Irma

J. Cunill, D. Guerra, M. Villa, B. Reyess, H. Zuleta, G. Salcido e I. Salgado

`División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo, Km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, México. C.P. 56230.

``Laboratorio de Productos Naturales, Área de Química, Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Apartado 74, Oficina de Correos Chapingo, Km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo, México, 56230.

``Escuela de Diseño, Ingeniería y Arquitectura, Departamento de Física y Matemáticas, Tecnológico de Monterrey, Campus Ciudad de México, Calle del Puente 222 Col. Ejidos de Huipulco, Tlalpan, México D.F, C.P., 14380
jomacunill@gmail.com

F. Rérez, E. Figueroa, L. Godínez, J. Quiroz y R. García (eds.) Química, Biología y Agronomía. Handbook T-I. - ©ECORFAN, Texcoco de Mora-México, 2016.

Abstract

De acuerdo con la necesidad imperante dentro las cadenas agroalimentarias en regiones Tropicales y Neo-tropicales de reducir su extensión de forraje con mejor rendimiento nutrimental, es necesario explorar y experimentar con forrajes alternativos a través de estudios etnográficos determinar un nuevo uso dentro de un Sistema Agroforestal. En el presente trabajo se analizaron las hojas de jonote para determinar su capacidad antioxidante a partir de un extracto hidro-metanólico. Se determinaron los fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante por los ensayos: del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·). Los resultados se expresaron como Equivalentes de Ácido Gálico (EAG) por gramo de muestra en base seca y en minimoles equivalentes de Trolox (TE) por gramo de muestra en base seca, respectivamente. El contenido de fenoles totales en las hojas fue de: 41.662 ± 05 mgGAEg-1, y la capacidad antioxidante fue de: 257.07 ± 27.18 mmol TEg-1 y 309.33 mmol TEg-1, a partir de los ensayos de DPPH· respectivamente. El contenido relativamente alto de fenoles es indicativo de la presencia de flavonoides y fenilpropanoides principalmente, los cuales son los responsables de la actividad antioxidante de las hojas.

1 Introducción

La necesidad de innovar en forrajes alternativos dentro de Sistemas Agroforestales es clave para la conservación de especies nativas, principalmente arbóreas que han sido utilizadas desde la antigüedad como forraje, pero ante la tendencia productiva actual no son contempladas como tal. El jonote es un árbol de hasta 30 metros de alto y hasta 75cm de diámetro, de fuste cilíndrico y copa pequeña de ramas ascendentes. Corteza externa es lisa, verde grisácea, presenta algunas lenticelas en forma vertical, la corteza interna es muy fibrosa de color rosado-blanco, la cual oxidarse se torna anaranjada (Pennington y Sarukhán, 2005). En la Sierra Norte y Nororiental del Estado Puebla, funge como elemento primordial en cafetales y huertos caseros, donde se desarrolla el elemento animal en aves como gallinas, guajolotes, codornices y de gusano de jonote (*Arsenura armida armida* Cramer) (Cunill y Guerra, 2014). Los forrajes dentro de sus propiedades nutraceuticas se encuentra la capacidad antioxidante, cualidad que reduce el daño por estrés y manejo del ganado. Un antioxidante es una sustancia que actúa incluso en bajas concentraciones inhibiendo el proceso de oxidación de las moléculas (Singh y Kumari, 2015; Halliwell and Gutteridge, 1995).

Compuestos fitoquímicos polifenólicos con variables estructuras fenólicas son llamados en conjunto flavonoides, actuando como antioxidantes. (Laghari et al., 2013). Las propiedades antioxidantes están directamente relacionadas con su concentración de diferentes compuestos fenólicos como flavonoides, antocianinas, taninos y ácidos fenólicos (Djeidane et al., 2006). Fenoles manifiestan su capacidad antioxidante gracias a su capacidad de remover el oxígeno derivado de radicales libres por la donación de hidrógenos o de electrones (Singh y Kumari, 2015; Prietta, 2000).

En los animales de producción las aplicaciones de los antioxidantes se encaminan fundamentalmente para optimizar los rendimientos, de manera que no sólo se obtengan beneficios económicos, sino también mejoras en las calidad de las producciones (carne, huevo, leche) y en la seguridad del consumidor, pudiendo reducir el uso de determinados compuestos sintéticos (Sebastian, 2003) El presente trabajo evalúa la capacidad antioxidante para conocer su potencial nutraceutico del jonote como parte del diseño de nuevos forrajes alternativos para su implementación en Sistemas Agroforestales en regiones Tropicales y Neotropicales de América.

1.1 Materiales y métodos

Reactivos

El reactivo de Folin-Ciocalteu, el carbonato de sodio anhidro, el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) y el 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo (DPPH) fueron adquiridos de Sigma Aldrich.

Instrumentación

La medición de absorbancias para cuantificar los fenoles totales y evaluar la actividad antioxidante se llevó a cabo en un lector de microplacas, equipado con bombas de inyección automática y el software de análisis de datos Gen5™ data (Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)

Preparación de extractos polares

Las hojas de jonote previamente secadas a la sombra y molidas se maceraron en metanol/agua (4:1, v/v) y ácido clorhídrico al 10 % hasta alcanzar un pH=3. La mezcla obtenida se agitó primero en vortex (3 min, 1000 rpm) y después en una incubadora (30 min, 37°C), se sonicó (15 min) y finalmente se centrifugó (15 min, 4000 rpm). El sobrenadante se llevó a un volumen final de 5 mL. A partir de este extracto se tomaran alícuotas para determinar fenoles totales y estimar la actividad antioxidante.

Cuantificación de fenoles totales

Los fenoles totales fueron cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu adaptado a microplacas (Singleton y Rossi, 1965). La curva de calibración de ácido gálico se obtuvo en un rango de concentraciones de 0.02-0.22 mgmL⁻¹

En una microplaca de 96 pozos se mezclaron, en cada pozo, 25 µL del extracto polar de hojas de jonotes (muestra antioxidante) a diferentes concentraciones, 125 µL de agua destilada y 20 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluído 1:10), después de agitar y dejar reposar por 5 minutos, se adicionaron 30 µL de carbonato de sodio al 20 %. La mezcla se dejó incubar durante 60 min en la oscuridad y se leyeron las absorbancias a 760 nm en un lector de microplacas (Synergy HT Multi-Mode Microplate reader, Biotek International). Las mediciones se hicieron por cuatuplicado y los resultados del contenido de fenoles totales se expresaron en miligramos de fenoles equivalentes a ácido gálico por gramos de muestra en base seca ($\text{mg EAG g}_{\text{db}}^{-1}$).

Evaluación de la actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo de acuerdo con el ensayo de alto rendimiento para estimar la capacidad relativa de remoción del radical libre DPPH• con respecto al Trolox (RDSC), desarrollado y validado por Cheng *et al.* (2006). Los valores de RDSC de las disoluciones de muestra fueron reportados con respecto al antioxidante de referencia, trolox, análogo de la vitamina E. También se calculó el valor de la concentración requerida de las muestras antioxidantes (extracto de jonote) para degradar el 50% del DPPH• en la mezcla de reacción (CI₅₀). Todas las disoluciones se prepararon con metanol/agua (4:1 v/v). La disolución stock de DPPH• con una concentración 0.625 mM se preparó el mismo día y se diluyó hasta obtener una concentración final de 0.208 mM. A partir de una disolución stock de trolox 25 mM se tomarán alícuotas para obtener diluciones con las siguientes concentraciones 1.2, 4.8, 9.6, 19.2, 28.6, 36.0 mM. En cada pozo de una microplaca se colocaran 100 µL de las disoluciones de prueba a 5 diferentes concentraciones y 100 µL de las diferentes disoluciones de trolox (todo por cuatuplicado).

Para tener un control se destinaron 4 pozos en los que se adicionaron 100 μL de metanol/agua (80:20 v/v) y una columna completa de pozos donde se adicionaron sólo 200 μL metanol/agua (80:20 v/v, blanco). Después, se adicionarán 100 μL de DPPH \cdot 0.208 mM a todos los pozos con excepción de los que contenían el blanco. El equipo de microplacas se programó para agitar por 30 segundos y posteriormente tomar lecturas de absorbancia a 515 nm, en intervalos de un minuto durante 30 minutos. El porcentaje de DPPH \cdot degradado se calculó de acuerdo a la ecuación (1)

$$\% \text{DPPH}_{\text{Degradado}} = \left[1 - \frac{A_m - A_b}{A_c - A_b} \right] \times 100 \quad (1)$$

donde: A_m , A_b y A_c representan las absorbancias de las disoluciones de prueba, blanco y control, respectivamente, leídas a 515 nm después de 30 minutos de reacción con el DPPH \cdot . Los valores del porcentaje de degradación del DPPH \cdot a diferentes tiempos de reacción obtenidos de la ecuación (1) se graficaron en función del tiempo. A partir de las cinéticas de degradación se calcularon las áreas bajo la curva (ABC) (ecuación 2) de disoluciones de prueba y del trolox a diferentes concentraciones.

$$\text{ABC} = 0.5f_0 + (f_1 + f_2 + f_3 + \dots + f_{i-1}) \quad (1.1)$$

Donde f_0 es el DPPH \cdot inicial y f_i es el DPPH \cdot total consumido. Los datos se procesaron en el programa Microsoft Excel para calcular las áreas bajo la curva de cada tratamiento y del trolox. Para calcular el valor de RDSC (capacidad relativa de atrapamiento del radical DPPH \cdot con respecto al Trolox) se aplicó la ecuación (3) que relaciona el área bajo la curva de las disoluciones de prueba y el área bajo la curva del Trolox, cuando se alcanza el 50 % de degradación del DPPH \cdot .

Los valores de RDSC fueron expresados en mmol de equivalentes de Trolox por gramo de la muestra en base seca ($\text{mmoles ET g}_{\text{db}}^{-1}$)

$$\text{RDSC} = \left(\frac{\text{ABC}_m}{\text{ABC}_T} \right) \times \left(\frac{\text{molaridad del Trolox}}{\text{masa de la muestra}} \right) \quad (1.2)$$

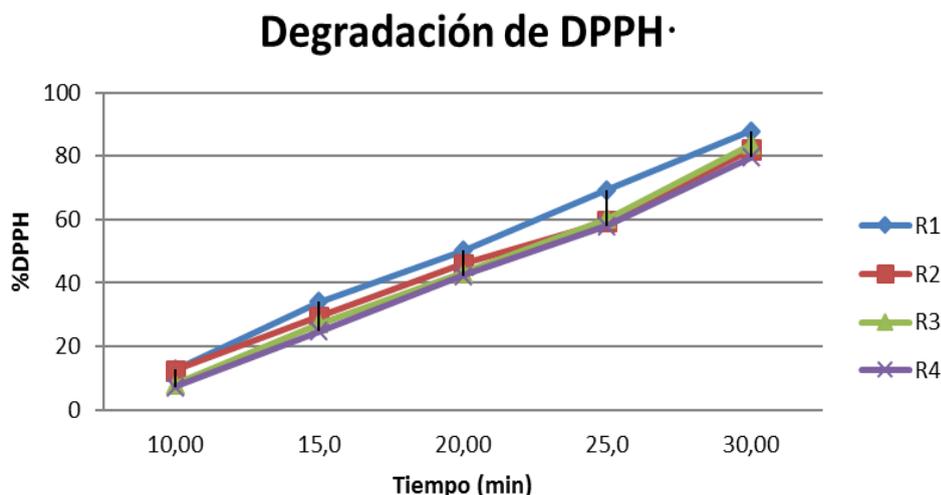
Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente en un diseño completamente al azar. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las medias de los resultados experimentales fueron evaluadas por un análisis de la varianza y comparación de medias por la prueba de rango múltiple de Duncan.

1.2 Resultados y discusión

Respecto al contenido fenólico, la curva de calibración de ácido gálico arrojó la ecuación: $y = 46.36x + 0.0543$ con un coeficiente de correlación de 0.982. Con base a esta curva se calculó que las hojas de jonote contienen 41.662 ± 0.05 mgGAEG $_{-1}$. Estos resultados son equiparables a hojas de árboles tales como *Sapindus mukorrosi* con 53.48 ± 0.18 mgGAEG $_{-1}$ (Singh y Kumari, 2015) y *Saptum sebifera* 48.260 ± 2.901 (R. Fu et al.2015), ambos con potencial nutracútico. El DPPH es una técnica bien conocida por su capacidad secuestradora de radicales libres. Cuando los radicales se neutralizan en presencia de un radical secuestrador, la solución de DPPH cambia de color de un violeta intenso a un ligero amarillo. El grado de reducción de la absorbancia es indicador del incremento de la capacidad antioxidante (Singh y Kumari, 2015). En la figura 1 se aprecia la degradación del DPPH \cdot en función de las diferentes concentraciones de extracto de hojas de jonote durante 30 minutos.

Figura 1 Degradación de DPPH· a diferentes concentraciones de extracto de hojas de jonote



1.3 Conclusión

Se observa que el contenido de compuestos fenólicos está directamente relacionado con la capacidad antioxidante de los extractos. Dentro del sistema nutrimental se encuentra una forma económica, práctica y eficaz de administrar antioxidantes, mejorando así la inocuidad y calidad de la carne; además de reducir el estrés oxidativo fisiológico que afecte la integridad y correcto manejo del animal.

1.4 Referencias

- Cunill-F., J.M., Guerra-Ramírez, D. 2014. Presencia, Ecología y Gestión del Jonote (*Heliocarpus Appendiculatus* Turcz) dentro de Sistemas Agroforestales en Ecatlán, Municipio de Jonotla, Puebla, México. XLI Reunión de la AMPA y VII Reunión Nacional sobre Sistemas Agro y Silvopastoriles. Mérida, Yucatán
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing Phenolic Compounds. *Food Chem.* 97, 654–660.
- Fu, R., Zhang, Y., Guo, Y., Chen, F. 2015. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of Chinese tallow tree leaves. *Industrial Crops and Products* 76 (2015) 374–377
- Laghari, A.Q., Memon, S., Nelofar, A., Laghari, A.H., 2013. *Tecomella undulate* G. Don: A rich source of flavonoids. *Ind. Crops Prod.* 43, 213–217.
- Pennington, T. D., y Sarukhán J., 2005. Árboles Tropicales de México, manual para la identificación de las principales especies, 3a. ed., UNAM, Fondo de Cultura Económica, pag. 350.
- Sebastián, M., 2003. Antioxidantes biomoleculares en nutrición animal-calidad de la carne con bioflavonoides. II Seminario Internacional sobre Producción, Mercado y Calidad de Carne de Porcinos. Florianapolis. Brasil.

Singh, R., Kumari, N., 2015. Comparative determination of phytochemicals and antioxidant activity from leaf and fruit of *Sapindus mukorrossi* Gaertn. – A valuable medicinal tree. *Industrial Crops and Products* 73 (2015) 1–8

Cheng, Z., Moore J., & Yu, L. L. (2006). High-Throughput Relative DPPH Radical Scavenging Capacity Assay. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 7429–7436.