

Extractos del Fruto *Opuntia oligacantha* C. F. Först y la Raíz de la Planta *Jatropha dioica* Cerv. con Actividad Antioxidante y Beneficios Contra Enfermedades Dentales

J.A. Terrazas-Hernández^{1,2}, R. Jiménez-Alvarado^{1,2}, E. M. Santos-López^{1,3}, R. Cariño-Cortés^{1,4}, R.G. Campos-Montiel², A. Hernández-Fuentes^{1,2}.

1 Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana, Área académica de Nutrición, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. **2** Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Rancho Universitario s/n Km. 1. Tulancingo, Hidalgo, 43600, México. **3** Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Pachuca-Tulancingo kilometro 4.5. **4** Instituto de Ciencias de la Salud, Dr. Eliseo Ramírez Ulloa 400, col Doctores Pachuca Hgo, Jorge_terrzas86@hotmail.com

RESUMEN:

La raíz de la planta sangre de drago (*Jatropha dioica* Cerv.), presenta compuestos polifenólicos y terpenos, que forman parte del mecanismo de defensa contra microorganismos. En fruto de xoconostle (*Opuntia oligacantha* C. F. Först) var. 'Ulapa' se reporta un alto contenido de antioxidantes, betalaínas y propiedades antimicrobianas. La resistencia de microorganismos a compuestos sintéticos genera investigación de agentes naturales. Se han empleado extractos de *Jatropha dioica*, para inhibir microorganismos bucales, responsables del desarrollo de la placa dentobacteriana y enfermedades periodontales. El objetivo del trabajo fue determinar la capacidad antioxidante de extractos de *J. dioica* y *O. oligacantha* var. 'Ulapa' bajo tratamientos térmicos y no térmicos, así como su actividad antimicrobiana ante *Streptococcus mutans*. Las variables estudiadas fueron; betalaínas, fenoles totales, flavonoides, actividad antioxidante por DPPH y ABTS y actividad antimicrobiana. El diseño experimental fue completamente al azar y se utilizó la prueba de comparaciones de medias de Tukey ($p \leq 0.05$). Se observó un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides para ambos extractos, el tratamiento térmico aplicado mejoró el contenido de compuestos bioactivos inhibiendo la flora bacteriana nativa. Los extractos de *Jatropha dioica* mostraron actividad antimicrobiana, mientras que los de xoconostle solo retardaron el crecimiento de la bacteria.

Palabras clave: Antioxidante, Fenoles, Antimicrobiano.

ABSTRACT:

The root of the dragon blood plant (*Jatropha dioica* Cerv.), Presents polyphenolic compounds and terpenes, which are part of the mechanism of defense against microorganisms. In fruit of xoconostle (*Opuntia oligacantha* C. F. Först) var. 'Ulapa' reports a high content of antioxidants, betalains and antimicrobial properties. The resistance of microorganisms to synthetic compounds generates research of natural agents. Extracts of *Jatropha dioica* have been used to inhibit oral microorganisms, responsible for the development of dentobacterial plaque and periodontal diseases. The objective of the work was to determine the antioxidant capacity of extracts of *J. dioica* and *O. oligacantha* var. 'Ulapa' under thermal and non-thermal treatments, as well as its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*. The variables studied were; Betalains, total phenols, flavonoids, antioxidant activity by DPPH and ABTS and antimicrobial activity. The experimental design was completely randomized and Tukey's mean comparison test ($p \leq 0.05$) was used. A high content of phenolic compounds and flavonoids was observed for both extracts, the heat treatment applied improved the content of bioactive compounds inhibiting the native bacterial flora. The extracts of *Jatropha dioica* showed antimicrobial activity, whereas those of xoconostle only retarded the growth of the bacterium.

Keywords: Antioxidant, Antimicrobial, Phenols.

INTRODUCCIÓN

Los problemas de salud bucal en México afectan al 90% de la población, estas condiciones se han relacionado con problemas como la desnutrición, endocarditis, neumonías bacterianas, nacimientos prematuros o pérdida de peso en neonatos y en algunos casos causando la muerte. Las enfermedades periodontales generan problemas como mal aliento y cambios en los procesos digestivos debidos a la pérdida de la estructura dental, las causas de estas enfermedades dependen de los cambios en la dieta y de los hábitos de higiene oral entre comidas provocando la formación de la placa dentobacteriana (PDB) y posteriormente la aparición de problemas como gingivitis y periodontitis (Guerrero-Reynoso *et al.*, 2009).

Existen productos que previenen y reducen los problemas bucales, tales como pasta dental y enjuagues, pero el uso prolongado de algunos antisépticos (por ejemplo clorhexidina y povidona yodada) generan daño a la mucosa, irritación de la boca, reacciones alérgicas, decoloración dental, congestión nasal, hipersensibilidad dental entre otro, es por ello que recientemente existe un gran interés en los antimicrobianos naturales, que juegan un papel importante en la inhibición de los microorganismos presentes en la cavidad oral. Existen productos naturales elaborados por la medicina tradicional basada en los componentes bioactivos encontrados en algunos materiales vegetales (Moromi *et al.*, 2014).

En México existe una gran variedad de plantas endémicas en las regiones semiáridas las cuales son fuente de compuestos antioxidantes, antiinflamatorios y antimicrobianos. Una de las plantas utilizadas en la medicina popular mexicana es Sangre de Drago (*Jatropha dioica* Cerv.). Es una planta utilizada en la reducción y prevención de la movilidad dental, analgésico en el dolor de muelas, con actividad antiinflamatoria y antimicrobiana (Wong Paz *et al.*, 2010). Otro producto nativo mexicano que presenta propiedades antimicrobianas y antioxidantes es el xoconostle (*Opuntia oligacantha* C.F. Först) var 'Ulapa'. Los beneficios para la salud asociados con esta fruta se deben a la presencia de fibra, fenoles, flavonoides, betaninas, vulgaxantinas y ácido ascórbico. El uso principal de xoconostle está en la cocina mexicana como condimento siendo un fruto subutilizado y teniendo pérdidas postcosecha (Hernández-Fuentes *et al.*, 2015).

El desarrollo de cepas resistentes a los antibióticos genera la búsqueda de nuevas alternativas de extractos naturales para su aplicación (Wong-Paz *et al.*, 2010). El estudio del presente trabajo se centra en los extractos de sangre de drago y xoconostle var 'Ulapa', los cuales permitirán desarrollar un producto funcional con propiedades antioxidantes y antimicrobianas, previniendo o coadyuvando al tratamiento de enfermedades dentales (placa dentobacteriana, gingivitis y periodontitis).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y Obtención de extractos frescos.

Se utilizó el xoconostle variedad 'Ulapa' (*Opuntia oligacantha* C.F. Först) obtenida de Tezontepec de Aldama, Hidalgo, México (20 ° 11'33"N, 99 ° 16'23"O, 2112 m.s.n.m.). La recolección de las raíces de *Jatropha dioica* se llevó a cabo en el período de sequía en la región de Morelos, Zacatecas, México (22 ° 53'00"N 102 ° 36'00"O, 2348 m.s.n.m.). Los extractos frescos de *Jatropha dioica* (JF) se obtuvieron siguiendo la metodología de Wong-Paz *et al* (2014) con algunas modificaciones. La extracción se realizó con etanol al 70 %, en una relación 1:15 raíz: disolvente. Se eliminó el solvente a 50°C y 50 mbar en un rotavapor y los extractos secos se suspendieron en medio acuoso utilizando un baño ultrasónico. Para obtener los extractos frescos de xoconostle (XF), se utilizó el fruto entero, el fruto fue liofilizado y posteriormente triturado en un molino de doble hoja. Se realizó una maceración con lavados, centrifugando a 17,500 g, para finalmente liofilizar la fase líquida y almacenarla bajo condiciones de oscuridad.

Tratamiento de extractos

Se utilizaron tratamientos térmicos y no térmicos para ambos extractos frescos. El tratamiento térmico fue a

121°C, 15 minutos a 15 psi y el tratamiento no térmico consistió en una centrifugación a 10,000 rpm seguida por una filtración con tamaño de poro de 45 µm, la finalidad de ambos tratamientos es la eliminación de la flora bacteriana nativa de las materias vegetales.

Determinación del contenido de betalaínas en extractos de xoconostle

El método de Nilson (1970) se utilizó para medir betaninas y vulgaxantinas. La muestra se midió espectrofotométricamente a 476, 538 y 600 nm, determinando betaninas y vulgaxantinas.

*Cuantificación del contenido total de fenoles y flavonoides (extractos de xoconostle y de *Jatropha dioica*)*

Los fenoles totales se determinaron por el método de Singleton y Rossi (1965) con modificaciones. Las absorbancias se leyeron a 760 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron en mg GAE•g⁻¹. La determinación de los flavonoides se realizó de acuerdo al método de Arvouet-Grand *et al.*, (1994). Las absorbancias se leyeron a 415 nm, los resultados se expresaron en mg QE•g⁻¹.

Determinación de la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS)

La metodología se utilizó para ambos extractos (*J. dioica* y xoconostle). El método de DPPH se realizó por la metodología de Brand-Wiliams *et al* (1995), las absorbancias se leyeron a 517 nm, utilizando etanol como control, la capacidad antioxidante se expresó en mg de Trolox (mg T•g⁻¹). La medición del radical de ABTS se determinó por la metodología de Re *et al.*, (1999). La absorbancia se leyó a 754 nm y los resultados se expresaron en mg T•g⁻¹.

Ensayos microbiológicos

La cepa utilizada fue *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). El cultivo liofilizado se reactivó de acuerdo a las indicaciones del proveedor en medio de cultivo BHI. La cinética microbiana se realizó en un espectrofotómetro a 600 nm, las mediciones fueron cada 4 horas utilizando celdas de cuarzo, los extractos se trataron térmicamente (121 °C, 15 min a 15 psi) y filtrados (ø 45 µm). Las muestras se incubaron a 37 °C por 48 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del contenido de betalaínas en extractos de xoconostle

El contenido de betacianinas y vulgaxantinas en el fruto entero del xoconostle variedad 'Ulapa' fue mayor a los reportados por Hernández-Fuentes *et al* (2015). El contenido de betacianinas y vulgaxantinas de los extractos XF no presentó diferencias significativas frente a los extractos XCF, sin embargo los extractos XT disminuyeron el contenido de betacianinas en un 85.3% (Tabla II), la temperatura fue el factor más influyente en la degradación de las betalaínas, en donde se observa una reducción gradual del color rojo característico de este pigmento en los extractos XT. La cuantificación de las vulgaxantinas de los extractos de xoconostle se incrementó en un 19.83 % en XT, respecto a XF y XCF (Tabla II). Las vulgaxantinas en estado glicosilado presentan menor actividad antioxidante, la posición C-5 de los grupos hidroxilo en agliconas mejora la actividad antioxidante (Cai *et al.*, 2005), el incremento en la cuantificación de vulgaxantinas de los extractos XT se vincula al efecto térmico modificando su estructura y mejorando su cuantificación, observando cambios en la coloración de rojo a amarillo característico de estos compuestos.

*Cuantificación del contenido total de fenoles y flavonoides (extractos de xoconostle y de *Jatropha dioica*)*

Se incrementó un 75 % en el contenido de fenoles del extracto JT respecto a las muestras JF y JCF de los extractos de *J. dioica* (Tabla I), el tratamiento térmico incremento el contenido de fenoles, el efecto de la temperatura impacta en las propiedades de solubilidad, coeficiente de difusión así como la estabilidad de los compuestos fenólicos presentes (Wan *et al.*, 2011). No se observaron diferencias significativas en el contenido de fenoles entre las muestras JF y JFC de los extractos de *J. dioica* concluyendo que el tratamiento no térmico no afectó al contenido de fenoles en los extractos. Los extractos del fruto entero del xoconostle muestran un

contenido mayor de fenoles (21.55 mgGAE•g⁻¹) respecto a los encontrados por Hernández-Fuentes *et al* (2015). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos térmico y no térmico (Tabla II), la presencia de compuestos como el mucilago brinda una barrera al efecto de la temperatura, dicho compuesto se ha empleado en recubrimientos y formulaciones de películas plásticas, aportando protección a los compuestos bioactivos bajo condiciones de temperatura (Álvarez-Armenta y Peña-Valdivia, 2009).

El contenido de flavonoides en la raíz de *J. dioica*, no presentó diferencias significativas entre los extractos JF y JFC. Los extractos JT presentaron 87.6 % mayor concentración de flavonoides respecto a los extractos JF y JFC (Tabla I). El incremento del contenido de flavonoides en los extractos JT podría estar vinculado con una deglicosilación de los azúcares presentes debido al efecto térmico, los cuales se encuentran unidos a los flavonoides en forma de β -glicósidos, cualquier bloqueo del grupo hidroxilo por glicosilación en la posición C-3 previene su quelación con el Al (III) (Denni y Mammen, 2013). El contenido de flavonoides en los extractos de xoconostle no presentó diferencias significativas entre los tratamientos XF, XCF, pero se observa una reducción del 16% en los extractos XT (Tabla II), la estabilidad de estos compuestos depende de la forma en la que se encuentren interactuando con otros compuestos, su estructura química y su concentración, siendo las agliconas las formas más susceptibles a los cambios de temperatura.

Determinación de la capacidad antioxidante (DPPH y ABTS)

Los resultados obtenidos de los extractos de *J. dioica* por el método DPPH no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos JF, JCF y JT (Tabla I). La capacidad antioxidante se mantuvo tanto en el tratamiento térmico y no térmico a los que fueron sometidos. La actividad antioxidante depende del microambiente en el que se encuentra el compuesto así como sus interacciones (Kuskoski *et al.*, 2005). En la prueba de ABTS los extractos JF no presentaron diferencias significativas respecto a los extractos JCF, pero ambos fueron estadísticamente menores a los extractos JT. Los extractos JT aumentaron la capacidad antioxidante en un 17.7 %. La diferencia al comparar las metodologías DPPH y ABTS, se debe principalmente a la afinidad por los compuestos polares y no polares en ABTS, mientras que para DPPH es hacia los compuestos poco polares (Kuskoski *et al.*, 2005). El tratamiento térmico generó un cambio en la coloración de los extractos (color marrón). La presencia de azúcares reductores, aminoácidos libres y aminos en la raíz de *J. dioica*, se vincula con la formación de productos de las reacciones de Maillard (PRMs) por efecto de la temperatura, generando mezclas de compuestos volátiles como aldehídos, reductonas, compuestos heterocíclicos y compuestos no volátiles (melanoidinas) los cuales contribuyen a la actividad antioxidante (Hwang *et al.*, 2011). La capacidad antioxidante por el método de DPPH en los extractos de xoconostle mostró una reducción de los valores de los extractos de XT respecto a XCF y XF, la cual podría ser debida a la pérdida del color y disminución del contenido de Betacianinas por el efecto de la temperatura. La cuantificación de la actividad antioxidante por el método de ABTS, no generó diferencias significativas entre los tratamientos térmicos y no térmicos (Tabla II).

Ensayos microbiológicos

En la figura 1”A” se muestra la cinética bacteriana del *Streptococcus mutans* a 48 horas. El extracto de *J. dioica* al 0.5 % (p/v), mostró una inhibición del crecimiento de la bacteria, similar al que presentó el enjuague bucal comercial (Paroex, laboratorios Boniquet, Barcelona España). A partir de la hora 28 se observa un incremento en el crecimiento de *S. mutans* en el control positivo (caldo BHI y *S. mutans*). Los extractos de xoconostle al 0.5 % (p/v) no presentaron actividad antimicrobiana, pero si retardaron el crecimiento de la bacteria. La propiedad antimicrobiana observada por los extractos de *J. dioica* a 0.5 y 1 % (p/v) se debe principalmente al alto contenido de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos condensados de alto peso molecular y terpenos como el β -sitosterol (Silva-Belmares *et al.*, 2013).

Tabla I. Determinación del contenido y capacidad antioxidante de los extractos de *Jatropha dioica* bajo tratamientos térmicos y no térmicos.

T	Fenoles (mg GAE•g ⁻¹)	DPPH (mg TE•g ⁻¹)	ABTS (mg TE•g ⁻¹)	Flavonoides (mg QE•g ⁻¹)
JF	*110.96 ± *5.92b	*271.92 ± 1.55a	*292.94 ± 4.85b	*24.14 ± 0.75 b
JCF	*99.25± 0.79b	*273.69 ± 2.93a	*310.68 ± 6.81b	*23.58 ± 0.52b
JT	*194.31± 7.04a	*269.38 ± 2.71a	*345.02 ± 10.57 a	*45.30. ± 0.24a

*Promedio ± DS de 3 repeticiones *Distintas letras minúsculas en la misma columna indican diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de medias de Tukey (P< 0.005). GAE: ácido gálico; TE: Trolox; QE: quercetina; JF: Extracto fresco de *Jatropha dioica*; JCF: Extracto centrifugado y filtrado de *Jatropha dioica*; JT: Extracto tratado térmicamente de *J. dioica*.

Tabla II. Determinación de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de los extractos del xoconostle bajo tratamientos térmicos y no térmicos.

T	Fenoles (mgGAE•g ⁻¹)	DPPH (mg TE•g ⁻¹)	ABTS (mgTE•g ⁻¹)	Flavonoides (mg QE•g ⁻¹)	CB (mg•100 ⁻¹)	CVX (mg•100 ⁻¹)
XF	*21.55 ± 0.80a	*45.12 ± 1.28a	*24.20 ± 1.04a	*14.26 ± 0.31a	*29.09 ± 0.07a	*12.20 ± 0.12b
XCF	*22.37± 0.35a	*42.87± 0.96a	*24.52 ± 0.45a	*13.61 ± 0.41a	*26.63 ± 0.04b	*11.92 ± 0.13b
XT	*22.42 ± 0.37a	*31.82 ± 0.96b	*23.75± 0.28a	*11.69 ± 0.28b	*4.25 ± 0.09c	*14.67 ± 0.40a

*Promedio ± DS de 3 repeticiones *Distintas letras minúsculas en la misma columna indican diferencias estadísticas de acuerdo a la prueba de medias de Tukey (P< 0.005). GAE: ácido gálico; TE: Trolox; QE: quercetina; XF: Extracto fresco de xoconostle; XCF: Extracto centrifugado y filtrado de xoconostle; XT: Extracto tratado térmicamente de xoconostle.

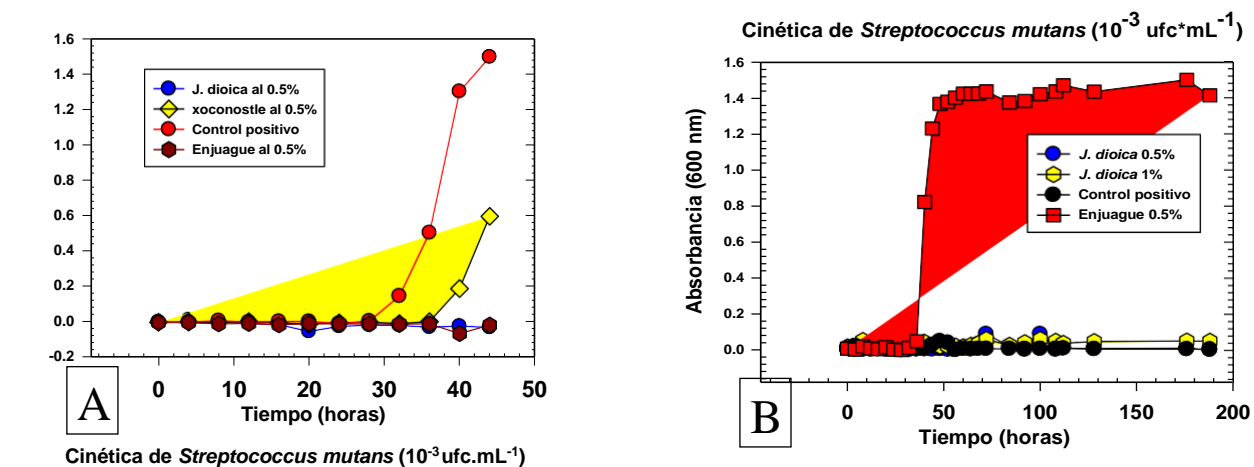


Figura 1. Cinética bacteriana de *Streptococcus mutans*, a 48 y 188 horas respectivamente, las lecturas se realizaron cada 4 horas, la concentración del microorganismo fue de 10⁻³ UFC.mL⁻¹, en la figura A se evaluaron los extractos de *J. dioica* y xoconostle al 0.5% por 48 horas, mientras que en la figura B se evalúan los extractos de *J. dioica* al 0.5 y 1% por 188 horas.

Absorbancia (600 nm)

BIBLIOGRAFÍA

- Guerrero-Reynoso, V.M., García-Godínez, M.A., Melchor-Soto, C.G., Rodríguez-Gurza, M.E. y Luengas-Quintero, E. 2009. Epidemiología de caries dental y factores de riesgo asociados a la dentición primaria en preescolar. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*. 64(3), 10-20.
- Moromi, H., Martínez-Cadillo, E. y Ramos-Perfecto, D. 2014. Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Odontol. Sanmarquina*. 12(1),25- 28.
- Hernández-Fuentes, A.D., Franco-Bañuelos, A., Gallegos-Vazquez, C., Campos-Montiel, R.G. and Pinedo-Espinoza, J. M. 2015. Actividad antioxidante de genotipos de xoconostles (*Opuntia joconostle*) del estado de Zacatecas, México. *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha*. 16(1), 81-85.
- Wong-Paz J.E., Castillo-Inungaray M.L., LópezLópez Ll., Contreras-Esquivel J.C., Nevárez-Moorillon G.V. y Aguilar, C.N. 2010. *Jatropha dioica* Fuente potencial de agentes antimicrobianos. *Revista Científica de la universidad Autónoma de Coahuila* 2(4), 1-5.
- Wong-Paz, J.E., Muñoz-Márquez, D.B., Aguilar-Zárate, P., Rodríguez-Herrera, R. y Aguilar, C.N. 2014. Microplate quantification of total phenolic content from plant extracts obtained by conventional and ultrasound methods. *Phytochemical Analysis*. 25, 439-444.
- Nilsson, T. 1970. Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris* L. ssp. vulgaris var. rubra L.) *Langbrukskshogskolans Annaler*. 36, 179-219.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphotungstic acid reagents. *American Journal Enology and Viticulture*. 16, 1444-1458.
- Arvouet-Grand A., Vennat B., Pourrat A., Legret P. 1994. Standardization d'une extrait de propolis et identification des principaux constituents, *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49, 462-468.
- Brad-Williams, W., Cuvelier, M.E. y Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluated antioxidant activity. *Lebensm Wiss u Technology Journal*. 28, 25-30.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Journal Free Radical Biology and Medicine*. 26, 1231- 1237.
- Cai, Y., Sun, M. y Corke, H. 2005. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science and Technology*. 16, 370–376.
- Wan, C. yu y., Zhou, S., Liu, W., Tian, S. y Cao, S. (2011). Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of *Gynura divaricata* leaf extracts at different temperatures. *Pharmacognosy Magazine* (25), 40-45.
- Álvarez- Armenta, R. and Peña-Valdivia C. B.(2009). Structural polysaccharides in xoconostle (*Opuntia matudae*) fruits with different ripening stages. *Journal of the professional Association for Cactus Development*. 11: 26-44.
- Denni, M. and Mammen, D. 2013. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chemistry*, 135, 1365-1368.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4), 726-732.
- Hwang, I. G., Kim, H. Y., Woo, K. S., Lee, J. and Leong, H. S. 2011. Biological activities of Maillard reaction products (MRPs) in a sugar-amino acid model system. *Food Chemistry*, 126(1), 221-227.
- Martínez, N., Almaguer, G., Vázquez-Alvarado, P., Figueroa, A., Zuñiga, C. and Hernández-Ceruelos, A. (2014). Analisis fitoquímico de *Jatropha dioica* y determinación de su efecto antioxidante y quimioprotector sobre el potencial genotóxico de ciclofosfamida , daunorrubicina y metilmetanosulfonato evaluado mediante el ensayo cometa. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 13(5), 437-457.
- Silva –Belmares, Y., Rivas-Morales, C., Viveros-Valdez, E., Cruz-Galicia, M.G. and Carranza-Rosales, P. 2013. Antimicrobial and cytotoxic activities from *Jatropha dioica* roots. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 1-3.