

Potencial nutracéutico de pastas residuales de higuera y su evaluación en ensayos *in vivo*

Herrera M.D.^{1*}, Santos de la Cruz J.L.², Rosales-Serna R.³, Jiménez-Ocampo R.³, Reveles-Torres L.R.¹

1INIFAP Campo Experimental Zacatecas. Carretera Zacatecas-Fresnillo Km 24.5, Calera de Víctor Rosales, Zacatecas. C.P. 98500. 2Universidad Autónoma de Zacatecas. Facultad de Agronomía. Carretera Zacatecas-Guadalajara Km. 15.5, Cieneguillas, Zacatecas. 3INIFAP Campo Experimental Valle del Guadiana. Carretera Durango-El Mezquital Km 5, Durango, Durango. C.P. 43000 herrera.mayra@inifap.gob.mx

Resumen

La higuera es una planta de importancia industrial debido a que su semilla contiene una gran cantidad de aceite que puede ser transformado en biocombustible. En este sentido, se ha buscado alternativas para agregar valor al residuo que se obtiene de la elaboración de biodiesel. Estos residuos o pastas se han propuesto como alimento de ganado, sin embargo, su alta concentración de fitoquímicos permite proponerlo como fuente de compuesto nutracéuticos con potencial benéfico. El objetivo fue evaluar el contenido de compuestos fenólicos en pastas residuales de higuera después de un tratamiento de detoxificación, y posteriormente analizar su efecto hipoglucémico en ratones Balb C. Se cuantificó fenoles, flavonoides, taninos condensados y antocianinas totales a partir de extractos acetónicos, además, estos extractos se administraron vía intragástrica a ratones sanos en diferentes dosis: 5, 25 y 50 mg/kg, se tuvo un control al cual se administró con solución salina. Los resultados mostraron que el tratamiento térmico empleado en la detoxificación de las pastas residuales redujo la concentración de polifenoles (16-47%); no obstante, fueron suficientes para reducir los niveles de glucosa, principalmente las dosis 5 y 25 mg/kg. Con esto se puede concluir que la pasta residual detoxificada mejora el metabolismo de la glucosa.

Palabras clave: Compuestos fenólicos, detoxificación, glucosa, higuera, nutracéutico, pasta residual.

Abstract

The castor bean plant is a plant of industrial importance due to the great amount of oil contained in its seeds, which can be transformed into biofuel. In this sense, different alternatives have been search in order to add value to the byproduct obtained from the elaboration of biodiesel. These byproducts or residual cakes have been proposed as livestock feed; however, its high phytochemical concentration allows them to be proposed as a source of nutraceuticals whit beneficial potential. The objective was to evaluate the phenolic compounds content of castor seeds residual cakes after a detoxification treatment, and its hypoglycemic effect in Balb C mice. Total phenols, flavonoids, condensed tannins and anthocyanins were quantify from acetonic extracts, additionally, these extracts were administrated intragastrically to healthy mice at different doses: 5, 25 and 50 mg/kg, a control group was established and was administrated with saline solution. Results show that the thermal processing to detoxify the residual cakes decrease polyphenols concentration (16-47 %); however, the remaining were sufficient to reduce glucose levels, especially the 5 and 25 mg/kg doses. It can be concluded that the detoxified residual cake can improve glucose metabolism.

Keywords: Castor bean, detoxification, glucose, nutraceutical, phenolic compounds, residual cake.

Introducción.

La higuera (*Ricinus communis* L.) es una especie herbácea que aprovecha de manera eficiente los recursos ambientales sin competir directamente con los cultivos alimenticios (Jiménez et al., 2012). Comúnmente, el aceite de higuera se utiliza en la producción de biodiesel debido a que muestra alto contenido en lípidos, sin embargo, sus residuos representan un riesgo laboral para los manipuladores por su contenido de compuestos tóxicos y alergénicos como la ricina; por esta razón, las pastas o tortas residuales de la producción de biodiesel a partir de este cultivo no son aprovechadas de manera eficiente, a pesar de ser una buena fuente de proteínas, carbohidratos y minerales (Chakravartula et al., 2007; Jiménez et al., 2013).

Bajo el contexto anterior, los residuos de la extracción de aceite, conocidos como pasta o tortas, deben pasar por un proceso de detoxificación para la eliminación de alcaloides nocivos; no obstante, parte de los compuestos fenólicos permanecen en los residuos desgrasados o tortas, por lo que pudieran ser atractivos como parte de una fuente de sustancias bioactivas (Chakravartula et al., 2007).

Según Jena et al. (2012), además de un alto contenido de compuestos fenólicos como los flavonoides, estudios previos han demostrado que la higuera contiene otros fitoquímicos, por lo que se permite considerar a este cultivo como una planta medicinal que ayuda a preservar una vida saludable. La información anterior destaca el uso de la semilla de higuera como fuente de compuestos con actividad bioactiva (Chen et al., 2008); sin embargo, poco se sabe sobre el uso de las tortas residuales de la producción de biodiesel. Desde un punto de vista económico, Chakravartula et al. (2007) menciona que la extracción de los constituyentes de la higuera a partir de los materiales de residuo, se pueden considerar como un proceso para agregar valor.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue obtener la concentración de compuestos fenólicos de pastas residuales de higuera después de un proceso de detoxificación y evaluar su potencial nutraceutico y efecto sobre ensayos agudos en ratones de la cepa Balb C. Brevemente, los resultados indicaron que el proceso de detoxificación de la pasta residual permite disminuciones en la concentración de compuestos fenólicos, sin embargo, se demostró que la concentración de polifenoles conservada tiene un efecto importante en la regulación del metabolismo de glucosa en los animales experimentales. En conclusión, las pastas residuales detoxificadas de higuera tienen potencial nutraceutico aportando beneficios en la salud.

Materiales y métodos.

Detoxificación de pastas residuales de higuera. Las muestras de higuera fueron recolectadas en el Campo Experimental Valle del Guadiana, Durango, Dgo. Después de la extracción de aceite para la obtención de combustibles, la pasta residual se llevó a un proceso de detoxificación por un método térmico. Brevemente, a 100 g de pasta se agregan 30 mL de agua y posteriormente se esteriliza a 121 °C por 15 min. Finalmente se seca a 60 °C durante 24 y se muelen las muestras para almacenarlas hasta su uso en laboratorio.

Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos totales. Se obtuvo un extracto acetónico de los compuestos fenólicos siguiendo la metodología de Xu et al., (2007), se pesó un gramo de muestra liofilizada y se diluyó con 10 mL de acetona acidificada al 70 % con 0.5 % de ácido acético [(acetona/agua/ácido acético (70:29.5:0.5 v/v/v)], se protegió de la luz y se agitó durante 24 h, posteriormente se centrifugó a 5000 x g durante 10 min a temperatura ambiente, para obtener el sobrenadante. Este sobrenadante fue utilizado para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales mediante el ensayo de Folin-Cioacaltea (Singleton et al., 1999) y los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg EAG g⁻¹). Los taninos condensados se cuantificaron con el método de la vainillina-HCl descrito por Desphande et al. (1985) y los flavonoides totales mediante el ensayo colorimétrico AlCl₃ (Liu et al., 2002). Ambas determinaciones se expresaron como mg equivalentes de (+)catequina por gramo de muestra (mg EC g⁻¹). Finalmente, las antocianinas se cuantificarán por el método diferencial de pH descrito por Abdel-Aal et al. (1999) y los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido por kg de muestra (mg EC3G kg⁻¹).

Preparación de los extractos acetónicos para los ensayos *in vivo*. Los extractos acetónicos obtenidos siguiendo la metodología descrita anteriormente fueron almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriormente liofilizarlos y obtener un polvo del extracto el cual se molió en un molino doméstico. Estos extractos se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Antes de realizar los experimentos *in vivo* los extractos de la pasta residual detoxificada fueron disueltos en solución fisiológica de NaCl al 0.9%. Las diluciones del extracto se realizaron a razón de 5, 25 y 50 mg de muestra por kg de peso corporal del animal.

Curva de glucosa postprandial en ratones administrados con diferentes dosis del extracto de higuera detoxificada. Se evaluó el efecto hipoglucemiante de diferentes dosis del extracto acetónico obtenido a partir de la higuera detoxificada. Esta determinación se realizó *in vivo* con ratones de la cepa Balb-C los cuales conformaron 4 grupos de animales adultos con peso aproximado de $27\text{ g} \pm 1\text{ g}$. Tres dosis del extracto: 5 mg/kg de peso corporal, 25 mg/kg de peso corporal y 50 mg/kg de peso corporal se compararon con un grupo control el cual recibió una descarga de solución fisiológica de NaCl al 0.9%. La administración de las diferentes dosis y la solución fisiológica se realizó vía oral con la ayuda de una cánula para roedores. Para la determinación de glucosa, se extrajo sangre del tallo del animal y la concentración de glucosa (mg/dL) se midió a los 0, 30, 60, 90 y 120 min con un glucómetro de la marca ROCHE. Se utilizaron tiras reactivas de la misma marca.

Curva de tolerancia de glucosa en ratones administrados con diferentes dosis de un extracto de higuera detoxificada. La metodología empleada para la obtención de las curvas de tolerancia es similar a la descrita anteriormente. Previo a la administración de las dosis del extracto de higuera, los animales fueron canulados con una solución de almidón de papa soluble, preparada en solución fisiológica. Los ratones fueron administrados después de un ayuno de 8 horas y posteriormente se realizó la descarga oral de las diferentes dosis del extracto de higuera para la determinación de glucosa en el torrente sanguíneo.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm el error estándar (EE). La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza de 95%. Se realizó la comparación múltiple de medias aplicando la prueba de Tukey. Los análisis se realizaron en el paquete estadístico JMP 5.0.1.

Resultados y Discusión.

Cuantificación de compuesto fenólicos. Se ha reportado que los compuestos fenólicos son fitoquímicos presentes en las plantas como parte de un mecanismo natural del crecimiento y defensa ante condiciones de infecciones y daños en su estructura vegetal. Sin embargo, algunos autores han mencionado que la concentración de estos compuestos puede variar según el tratamiento que recibe la muestra. En este sentido, la concentración de polifenoles puede sufrir cambios o inclusive pérdidas en su concentración después de un tratamiento térmico (Hernández-Saavedra et al., 2013; Xu et al., 2007). En la Tabla I se muestra la concentración de compuestos fenólicos en las pastas residuales de higuera; a partir de las variables respuesta evaluadas en este estudio, se puede observar que la pasta tóxica fue superior en la concentración de polifenoles en comparación con la pasta detoxificada. El tratamiento térmico empleado para la detoxificación de las pastas residuales de higuera permitió pérdidas importantes, principalmente de flavonoides y taninos condensados, con una disminución del 43% y 47%, respectivamente; mientras que la concentración de fenoles totales fue 30% menor en comparación con lo obtenido a partir de la pasta tóxica y únicamente 16% menor en la concentración de antocianinas totales. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Herrera-Hernández et al. (2014), quienes encontraron una disminución importante en el contenido de compuestos fenólicos en muestras alimenticias después de un tratamiento térmico. Se ha mencionado que el incremento en la temperatura induce la degradación de este tipo de fitoquímicos, lo que pudiera traducirse en un menor efecto antioxidante, sin embargo, es importante mencionar que, en muchos casos la concentración de polifenoles que permanece después de algún tratamiento térmico, pudiera ser suficiente para mostrar cierto efecto benéfico en la salud humana (Hernández-Saavedra et al., 2013).

Tabla I. Concentración de compuestos fenólicos en pastas de higuera.

Compuesto	Muestra	
	Tóxica	Detoxificada
Fenoles totales ¹	0.92 ± 0.14 a	0.65 ± 0.08 b
Flavonoides totales ²	2.40 ± 0.02 a	1.38 ± 0.00 b
Taninos condensados ²	6.77 ± 0.01 a	3.60 ± 0.09 b
Antocianinas totales ³	70.90 ± 7.09 a	60.80 ± 5.01 a

Los datos se expresan como la media ± la DE. Letras diferentes entre barras representan diferencia significativa (p<0.05) con la prueba de Tukey. Los resultados se expresan como ¹ mg EAG/g; ² mg ECA/g; ³ EC3G/kg.

Curva de glucosa postprandial después de la administración del extracto de pasta detoxificada en ratones Balb C. Se evaluó el efecto de los extractos de la pasta detoxificada de higuierilla en diferentes dosis de administración (5, 25 y 50 mg/kg) sobre los niveles de glucosa postprandial después de su descarga intragástrica en ratones Balb C (Figura 1). La administración del extracto de dosis 50 mg/Kg incrementó significativamente (p<0.05) el pico hiperglicémico en el minuto 30, en comparación con el control (14%).

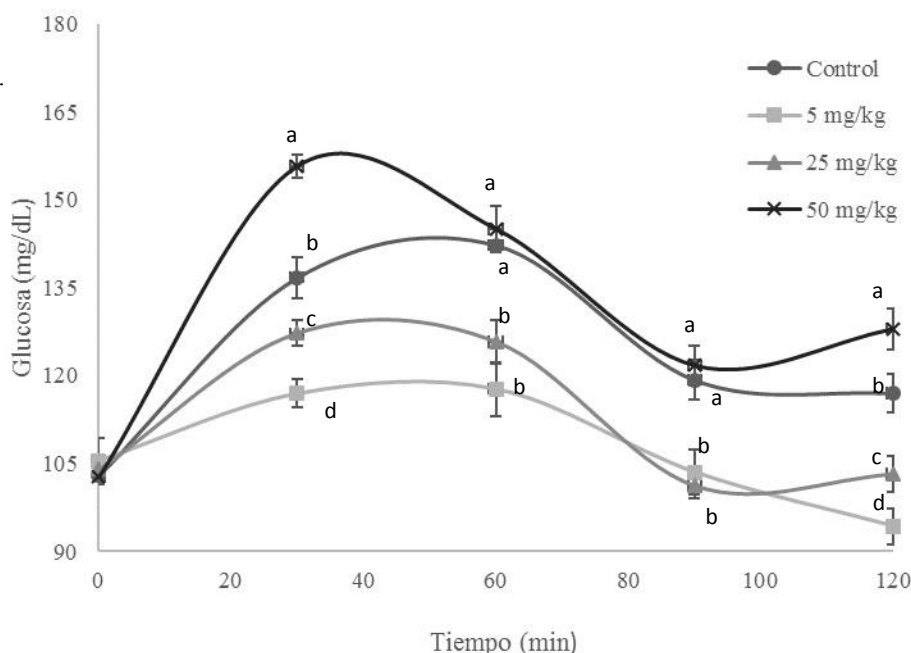


Figura 1. Curva de glucosa postprandial en ratones Balb-C después de la administración de extractos de higuierilla detoxificada.

Sin embargo, las ratas tratadas con las dosis de 5 y 25 mg/Kg presentaron el pico por debajo de lo que se obtuvo para el control, con una disminución del 15% y 7%, respectivamente. Después de 120 min, los animales administrados con la menor dosis del extracto tuvieron menores niveles de glucosa basal (94.25 mg/dL) aún en comparación con el control, mientras que los ratones que recibieron la descarga de 50 mg del extracto por kg de peso corporal, presentaron los niveles superiores de glucosa en torrente sanguíneo con 128 mg/dL. El efecto hipoglucémico de los extractos de las pastas detoxificadas de higuierilla pudiera estar relacionado con su concentración de polifenoles, ya que se ha reportado que la presencia de compuestos fenólicos en extractos de

plantas tiene la capacidad de atenuar el rango de absorción de glucosa y mejorar la resistencia a la insulina (Yoshikawa et al., 2001).

Curva de tolerancia de glucosa después de la administración del extracto de pasta detoxificada en ratones Balb C. Una prueba oral de tolerancia a la glucosa se realizó en ratones sanos, a los cuales se les administró las diferentes dosis del extracto, seguido de una descarga de almidón (Figura 2). El pico hiperglicémico se alcanzó a los 60 min tanto para los ratones control, como para los ratones de los grupos tratados con 5 y 25 mg del extracto por kg. Contrariamente, con la dosis de 50 mg/kg, los ratones alcanzaron este pico a los 90 min. Existe una diferencia significativa entre los tratamientos 5 y 25 mg/Kg y el control ($p < 0.05$), en comparación con el mismo tratamiento (50 mg/Kg). Se puede observar que el pico hiperglicémico del grupo de ratones control fue mayor al de los grupos de tratamiento, sin embargo, la máxima diferencia en la concentración de glucosa fue al realizar esta comparación con la dosis 50 mg/kg, ya se obtuvo una disminución del 11% en el min 60, lo que se pudiera explicar con el propio retardo del pico en los ratones tratados con esta dosis. Después de los 120 min, el control negativo alcanzó niveles de glucosa similares a lo obtenido por suministración de la dosis 25 mg/kg, mientras que la dosis de 5 mg/kg permitió el mayor descenso en glucosa sanguínea con 135 mg/dL.

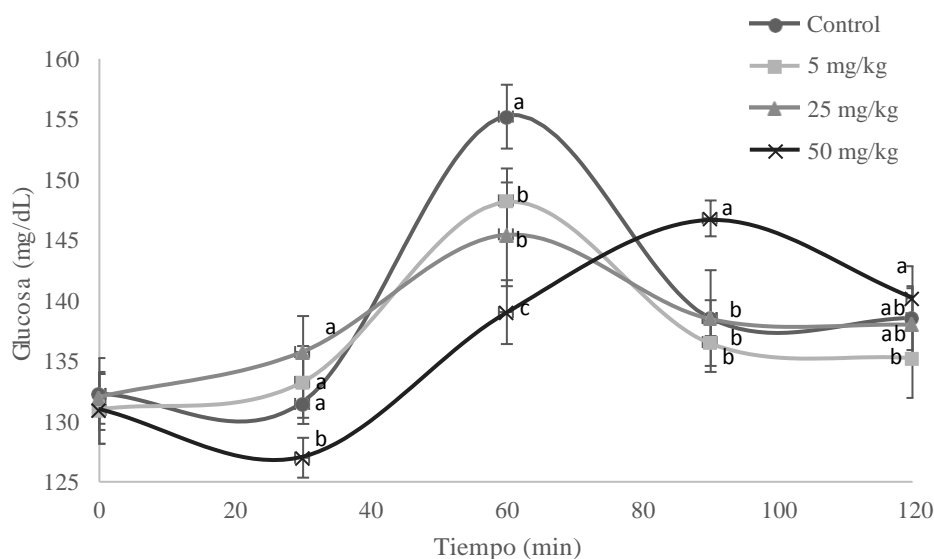


Figura 2. Curva de tolerancia de glucosa en ratones Balb-C después de la administración de extractos de higuera detoxificada.

La administración de los extractos de pasta de higuera, especialmente las dosis de 5 y 25 mg/kg, disminuyeron el pico hiperglicémico al minuto 60; por lo anterior, el efecto hipoglucémico de estos extractos pudiera estar relacionado con el incremento de la producción y/o secreción de la insulina, así como con la disminución de la absorción intestinal de la glucosa. Esto pudiera estar relacionado con la concentración de fitoquímicos como los polifenoles, por ejemplo, flavonoides, ya que se ha reportado que compuestos de esta naturaleza disminuyen los niveles de glucosa en el torrente sanguíneo por medio de la modulación de enzimas glucogénicas (Prince et al., 2006).

Bibliografía

- Abdel-Aal SM & Hucl P. 1999. A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheat. *Cereal Chemistry*. 76:350-354.
- Chakravartula, S.V.S.&Nagaraj, G. 2007. Identification and characterization of phenolic compounds in castor seed. *Natural Product Research*. 21: 1073-1077.
- Chen, Z., Zhang, J. &Chen, G. 2008. Simultaneous determination of flavones and phenolic acids in the leaves of *Ricinus communis* Linn. by capillary electrophoresis with amperometric detection. *Journal of Chromatography B*. 863: 101-106.
- Deshpande SS & Cheryan M. 1985. Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry beans. *Journal of Food Science*. 50: 905-910.
- Hernández-Saavedra D, Mendoza-Sánchez M, Hernández-Montiel HL, Guzmán-Maldonado HS, Loarca-Piña GF, Salgado LM & Reynoso-Camacho R. 2013. Cooked common beans (*Phaseolus vulgaris*) protect against β -cell damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Plant Foods for Human Nutrition*. 68: 207-212.
- Herrera-Hernández, M.G., Acosta-Gallegos, J.A., Salinas-Pérez, R.A., Bernardo-Casas, A.M. & Guzmán-Maldonado, S.H. 2014. Componentes relacionados con la salud en semillas de frijol deplantas crecidas bajo riego y estrés hídrico terminal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 5: 87-99.
- Jena-Jitendra. & Kumar Gupta- Ashisk. *Ricinus communis* linn: a phytopharmacological review. 2012. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol 4:1-5.
- Jiménez- Ocampo R., Cervantes- Martínez R., Vallejo- Valdez J.A., Rosales- Serna R. & Rios- Saucedo J.C. Perfil de aminoácidos de pastas residuales de piñón tropical (*Jatropha curcas*) e higuerilla (*Ricinus communis*).2012. *Agrofaz* 12: 1-4
- Jiménez-Ocampo R., Rodríguez-González J.A., Ruiz-Flores L.A., Mateos-Díaz C. & Rosales-Serna R. Detoxicación de pastas de higuerilla y jatropha. 2013. INIFAP.Folleto técnico Núm. 71:1-40.
- Liu, M., Qi Li, X., Weber, C., Yong, L.C., Brown, J. & Hai, L.R. 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2926-2930.
- Prince, P. & Kamalakkannan N. 2006. Rutin improves glucose homeostasis instreptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*. 20:96-102.
- Singleton VL, Orthofer R & Lamuela RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods enzymol*. 299: 152-178.
- Xu BJ & Chang SKC. 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*. 2: 159-166.
- Yoshikawa, M., Murakami, T., Kishi, A., Kageura, T. & Matsuda, H. 2001. Medicinal flowers. III. Marigold: Hypoglycemic,gastric emptying inhibitory and gastroprotective principlesand new oleanane-typetriterpene oligoglycosides,calendasaponins a, b, c, and d, from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chem Pharm Bull* 49:863–870.