

05

Fecha de presentación: enero, 2021

Fecha de aceptación: marzo, 2021

Fecha de publicación: abril, 2021

POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE HOJAS DE GUANÁBANA (*ANNONA MURICATA* L.) PARA SISTEMAS PRODUCTIVOS DE BANANO

THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF GUANÁBANA LEAVES (*ANNONA MURICATA* L.) FOR BANANA PRODUCTIVE SYSTEMS

Michael Xavier Zhapan Revilla¹

E-mail: mzhapan_est@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5536-435X>

Kevin Lima Morales¹

E-mail: klima1@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2355-3604>

María de los Ángeles Bernal Pita Da Veiga²

E-mail: angeles.bernal@udc.es

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3217-5986>

Alexander Moreno Herrera¹

E-mail: amoreno@utmachala.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8898-4195>

¹ Universidad Técnica de Machala. Ecuador.

² Universidad de Coruña. España.

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Zhapan Revilla, M., Lima Morales, K., Bernal Pita Da Veiga, M. A., & Moreno Herrera, A. (2021). Potencial antioxidante de hojas de guanábana (*Annona muricata* L.) para sistemas productivos de banano. *Revista Científica Agroecosistemas*, 9(1), 35-40.

RESUMEN

La guanábana (*Annona muricata* L.) contiene un gran número de compuestos con potencial antioxidante estrechamente ligados a los compuestos fenólicos presente en el tejido vegetal, el extracto de Guanábana posee más de 200 compuestos bioactivos se han aislado de la hoja y la pulpa de la fruta, en su mayoría pertenecen a los grupos de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, glicosidos, y acetogeninas. El presente trabajo propone el análisis de extractos acuosos de hojas de cinco cultivares, detallando puntos de muestreo como posición de hojas en copa y en rama, como posibles potenciales antioxidantes. En la cuantificación de biomoléculas antioxidantes se utilizó el método de Folin-Ciocalteu y DPPH como sustancias que promueven cambios de coloración en contacto con biomoléculas antioxidantes. El contenido de fenoles solubles totales permite identificar dos cultivares con valores que divergen entre las muestras, en el cultivar 2 en toda su sección baja y copa, en parte de rama inicial, media y final expresados en mg EAG/gMS con valores de 7,80; 6,64; 7,94 y en de 7,19; 7,80; 8,20 respectivamente, el cultivar 5 en la sección copa, en rama parte final de 6,72. La actividad antioxidante identifica dos cultivares con valores que se derivan dentro de todos los puntos muestrales, el cultivar 4 en su sección baja e iniciando la rama expresadas en mg ET/gMS con 179,45 y sección copa al inicio de rama 213,77, y el cultivar 5 en su sección copa al final de rama con 173,55. El punto más significante está en cultivar 5, en la sección copa de la planta, parte final de la rama.

Palabras clave:

Extracto, fenoles, guanábana, antioxidantes.

ABSTRACT

Soursop (*Annona muricata* L.) contains a large number of compounds with antioxidant potential closely linked to phenolic compounds present in the plant tissue. Soursop extract has more than 200 bioactive compounds that can be isolated from the leaf and pulp of the fruit, mostly belonging to the groups of alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, glycosides, and acetogenins. This research analyzes aqueous extracts of leaves of five cultivars, detailing sampling points such as position of leaves in the treetop and on the branches and how these relate to their potential as antioxidants. In the quantification of antioxidant biomolecules, the Folin-Ciocalteu and DPPH methods were used as substances that promote color changes in contact with antioxidant biomolecules. The content of total soluble phenols allows identifying two cultivars with values that diverge between samples, in cultivar 2 in all its lower section and crown, in part of initial, middle and final branch expressed in mg EAG/gMS with values of 7.80; 6.64; 7.94 and 7.19; 7.80; 8.20 respectively, cultivar 5 in the crown section, in branch final part of 6.72. The antioxidant activity identifies two cultivars with values that are derived within all sample points, cultivar 4 in its lower section and beginning of the branch expressed in mg ET/gMS with 179.45 and cup section at the beginning of branch 213.77, and cultivar 5 in its cup section at the end of branch with 173.55. The most significant point is in cultivar 5, in the crown section of the plant, final part of the branch.

Key words:

Extract, phenols, soursop, antioxidants.

INTRODUCCIÓN

Las plantas de *A. muricata*, perteneciente a la familia (Annonaceae), también llamada guanábana, o graviola es una planta tropical que se encuentra ampliamente distribuida en parte de las Américas, Asia, Australia y África. Mide de 8 a 10 m de altura, posee hojas obovadas, oblongas o acuminadas en diferentes grados con peciolo cortos, y sus hojas gruesas que son brillantes en la parte superior, esto debido a sus diversas características fenotípicas (Sanusi & Abu Bakar, 2018; Orak, et al., 2019). El cultivo de guanábana, en Ecuador tiene un aproximado de 800 ha dedicadas a la producción de esta fruta de acuerdo con el Programa de Fruticultura del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (Moreira, et al., 2020), al ser una actividad con buena aceptación y alto realce, cuenta con una participación de 0.3% en la exportación de frutas no tradicionales del Ecuador, en comparación a otras frutas que llevan varios años en el mercado Internacional (Zavala, 2017).

En la actualidad existe una clara tendencia a la aplicación de compuestos con propiedades antioxidantes. Debido a la acción de la actividad de agentes oxidativos exógenos o que se pueden generar a partir de reacciones metabólicas normales. Estos agentes oxidativos pertenecen a especies reactivas del oxígeno (ROS) y especies reactivas del nitrógeno (RNS), que son capaces de destruir biomoléculas como lípidos, proteínas, aminoácidos, y ADN (Machlin & Bendich, 1987, Gyesei, et al., 2019). Los extractos de hoja de Guanábana han demostrado poseer propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Potencial uso en pesticidas botánicos), más de 200 compuestos bioactivos se han aislado de la hoja y la pulpa de la fruta, la mayoría perteneciente al grupo de los alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, glicosidos, y acetogeninas (Shabana, et al., 2017; Orak, et al., 2019).

Estos potenciales de biomoléculas antioxidantes son demandadas por cultivos locales como banano, que están haciendo su conversión de sistemas productivos convencionales a orgánicos. Unos de los principales productos de exportación no petroleros es el banano, siendo unos de los principales ingresos económicos no petroleros, producto de la exportación durante los años de auge en 1945 a 1960 en el Ecuador, la provincia de El Oro es uno de los más alusivos en el desarrollo agrícola bananero (Palomeque, 2016). Una de las principales causas de la baja productividad son las plantaciones con más de 40 años de edad que requieren renovar estos sistemas convencionales (Ordoñez, et al., 2019), el uso en altas concentraciones de fungicidas altera el hábitat de los microorganismos generadores de fertilidad del suelo (Cycoñ, et al., 2010), y la incidencia de los factores abióticos, la disminución de la temperatura alterando los procesos metabólicos y fotosintéticos (Melo, et al., 2009).

Ante esta realidad bananera, se identifican potencialidades vegetales locales como bioestimulantes y fortificantes como opción para las generaciones venideras para la producción agrícola sostenible y como alternativa a los productos químicos sintéticos (Hayat, et al., 2018). Resultados previos confirman primeros avances con la utilización de extractos acuosos en el cultivo banano Williams, al aplicar diferentes concentraciones de extracto de *Moringa oleifera* Lam, en la fase aclimatación de las vitro-plantas (Ugarte, et al., 2018).

El objetivo del trabajo fue determinar la capacidad antioxidante de *A. muricata* por medio de análisis de extractos acuosos para indicar los cultivares potenciales como fuentes antiestrés de sistemas bananeros a través de técnicas y protocolos de espectrofotometría en cinco cultivares de Guanábana, cuatro a nivel local y una comercial del cantón Las Lajas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó durante los meses de septiembre hasta noviembre de 2020 en el laboratorio de Micropropagación vegetal de la Granja Santa Inés de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Machala (UTMACH) ubicada a (3° 17'30" S; 79° 54'51" W) donde se obtuvo el material vegetal para análisis de cuatro cultivares de guanábana del banco de germoplasma local y un cultivar en producción en la Quinta "La Leticia", parroquia San Isidro en el cantón Las Lajas perteneciente a la provincia de El Oro ubicada a (3° 44'39" S; 80° 00'11" W). El presente trabajo contó con el apoyo de la compañía Biofábrica Montubia BIOMONT S.A.S para el análisis bioquímico de las muestras vegetales de guanábana y vitroplantas de banano expuestas a extractos vegetales.

Para llevar a cabo la investigación, se recolectaron hojas de *A. muricata* de 5 cultivares (Figura 1), donde los cultivares A, B, C, D fueron recolectadas en UTMACH y seleccionadas por presentar mejores características fenotípicas, así como adaptabilidad al mostrar abundancia del follaje, este carácter como potencial para la producción de hojas destinadas a sistemas productivos fortificantes. En el caso del cultivar E recolectada en la Quinta "La Leticia", la selección tiene el rol de plantas en producción de fruto que requieren podas constantes y requiere de explotar valores agregados diversos al sistema productivo (Figura 1).

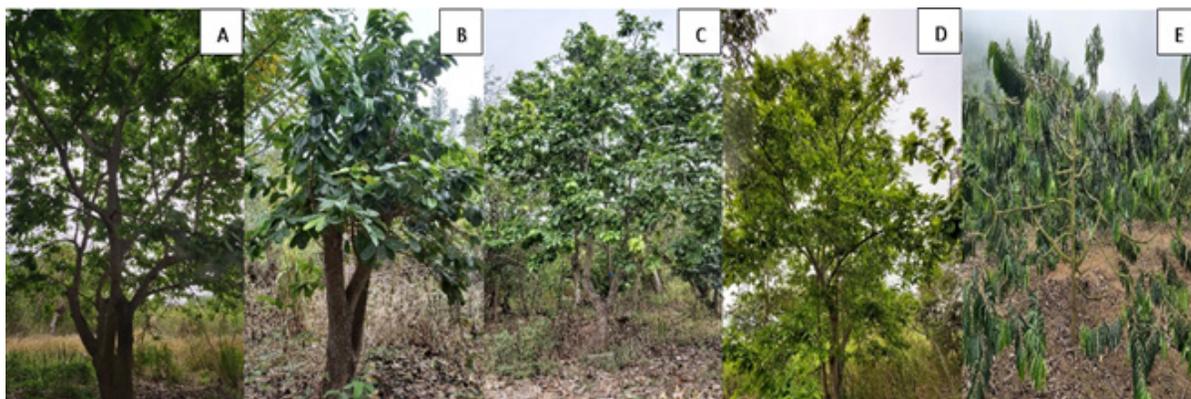


Figura 1. Fuente de material Vegetal. Diferentes cultivares utilizadas como fuente de material vegetal para extracción de muestras de hojas de Guanábana dentro de un entorno no controlado (A), (B), (C), (D), el cultivar recolectada en un sistema productivo situado en la parroquia San Isidro del cantón Las Lajas (E).

La selección de muestras en copa y ramas, responden a actividades de manejo del cultivo y del potencial de hojas en los cultivares. Las muestras seleccionadas fueron en la parte baja, media y la copa de la planta, así como de parte inferior, media y final de la rama (Figura 2).

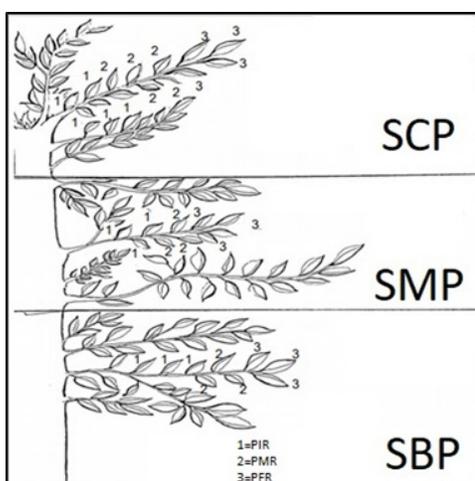


Figura 2. Puntos de muestreo. Bóse de ubicación e identificación de los puntos muestra en distintas partes de la planta (SCP=Sección copa planta), (SMP=Sección media planta), (SBP=Sección baja planta) y distintas partes de la rama (PIR=Parte inicial rama), (PMR=Parte media rama), (PFR=Parte final rama).

El proceso de extracción es esencial para la separación y recuperación de compuestos bioactivos de plantas, convierte la matriz real en una muestra adecuada para el procedimiento analítico posterior (Belwal, et al., 2018). El material vegetal, fue colocado en estufa a temperatura de 70 °C durante 24 horas, lo cual permitió obtener un secado homogéneo de las muestras. Con un mortero de porcelana se procedió a macerar hasta conseguir un polvo muy fino de las hojas, posteriormente se guardaron en bolsas de cierre Zip, envueltas en una capa de papel aluminio a temperatura ambiente, con el fin evitar la disminución de los componentes antioxidantes y fenólicos por la incidencia de la luz y la humedad del ambiente.

De cada tratamiento tuvimos tres muestras, las cuales se pesaron en 0.1 gramo directamente en eppendorf, en donde se agregó 1 mL de agua destilada hirviendo, reposando durante 5 minutos. Después de este tiempo de enfriamiento, se posicionaron en cada sitio de la centrífuga, teniendo en cuenta el peso con su contraparte de cada muestra, una vez listo centrifugamos a 10000 rpm durante 15 minutos en una centrífuga (MiniSpin plus-Eppendorf AG, Hamburg). Una vez finalizado los 15 minutos, es extraída la parte acuosa para ser depositada en un tubo graduado con punta cóncava, para enrasar a un volumen final de 5 mL y posteriormente ser almacenados en tubos Vacutainer™ a -4°C, hasta realizar la cuantificación de fenoles solubles y actividad antioxidante (Figura 3).

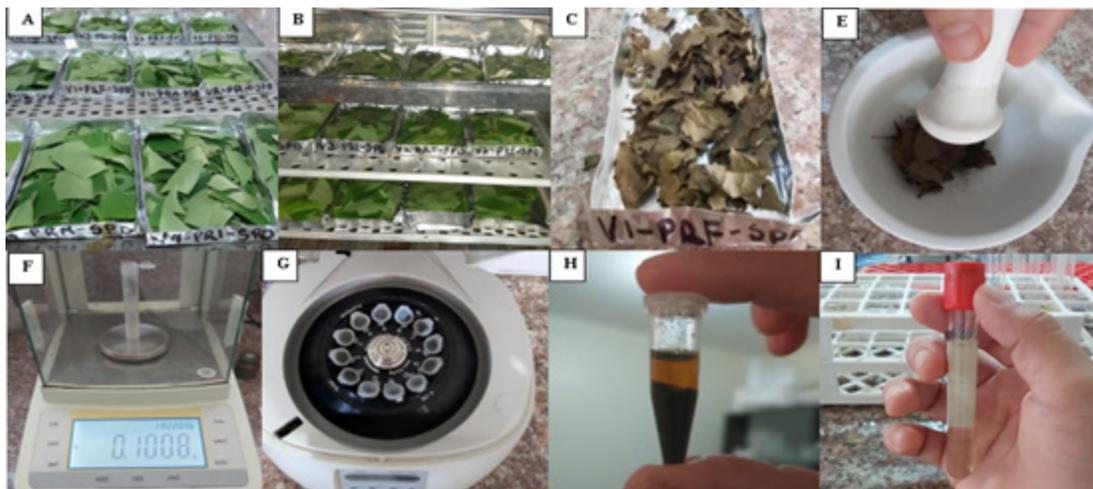


Figura 3. Proceso de extracción. Procedimiento secado (A, B, C), macerado (E), pesado (F) y centrifugado de las muestras (G), para su extracción y almacenamiento de la parte acuosa (H, I).

Los fenoles vegetales son los metabolitos secundarios más abundantes de las plantas, han atraído cada vez más atención debido a sus potentes propiedades antioxidantes (Dai & Mumper, 2010). Las valoraciones de fenoles solubles se realizaron mediante el método de Folin & Ciocalteu (1927), modificado por Kraujalyte, et al. (2015).

Para valorar el contenido de fenoles, y optimizar el uso de reactivo se optó por realizar una recta de calibrado a proporción 1:10 de Folin-Ciocalteu (AG) de acuerdo al método modificado, la cual posibilita cuantificar el contenido de fenoles en muestras, en la preparación se requiere el empleo de diferentes soluciones de ácido gálico al a distintas concentraciones: 0.01mg de AG/ml, 0.02 mg AG/ml, 0.05mg AG/ml, 0.1mg AG/ml, 0.2mg AG/ml de metanol. De las cuales se extrajo tres veces 100µl añadiendo a cada una, la alícuota de 1000 µl de Folin-Ciocalteu previamente disuelto 10 veces. Dejar en reposo durante 4 minutos en oscuridad, posterior al reposo se adicionaron 1000µl de Na₂CO₃ concentrado al 7% y 400 µl de agua destilada a cada uno de los tubos. En segunda ocasión dejar en reposo por 90 minutos en oscuridad para ser efectuadas las lecturas en el espectrofotómetro. Como resultado de la recta de calibrado, se obtuvo como ecuación: Absorbancia 760 nm=3.8292 [equivalentes de ácido gálico]+0.0303 con R² = 0.997, para cuantificar la cantidad presentes de polifenoles solubles.

A partir de las muestras enrasadas a 5ml y almacenadas a 4°C, se extraen 100 µl por triplicado de extracto vegetal, los cuales son dispensados en tres tubos diferentes, luego se agrega 1000 µl de Folin-Ciocalteu, se agita durante un minuto para tratar que se homogenice las muestras y dejar reposar por 4 minutos a oscuridad. Pasado este tiempo se adicionan 1000 µl de Na₂CO₃ y por último 400 µl de agua destilada en cada uno de los tubos con muestras. Estas se agitaron nuevamente durante 1 minuto y llevadas a reposo durante 90 minutos a oscuridad para su posterior lectura. Las lecturas se realizaron en espectrofotómetros a 760 nm. Mediante la recta de calibrado antes citada e información de las lecturas en espectrofotómetro, se logró reconocer el cultivar, posición en copa y rama significativa con mayor contenido de fenoles.

Se puede definir a un compuesto antioxidante como cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas, en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de ese sustrato. La capacidad antioxidante se calculó empleando el método de Brand et al. (1995), basado en la disminución de la absorbancia a 515 nm aplicando una solución metanólica DPPH (2,2- Difenil-1-Picrilhidrazilo) que reacciona con las muestras (Ávila, et al., 2019), la solución metanólica se presenta como la absorbancia de inicio (A₀). El DPPH en presencia del radical oxidado presentando un color morado al inicio, y a medida que la reacción se va efectuando va reduciendo, tomando un color amarillo. La variación en la coloración posibilita medir el contenido de DPPH reducido empleando la siguiente fórmula:

% DPPH reducido = ((A₀ - A_m) / A₀) · 100, siendo A_m la absorbancia de la muestra.

Partiendo de esta ecuación, se elaboró una solución de DPPH (0.004 g en 100 ml de metanol), la cual se diluyó con metanol hasta alcanzar valores en absorbancia cercanos a 0,800 nm. El espectrofotómetro fue calibrado a 515 nm empleando metanol absoluto como blanco. De cada muestra se realiza tres lecturas, cada una se prepara dispensando en la cubeta de vidrio una solución de 2,375 µl de DPPH ajustado y adicionando 135 µl de muestra ajustado en cubetas de 2,5 ml empleando metanol absoluto como blanco. aplicando cuatro giros

de campana a la cubeta y sin tiempo de incubación introducir en el espectrofotómetro y apuntar de una manera inmediata el primer dato que se muestra en la pantalla, debe ser menor al factor que resultó al ajustar el DPPH. Los resultados se obtuvieron como % DPPH reducido como insumos para expresarlos en equivalentes de las muestras evaluadas ante una recta de calibrado con patrón externo Trolox.

La recta de calibrado se realizó con el patrón externo Trolox (ácido 6-hydroxi-2.5.7.8-tetrametilchroman-2-carboxílico mediante la preparación de una disolución madre de 1Mm (25 mg de Trolox en etanol absoluto). A partir de esta disolución madre se preparó 5 disoluciones de concentraciones diferentes (100, 200, 300, 400 y 500 µL). Estas disoluciones permitieron valorar las 5 concentraciones por triplicado obteniendo equivalentes Trolox, se tomó la absorbancia inicial (A0) compuesto por disolventes de DPPH (950 µL de metanol absoluto) y Trolox (50 µL de etanol absoluto). Las lecturas de absorbancias a 515 nm fueron obtenidas utilizando 50 µL de cada concentración trolox y 950 µL de DPPH con lecturas fijas, para elaborar la recta de calibrado.

La recta de calibrado permitió obtener la ecuación: Absorbancia 515 nm=0.0536 [equivalentes de Trolox]+ 2.7577 con R²=0,9596, como se muestra en la figura 3. Las lecturas de muestras fueron realizadas en espectrofotómetro (Spectronic21D, 1988, USA).

A fin de precisar de forma estadística la presencia de diferencias significativas entre los cinco cultivares de *guanábana*, tomando muestras en diferentes partes del área foliar, a razón del potencial fenólico soluble y el potencial de reducción del radical DPPH se llevó a cabo un ANOVA de un factor intergrupos. La misma prueba estadística se empleó entre los descriptores morfológicos (Longitud del pseudotallo, diámetro del pseudotallo, número de hojas, longitud de hojas, ancho de hojas) medidos en las plantas de clon Williams. Se realizaron pruebas de post hoc (HSD Tukey) para determinar entre qué grupos se encuentran diferencias o similitudes. Los procesos estadísticos antes mencionados se emplearon para escoger el mejor extracto. Los datos fueron analizados por el paquete estadístico SPSS Versión 21 de prueba para Windows, a una confiabilidad del 95% (α=0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cultivo de guanábana en sus hojas cuenta con una gran fuente de fenoles que difiere entre plantas de su misma especie. A razón de los resultados obtenidos, el contenido de fenoles solubles totales con mayor potencia se muestra en el cultivar 2, la cual presenta una homogeneidad entre sus resultados en toda la sección copa y la sección baja de planta que se diferencian con 3,33 mg EAG/gMS de la sección media de la planta. El cultivar 5 presenta un valor que diverge de los demás puntos, en la sección copa parte final de rama con una diferencia de hasta 5,05 mg EAG/ gMS de la sección copa parte inicial de rama, siendo este u el punto con menor contenido de fenoles solubles totales (Figura 4

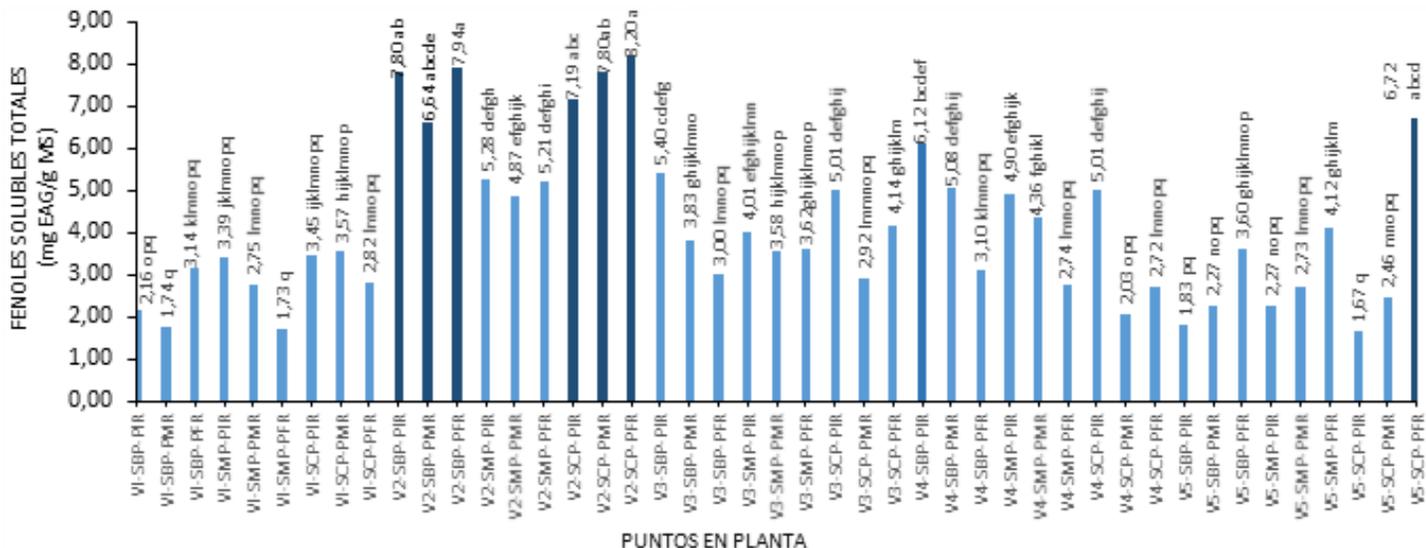


Figura 4. Los Fenoles solubles en hoja de guanábana expresado en (mg AG/gMS). N=9, Error estándar de la media=±0,101.

*Diferentes letras difieren estadísticamente para un p-valor<0,05 (Prueba HSD Tukey). (SCP=Sección copa planta), (SMP=Sección media planta), (SBP=Sección baja planta) y distintas partes de la rama (PIR=Parte inicial rama), (PMR=Parte media rama), (PFR=Parte final rama).

En un trabajo realizado por Mesa, et al. (2010), el contenido de fenoles y actividad antioxidante presentes en *Calophyllum* establecidas en un herbario, presentó en las hojas su punto más alto de contenido, obteniendo un resultado de 245 mgEAG/gMS.

La hoja de guanábana posee una alta actividad antioxidante cuyas propiedades inhiben o retrasan la oxidación de la célula vegetal. En función a los resultados obtenidos, el contenido de antioxidantes presentó diferencias significativas expresadas en mgTE/gPS. entre todas los cultivares, resultando el cultivar 4 con mayor potencial, en la sección baja y copa de planta en su parte inicial, comparando con los puntos más bajos se obtuvo una diferencia que va desde 47,31 a 124,55 de cada una de las secciones. Por su parte, el cultivar 5 obtuvo un valor significativo dentro del cultivar, siendo los datos de la sección copa de planta parte final de rama, el dato que se diverge sobre los puntos más bajos, obteniendo valores desde 28,77 a 78,47 de diferencia dentro de esta sección (Figura 5).



Figura 5. Actividad antioxidante en hoja de guanábana expresado en (mgTE/gPS). N=9, Error estándar de la media=±1,973.

*Diferentes letras difieren estadísticamente para un p-valor<0,05(Prueba HSD Tukey), y estadísticamente para un p-valor≤0,05(Prueba HSD Tukey). (SCP=Sección copa planta), (SMP=Sección media planta), (SBP=Sección baja planta) y distintas partes de la rama (PIR=Parte inicial rama), (PMR=Parte media rama), (PFR=Parte final rama).

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se concluye como la principal fuente fenólica es el cultivar 2 en toda la sección baja y copa de la planta, así como principal fuente antioxidante el cultivar 5 en la sección copa de la planta y parte final de la rama. El resultado con valores significativos para ambas variables mostró este último cultivar con potencial extracto antioxidante para fortalecer plantas de banano y permite darle valor agregado a este último cultivar de guanábana proveniente de un sistema productivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila, W. Á., Vargas, O. J. M., Bastidas, L. M. M. (2019). Aplicación de un diseño factorial 2 3 en la extracción asistida por microondas y evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en frutos de *Vaccinium meridionale*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 48(3), 643–661.
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., Devkota, H. P., Orhan, I. E., Patra, J. K., Das, G., Anandharamkrishnan, C., Gomez-Gomez, L., Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., & Atanasov, A. G. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82–102.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Cycoń, M., Piotrowska-Seget, Z., & Kozdrój, J. (2010). Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of mancozeb and dimethomorph added to sandy soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64(4), 316-323.