

Determinación de antioxidantes enzimáticos en variedades e híbridos de *Morus alba*

Determination of enzymatic antioxidants in *Morus alba* varieties and hybrids

Maykelis Díaz¹, Y. Pérez², Yanet Cazaña², Marlene Prieto¹, Hilda Wencomo¹ y Yudit Lugo¹

¹Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”

Central España Republicana CP 44280, Matanzas, Cuba

²CETENZ-Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Cuba

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la actividad específica de las enzimas antioxidantes catalasa y guaiacol peroxidasa en extractos frescos de variedades e híbridos de morera (*Morus alba*), obtenidos a partir de las raíces, los tallos y las hojas. Las muestras de los diferentes órganos en estudio fueron colectadas aleatoriamente, maceradas en nitrógeno líquido, resuspendidas en tampón fosfato de sodio y centrifugadas. El sobrenadante se utilizó para las determinaciones enzimáticas. Se empleó el ANOVA de clasificación simple y la prueba de rangos múltiples de Duncan para la comparación de medias ($P < 0,05$). Los mayores valores de actividad específica catalasa y peroxidasa se hallaron en general en las hojas, seguido de los tallos y las raíces. Las variedades e híbridos con mayor actividad específica para ambas enzimas fueron: Tigreada, Criolla, IZ 15-9 e IZ 64. Los resultados demostraron el papel protector antioxidante de los extractos, principalmente de hojas, a partir de las funciones importantes que desempeñan estos sistemas enzimáticos en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno. Se corrobora las potencialidades de esta especie para la nutrición y la salud animal, lo que le proporciona más valor como planta forrajera multipropósito. Se recomienda continuar realizando otras determinaciones de compuestos con actividad antioxidante y estudiar los sistemas enzimáticos catalasa y peroxidasa en especies multipropósitos, como *M. alba*, utilizada en la alimentación animal y en la medicina tradicional.

Palabras clave: Catalasa, estrés, *Morus alba*, peroxidasas

Abstract

In this work the specific activity of the antioxidant enzymes catalase and guaiacol peroxidase was evaluated in fresh extracts of mulberry (*Morus alba*) varieties and hybrids, obtained from the roots, stems and leaves. The samples of the different organs under study were randomly collected, macerated in liquid nitrogen, resuspended in sodium phosphate buffer and centrifuged. The supernatant was used for the enzymatic determinations. The simple classification ANOVA and Duncan's multiple range test were used for mean comparison ($P < 0,05$). The highest values of specific catalase and peroxidase activity were found, in general, in the leaves, followed by stems and roots. The varieties and hybrids with higher specific activity for both enzymes were: Tigreada, Criolla, IZ 15-9 and IZ 64. The results showed the protective antioxidant role of the extracts, mainly from leaves, from the important functions played by these enzymatic systems in the elimination of reactive oxygen species. The potential of this species for animal nutrition and health is corroborated, which gives it more value as a multipurpose forage plant. It is recommended to continue making other determinations of compounds with antioxidant activities and studying the catalase and peroxidase enzymatic systems in multipurpose species, such as *M. alba*, used in animal feeding and traditional medicine.

Key words: Catalase, *Morus alba*, stress, peroxidase

Introducción

En la actualidad, existe un marcado interés a nivel mundial por la identificación de compuestos antioxidantes en las plantas, las cuales constituyen fármacos potenciales de uso en la medicina preventiva y en la alimentación animal y humana (Shahin Sharif *et al.*, 2008).

Entre las enfermedades con potencialidades para ser tratadas con plantas medicinales se encuentra un grupo numeroso de patologías asociadas al estrés oxidativo, tales como: trastornos cardiovasculares y gastrointestinales, procesos inflamatorios, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, desórdenes de la fertilidad y diabetes, entre otras (Patel *et al.*, 2006; Küpeli *et al.*, 2007; Ronald *et al.*, 2007; Bucciarelli y Skliar, 2007). El estrés oxidativo ocurre debido al desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y la capacidad del organismo de mantener las ERO en niveles no tóxicos.

El sistema antioxidante de las plantas incluye un conjunto amplio de compuestos de naturaleza protéica, entre las que se encuentran las enzimas antioxidantes; así como compuestos no protéicos como la vitamina E, el ácido ascórbico, el α -tocoferol, el glutatión y los pigmentos carotenoides (González *et al.*, 2000). Entre las enzimas más importantes se encuentran la catalasa y las peroxidasas (Arora *et al.*, 2002; Shahin Sharif *et al.*, 2008), por la capacidad de transformar el compuesto prooxidante peróxido de hidrógeno en agua y en oxígeno molecular (Pascale *et al.*, 2005).

Entre las numerosas especies de árboles y arbustos con buenas características forrajeras, *Morus alba* sobresale como fuente de forraje en Cuba, y además por su excelente capacidad de producción de biomasa, composición química, alta degradabilidad, adaptabilidad a diversas condiciones de clima y suelo, perennidad ante el corte y disponibilidad.

Considerando el creciente interés en la búsqueda de fuentes antioxidantes naturales, el presente trabajo tuvo como objetivo la determinación de la actividad específica de antioxidantes enzimáticos (catalasa y guaiacol peroxidasa) a partir de extractos frescos de hojas, tallos y raíces de variedades e híbridos del género *Morus*.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Para los ensayos de las actividades enzimáticas se utilizaron 10 variedades e híbridos del género *Morus* existentes en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, de la provincia de Matanzas. Las cinco variedades fueron: *M. alba* Indonesia, Acorazonada, Criolla, Tigreada y Cubana, y los híbridos: IZ 56-4, IZ 64, IZ 40, IZ 15-9, IZ 13-6. La colecta de hojas, tallos y raíces para todas las plantas se realizó en el mismo momento, seleccionando los órganos con semejante desarrollo vegetativo y condiciones de sanidad. Las raíces fueron lavadas con agua destilada y secadas para su maceración.

Procesamiento del material vegetal

Se seleccionaron aleatoriamente 10 muestras de hojas, tallos y raíces de plantas diferentes de las variedades e híbridos en estudio para la determinación de la actividad enzimática. El material vegetal fresco se homogenizó y se extrajeron 3 g por triplicado de cada órgano. Dichas muestras fueron pesadas, maceradas en nitrógeno líquido y homogenizadas en una solución tampón fosfato de sodio, 100 mM, pH 7,0 en frío y con una relación masa/volumen 1:1. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12 000 rpm durante 15 minutos y se colectó el sobrenadante para los ensayos de actividad enzimática, los cuales se realizaron de inmediato.

Determinación de la actividad catalasa

La actividad catalasa se determinó según Chance y Machley (1955); se midió espectrofotométricamente la descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm, 37°C en una solución tampón de fosfato de sodio, 20 mM, pH 7,0.

Determinación de la actividad guaiacol peroxidasa

La actividad guaiacol peroxidasa se determinó espectrofotométricamente; se midió la descomposición del peróxido de hidrógeno a 436 nm y a 25°C, utilizando guaiacol como agente donador de hidrógeno, preparado en una solución de concentración 0,018 molL⁻¹ (Bergmeyer, 1974).

Cálculo de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando albúmina de suero bovino como patrón.

Cálculo de la actividad específica

El cálculo de la actividad específica (mg/mL) se realizó utilizando la siguiente expresión:

Actividad específica (mg/mL)=Actividad (U/mL)/Concentración de proteínas (mg/mL)

Todas las mediciones espectrofotométricas descritas en el presente trabajo se realizaron en un espectrofotómetro UV/VIS Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Suecia).

Procesamiento estadístico

Para el ensayo se utilizó un diseño completamente aleatorizado con la variedad como factor en estudio. Se empleó el ANOVA de clasificación simple para la determinación de diferencias de la actividad específica de las diferentes variedades o híbridos de morera. Las desigualdades entre medias se determinaron mediante la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan considerándose significativo todo valor de $P < 0,05$. Los datos fueron procesados según el paquete Statgraphic plus versión 5.1 para Windows®. Previo al análisis de varianza se evaluó el ajuste a una distribución normal mediante la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza mediante las pruebas de Bartlett (Sigarroat, 1985).

Resultados y Discusión

Como se observa en la figura 1, las distintas variedades e híbridos mostraron diferencias significativas para la actividad enzimática catalasa en las hojas ($P < 0,05$). La mayor actividad correspondió al híbrido IZ-15-9, seguido de la variedad Criolla y la Tigreada en orden decreciente; mientras que los valores más bajos se encontraron en la variedad Acorazonada.

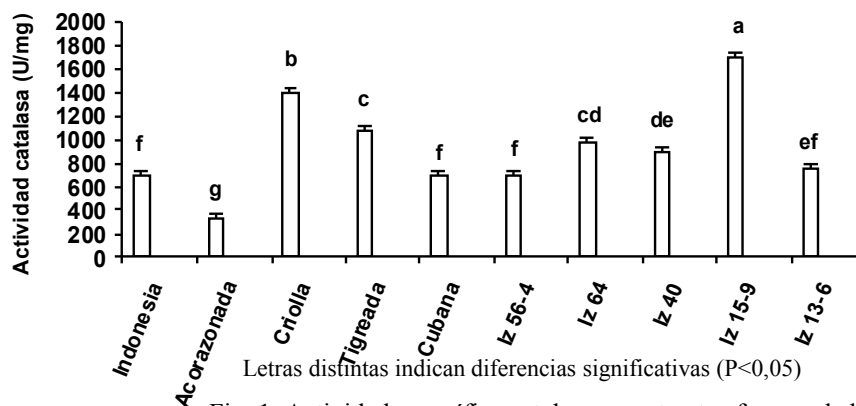


Fig. 1. Actividad específica catalasa en extractos frescos de hojas.

Fig. 1. Specific catalase activity of fresh leaf extracts.

La catalasa (EC 1.11.1.6) es una oxidorreductasa esencial en el sistema antioxidante de las plantas, la cual se halla en los distintos órganos aunque de manera localizada, como sucede en las hojas, donde ha sido reportada solamente en los peroxisomas (Arora *et al.*, 2002).

En investigaciones realizadas con anterioridad, se ha informado que los extractos de *Morus* sp. presentan actividad antioxidante (Bokang *et al.*, 1999). Los estudios de actividad enzimática realizados por Poontaringa *et al.* (2003) en hojas de plántulas de *Morus* sp. cv. Pei, obtenidas en condiciones *in vitro*, mostraron valores de actividad específica inferiores que los de las variedades e híbridos evaluados en esta investigación.

Las investigaciones de Telesinski *et al.* (2008) en hojas y partes verdes de *Phaseolus vulgaris* L., indicaron valores de dicha actividad enzimática inferiores a los de la variedad Criolla y a la IZ 15-9, y similares a los de la Tigreada.

En los estudios realizados en los extractos frescos de tallos (fig. 2) la variedad Cubana presentó la mayor actividad específica catalasa ($P<0,05$). Es de destacar que las variedades IZ 56-4 y Criolla se comportaron de manera similar, con buenos niveles enzimáticos; mientras que las variedades Indonesia y Acorazonada mostraron los valores más bajos para la actividad catalasa.

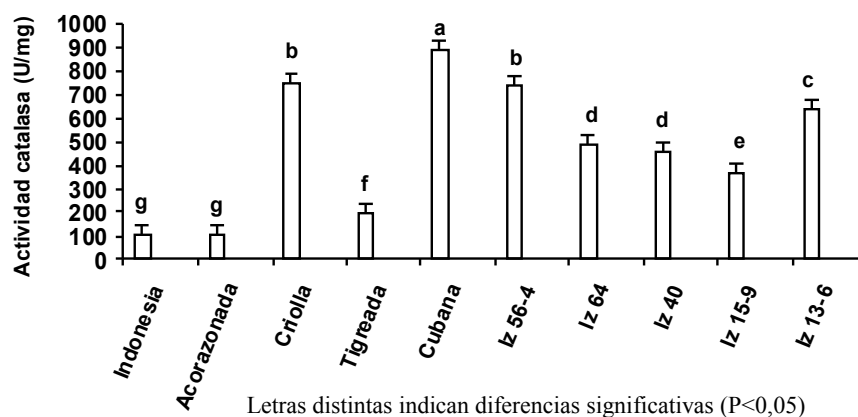


Fig. 2. Actividad específica catalasa en extractos frescos de tallos.

Fig. 2. Specific catalase activity of fresh stem extracts.

En las raíces (fig. 3), aunque con valores inferiores a los niveles de actividad enzimática alcanzados en hojas y tallos, pudo apreciarse que la variedad IZ 64 expresó la mayor actividad catalasa ($P<0,05$), seguida de Indonesia e IZ 40. Los menores valores de actividad se observaron en las variedades IZ 56-4 y Criolla.

La guaiacol peroxidasa (EC 1.11.1.7) y la ascorbato peroxidasa (EC 1.11.1.11) desempeñan una función catalítica importante al reducir los niveles de H_2O_2 en los tejidos vegetales, evitando con ello que este compuesto se difunda entre las membranas biológicas para reaccionar con iones libres como el Fe^{2+} y generar el potente radical hidroxilo, a través de la reacción de Fenton (Vogiatzi *et al.*, 2009).

La figura 4 muestra los valores de la actividad específica guaiacol peroxidasa en hojas. Entre las variedades, la Tigreada presentó los valores más altos; mientras que el híbrido IZ-56-4 mostró la menor actividad ($P<0,05$). Por su parte, las variedades Indonesia, Criolla, Cubana y los híbridos IZ 64 e IZ 15-9 tuvieron un comportamiento similar entre ellas.

Resultados similares de actividad específica guaiacol peroxidasa fueron informados por Poontaringa *et al.* (2003) en hojas de plántulas de *Morus* sp. cv. Pei. Asimismo, en callos provenientes de hojas verdaderas de *Stylosanthes guianensis* cv. CIAT-184 (leguminosa forrajera)

se reportó una actividad enzimática similar en término de los valores obtenidos para la variedad Acorazonada y los híbridos, IZ 40 e IZ 13-6; superior al híbrido IZ 56-4 e inferior al resto de las variedades e híbridos evaluados (Fuentes *et al.*, 2008).

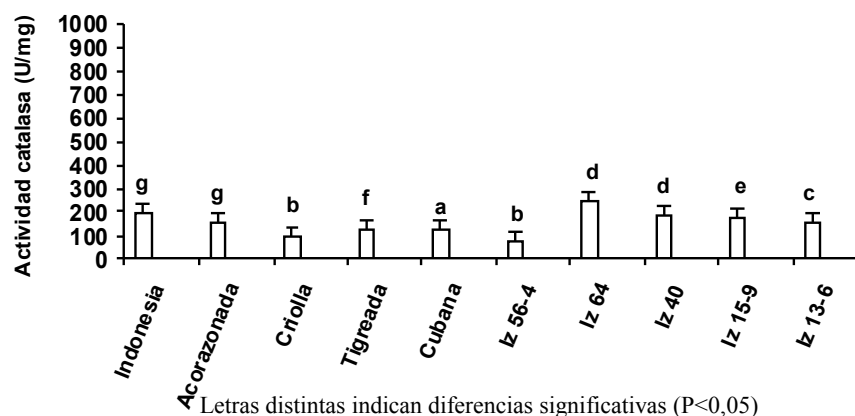


Fig. 3. Actividad específica catalasa en extractos frescos de raíces.

Fig. 3. Specific catalase activity of fresh root extracts.

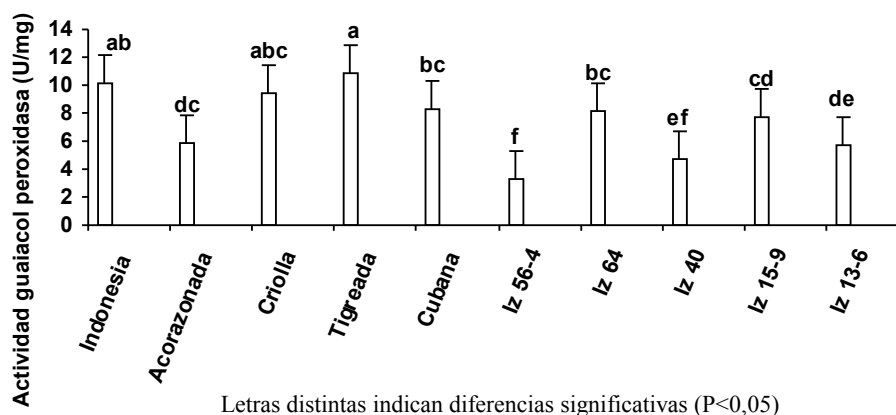


Fig. 4. Actividad específica guaiacol peroxidasa en extractos frescos de hojas.

Fig. 4. Specific guaiacol peroxidase activity of fresh leaf extracts.

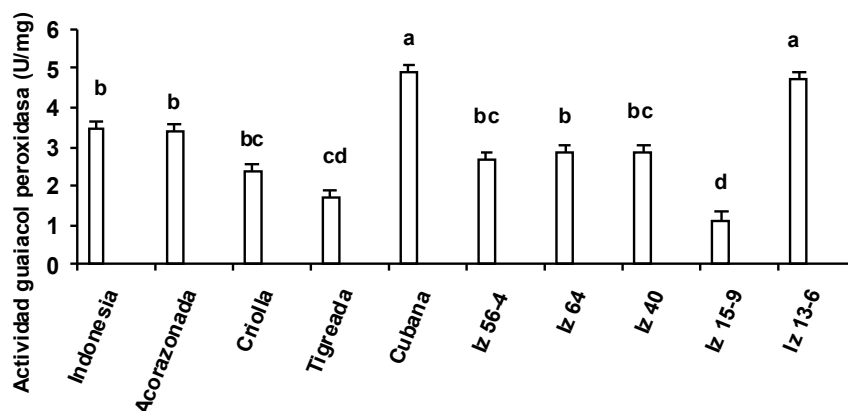
La variedad Cubana y el híbrido IZ 13-6 presentaron la mayor actividad guaiacol peroxidasa en los extractos frescos de tallos (fig. 5); la menor actividad se detectó en el híbrido IZ 15-9. Además, Indonesia y Acorazonada tuvieron valores similares para dicha actividad enzimática; mientras que la variedad Criolla y los híbridos IZ 56-4 e IZ 40 presentaron similitud entre ellos.

Cuando se analizó la actividad específica guaiacol peroxidasa en los extractos de raíces (fig. 6), se observó que la variedad Indonesia mostró los valores más altos, que se diferenciaron significativamente del resto ($P < 0,05$); mientras que en los híbridos IZ 15-9 e IZ 13-6 se detectó la menor actividad.

De manera general, se encontró en las hojas la mayor actividad enzimática específica, tanto para catalasa como para la guaiacol peroxidasa; mientras que en las raíces se hallaron los niveles más bajos.

Por otra parte, al comparar la actividad enzimática de ambas enzimas en las hojas y entre las distintas variedades e híbridos, los mayores valores correspondieron a las variedades Tigreada y Criolla y a los híbridos IZ 15-9 e IZ 64. Sin embargo, es importante tener presente que la actividad enzimática

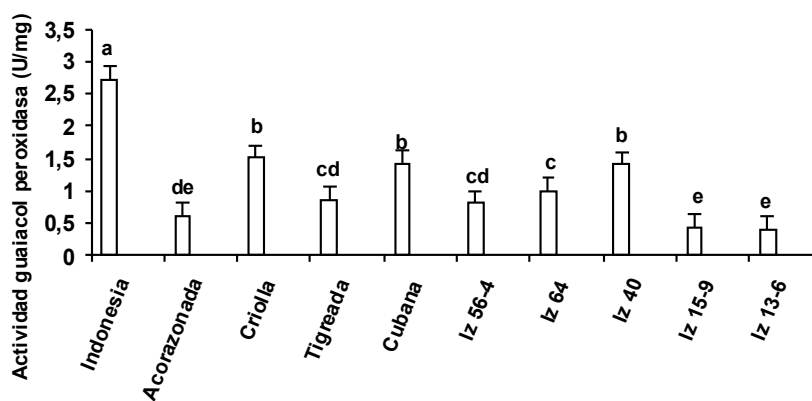
puede variar por distintas causas, como el estadio fisiológico de la planta u órgano en el momento de la colecta y procesamiento de las muestras (independientemente de los requisitos tomados en consideración), y además por los factores ambientales como la temperatura, el pH y el estado hídrico de la planta; así como estreses bióticos. A ello se debe añadir el método empleado para la extracción y cuantificación.



Letras distintas indican diferencias significativas ($P<0,05$)

Fig. 5. Actividad específica guaiacol peroxidasa en extractos frescos de tallos.

Fig. 5. Specific guaiacol peroxidase activity of fresh stem extracts.



Letras distintas indican diferencias significativas ($P<0,05$)

Fig. 6. Actividad específica guaiacol peroxidasa en extractos frescos de raíces.

Fig. 6. Specific guaiacol peroxidase activity of fresh root extracts.

La selección de las variedades de mayor actividad antioxidante también está limitada porque a ello contribuyen otras enzimas del mismo grupo, como la superóxido dismutasa, además de otros compuestos de naturaleza no proteínica como los fenoles, que eliminan las especies reactivas del oxígeno (Xiong y Zhu, 2002; Basile *et al.*, 2005). No obstante, los niveles encontrados en la actividad catalasa y peroxidasa en las hojas pueden constituir un dato importante cuando se relacione esta especie con algunas propiedades medicinales vinculadas con el estrés oxidativo.

Los estudios realizados por Shylesh y Padikkala (1999) con extractos frescos de *Emilia sonchifolia* (Asteraceae), mostraron un potente efecto inhibitor de la formación de radical hidroxilo y superóxido *in vitro*. El mecanismo antioxidante que se ha utilizado para explicar estos resultados se basa en la eliminación del exceso de especies reactivas del oxígeno, formadas en los organismos

vivos, lo cual se atribuye a la acción eficiente de enzimas tales como la catalasa y las peroxidasas, entre otras, y/o la presencia de otros compuestos químicos con capacidad secuestradora de radicales libres.

Otro aspecto a tener en cuenta en la actividad antioxidante de esta especie, está relacionado con el hecho de que en las hojas de la morera los compuestos antioxidantes naturales actúan de modo sinérgico, es decir, que el efecto antioxidante, en su conjunto, resulta superior a la suma de los efectos de cada tipo de compuesto por separado (Bokang *et al.*, 1999).

Conclusiones

Los mayores valores de las actividades específicas de las enzimas antioxidantes catalasa y peroxidasa se encontraron en las hojas, seguido de los tallos y las raíces. Las variedades e híbridos con mayor actividad específica para ambas enzimas fueron: Tigreada, Criolla, IZ 15-9 e IZ 64. Los resultados demostraron el papel protector antioxidante de los extractos de hojas, a partir de las funciones importantes que desempeñan estos sistemas enzimáticos en la eliminación de las especies reactivas del oxígeno.

Recomendaciones

Continuar realizando otras determinaciones de compuestos con actividad antioxidante, con el objetivo de obtener un criterio general del poder antioxidante de estas variedades e híbridos, debido a la relevancia de esta especie y sus híbridos en la alimentación animal.

Realizar estudios de los sistemas enzimáticos catalasa y peroxidasa en especies multipropósitos, como *M. alba*, utilizada en la alimentación animal y en la medicina tradicional.

Referencias bibliográficas

- Arora, A. *et al.* 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Review article. *Current Science*. 82:1227
- Basile, A. *et al.* 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *J. Ethnopharmacol.* 102:32
- Bergmeyer, H.U. 1974. Methods of enzymatic Analysis I. Academic Press, New York. 2nd ed. p.495
- Bokang, I. *et al.* 1999. Antioxidant activity of the methanolic extract from various traditional edible plant. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*. 37 (1):105
- Bucciarelli, A. & Skliar, M.I. 2007. Plantas medicinales de Argentina con actividad gastroprotectora. *Ars Pharm.* 48 (4):361
- Chance, B. & Machley, A. 1995. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2:764
- Fuentes, Leticia *et al.* 2008. Influencia del NaCl en indicadores bioquímicos evaluados en callos de *Stylosanthes guianensis* CIAT-184. *Pastos y Forrajes*. 31 (1): 35
- González, M.C. *et al.* 2000. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica*. 25:1
- Küpeli, E. *et al.* 2007. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activity of five Anatolian *Achillea* species. *Turkish J. Pharm. Sci.* 4 (2):89
- Lowry, O.H. *et al.* 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:225
- Pascale, G. *et al.* 2005. Differential regulation of Cu, Zn- and Mn-superoxide dismutases by retinoic acid in normal and psoriatic human fibroblasts. *Journal Autoimmunity*. 24 (1):69
- Patel, S. *et al.* 2006. Status of antioxidant defense system and expression of toxicant responsive genes in striatum of maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in mouse: Mechanism of neurodegeneration. *Brain Res.* 1081:9
- Poontaringa, H. *et al.* 2003. Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *ScienceAsia*. 29:109

- Ronald, A. *et al.* 2007. Efecto protector del *Aloe vera* (sábila) en lesiones gástricas inducidas con etanol en ratas. *CIMEL*. 12 (2):71
- Shahin Sharif, A. *et al.* 2008. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*. 41:1
- Shylesh, B.S. & Padikkala, J. 1999. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Emilia sonchifolia*. *Fitoterapia*. 70 (3):275
- Sigarroa, A. 1985. Biometría y diseño experimental. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. p. 743
- Telesinski, A. *et al.* 2008. Effect of soil salinity on activity of antioxidant enzymes and content of ascorbic acid and phenols in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *J. Elementol.* 13 (3): 401
- Vogiatzi, G. *et al.* 2009. The role of oxidative stress in atherosclerosis hellenic. *J. Cardiol.* 50:402
- Xiong, L. & Zhu, J.K. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 25:131

Recibido el 27 de noviembre del 2009

Aceptado el 21 de mayo del 2010

Determination of enzymatic antioxidants in *Morus alba* varieties and hybrids

Abstract

In this work the specific activity of the antioxidant enzymes catalase and guaiacol peroxidase was evaluated in fresh extracts of mulberry (*Morus alba*) varieties and hybrids, obtained from the roots, stems and leaves. The samples of the different organs under study were randomly collected, macerated in liquid nitrogen, resuspended in sodium phosphate buffer and centrifuged. The supernatant was used for the enzymatic determinations. The simple classification ANOVA and Duncan's multiple range test were used for mean comparison ($P < 0.05$). The highest values of specific catalase and peroxidase activity were found, in general, in the leaves, followed by stems and roots. The varieties and hybrids with higher specific activity for both enzymes were: Tigreada, Criolla, IZ 15-9 and IZ 64. The results showed the protective antioxidant role of the extracts, mainly from leaves, from the important functions played by these enzymatic systems in the elimination of reactive oxygen species. The potential of this species for animal nutrition and health is corroborated, which gives it more value as a multipurpose forage plant. It is recommended to continue making other determinations of compounds with antioxidant activities and studying the catalase and peroxidase enzymatic systems in multipurpose species, such as *M. alba*, used in animal feeding and traditional medicine.

Key words: Catalase, *Morus alba*, stress, peroxidase

Introduction

At present, there is remarkable interest worldwide in the identification of antioxidant compounds in plants, which constitute potential drugs to be used in preventive medicine and in animal and human feeding (Shahin Sharif *et al.*, 2008).

Among the diseases with potential for being treated with medicinal plants is a large group of pathologies associated to oxidative stress, such as: cardiovascular and gastrointestinal disorders, inflammatory processes, neurodegenerative diseases, cancer, fertility disorders and diabetes, etcetera (Patel *et al.*, 2006; Küpeli *et al.*, 2007; Ronald *et al.*, 2007; Bucciarelli and Skliar, 2007). Oxidative stress occurs because of the unbalancing between the production of reactive oxygen species (ROS) and the organism's capacity to keep ROS in non-toxic levels.

The antioxidant system of plants includes a large group of protein compounds, among which are antioxidant enzymes; as well as non protein compounds, such as vitamin E, α -tocopherol, glutathione and carotenoid pigments (González *et al.*, 2000). Among the most important enzymes are catalase and peroxidase (Arora *et al.*, 2002; Shahin Sharif *et al.*, 2008), due to the capacity of transforming the pro-oxidant compound hydrogen peroxide into water and molecular oxygen (Pascale *et al.*, 2005).

Among the numerous tree and shrub species with good forage characteristics, *Morus alba* stands out as forage source in Cuba, and besides, for its excellent capacity of biomass production, chemical composition, high degradability, adaptability to diverse climate and soil conditions, perennial character when pruned and availability.

Considering the increasing interest in the search for natural antioxidant sources, the objective of this work was the determination of the specific activity of enzymatic antioxidants (catalase and guaiacol peroxidase) from fresh extracts of leaves, stems and roots of varieties and hybrids of the *Morus* genus.

Materials and Methods

Plant material

For the essays of enzymatic activities 10 varieties and hybrids of the *Morus* genus existing at the Experimental Station of Pastures and Forages “Indio Hatuey”, Matanzas province, were used. The five varieties were: *M. alba* Indonesia, Acorazonada, Criolla, Tigrada and Cubana, and the hybrids: IZ 56-4, IZ 64, IZ 40, IZ 15-9, IZ 13-6. The collection of leaves, stems and roots for all plants was conducted at the same time, selecting the organs with similar vegetative development and health conditions. The roots were washed with distilled water and dried for their maceration.

Processing of the plant material

Ten samples of leaves, stems and roots were randomly selected from different plants of the varieties and hybrids under study for determining the enzymatic activity. The fresh plant material was homogenized and 3 g in triplicate were extracted from each organ. Such samples were weighed, macerated in liquid hydrogen and homogenized in a sodium phosphate buffer solution 100 mM, pH 7,0 in the cold and with a 1:1 mass/volume ratio. Afterwards, the samples were centrifuged at 12 000 rpm for 15 minutes and the supernatant was collected for the essays of enzymatic activity, which were immediately conducted.

Determination of the catalase activity

The catalase activity was determined according to Chance and Machley (1955); the decomposition of hydrogen peroxide was spectrophotometrically measured at 240 nm, 37°C in a sodium phosphate buffer solution, 20 mM, pH 7,0.

Determination of the guaiacol peroxidase activity

The guaiacol peroxidase activity was spectrophotometrically determined; the decomposition of the hydrogen peroxide was measured at 436 nm and 25°C, using guaiacol as hydrogen donor agent, prepared in a solution of concentration 0,018 mol L⁻¹ (Bergmeyer, 1974).

Calculation of the protein concentration

The protein concentration was determined through the method described by Lowry *et al.* (1951), using albumin of cattle serum as pattern.

Calculation of the specific activity

The calculation of the specific activity (mg/mL) was made using the following expression:

Specific activity mg/mL = Activity (U/mL)/Protein concentration (mg/mL)

All the spectrophotometric measurements described in this work were made in a spectrophotometer UV/NIS Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Sweden).

Statistical processing

For the trial a completely randomized design was used with the variety as factor under study. Simple classification ANOVA was used for determining differences of the specific activity of the different mulberry varieties or hybrids. The inequalities among means were determined through Duncan's multiple range comparison test considering significant every value of $P < 0,05$. The data were processed according to the pack Statgraphic plus version 5.1 for Windows®. Before the variance analysis the adjustment to a normal distribution was evaluated by means of the Kolmogorov-Smirnov adjustment test and the variance homogeneity through Bartlett's tests (Sigarroat, 1985).

Results and Discussion

As it is observed in figure 1, the different varieties and hybrids showed significant differences for the catalase enzymatic activity in leaves ($P<0,05$). The highest activity corresponded to the hybrid IZ 15-9, followed by the varieties Criolla and Tigreada in decreasing order; while the lowest values were found in the variety Acorazonada.

Catalase (EC 1.11.1.6) is an essential oxidoreductase in the antioxidant system of plants, which is found in the different organs although in a located way, as it occurs in the leaves, where it has been only reported in peroxisomes (Arora *et al.*, 2002).

In previously conducted studies, the *Morus* sp. extracts have been reported to show antioxidant activity (Bokang *et al.*, 1999). The enzymatic activity studies conducted by Poontaringa *et al.* (2003) in leaves of *Morus* sp. cv Pei seedlings, obtained under *in vitro* conditions, showed values of specific activity lower than those of the varieties and hybrids evaluated in this research.

The studies conducted by Telesinki *et al.* (2008) in leaves and green parts of *Phaseolus vulgaris* L., indicated values of such enzymatic activity lower than those of the variety Criolla and IZ 15-9, and similar to those of Tigreada.

In the trials conducted in fresh stem extracts (fig. 2) the variety Cubana showed the higher catalase specific activity ($P<0,05$). It should be emphasized that the varieties IZ 56-4 and Criolla behaved similarly, with good enzymatic levels; while the varieties Indonesia and Acorazonada showed the values for catalase activity.

In the roots (fig. 3), although with lower values than the levels of enzymatic activity reached in leaves and stems, the variety IZ 64 could be observed to express the highest catalase activity ($P<0,05$), followed by Indonesia and IZ 40. The lowest activity values were observed in varieties IZ 56-4 and Criolla.

Guaiacol peroxidase (EC 1.11.1.7) and ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) play an important catalytic role by reducing the H_2O_2 levels in plant tissues, thus preventing this compound from diffusing among the biological membranes to react with free ions such as Fe^{2+} and generate the strong hydroxyl radical, through the Fenton reaction (Vogiatzy *et al.*, 2009).

Figure 4 shows the values of the guaiacol peroxidase specific activity in leaves. Among the varieties, Tigreada had the highest values; while the hybrid IZ 56-4 showed the lowest activity ($P<0,05$). On the other hand, the varieties Indonesia, Criolla, Cubana and the hybrids IZ 64 and IZ 15-9 had a similar performance among themselves.

Similar results of guaiacol peroxidase specific activity were reported by Poontaringa *et al.* (2003) in leaves of *Morus* sp. cv Pei seedlings. Likewise, in calluses from true leaves of *Stylosanthes guianensis* cv CIAT-184 (forage legume) a similar enzymatic activity was reported in terms of the values obtained for the variety Acorazonada and the hybrids IZ 40 and IZ 13-6; higher than the hybrid IZ 56-4 and lower than the other evaluated varieties and hybrids (Fuentes *et al.*, 2008).

The variety Cubana and the hybrid IZ 13-6 showed the highest guaiacol peroxidase activity in the fresh stem extracts (fig. 5); the lowest activity was detected in the hybrid IZ 15-9. In addition, Indonesia and Acorazonada had similar values for such enzymatic activity; while the variety Criolla and the hybrids IZ 56-4 and IZ 40 showed similarity among themselves.

When the guaiacol peroxidase specific activity was analyzed in the root extracts (fig. 6), the variety Indonesia was observed to show the highest values, which significantly differed from the rest ($P<0,05$); while in the hybrids IZ 15-9 and IZ 13-6 the lowest activity was detected.

In general, the highest specific enzymatic activity was found in the leaves, for catalase as well as for guaiacol peroxidase; while the roots showed the lowest levels.

On the other hand, when comparing the enzymatic activity of both enzymes in the leaves and among the different varieties and hybrids, the highest values corresponded to the varieties Tigreada and Criolla and the hybrids IZ 15-9 and IZ 64. However, it is important to bear in mind that the enzymatic activity can vary due to different causes, such as the physiological stage of the plant or organ at the moment of sample collection and processing (independently from the requisites taken into consideration) and besides, because of environmental factors, such as temperature, pH and hydric status of the plant; as well as biotic stresses. In addition, there is the method used for extraction and quantification.

The selection of the varieties with higher antioxidant activity is also limited because other enzymes of the same group contribute to it, such as superoxide dismutase, in addition to other non protein compounds, such as phenols, which eliminate the reactive oxygen species (Xiong and Zhu, 2002; Basile *et al.*, 2005). Yet, the levels found in the catalase and peroxidase activity of the leaves can constitute an important datum when this species is related to some medicinal properties linked to oxidative stress.

The studies conducted by Shylesh and Padikkala (1999) with fresh extracts of *Emilia sonchifolia* (Asteraceae), showed a strong inhibiting effect of the *in vitro* formation of hydroxyl radical and superoxide. The antioxidant mechanism that has been used to explain these results is based on the elimination of the excess of reactive oxygen species, formed in living organisms, which is ascribed to the efficient action of such enzymes as catalase and peroxidases, among others, and/or the presence of other chemical compounds with capacity for sequestering free radicals.

Another aspect to be considered in the antioxidant activity of this species is related to the fact that in mulberry leaves the natural antioxidant compounds act synergically, that is, the antioxidant effect, as a whole, is higher than the addition of the effects of each separate compound type (Bokang *et al.*, 1999).

Conclusions

The highest values of the specific activities of the enzymes catalase and peroxidase were found in the leaves, followed by the stems and roots. The varieties and hybrids with higher specific activity for both enzymes were: Tigreada, Criolla, IZ 15-9 and IZ 64. The results showed the protective antioxidant role of the leaf extracts, from the important functions played by these enzymatic systems in the elimination of reactive oxygen species.

Recommendations

To continue making other determinations of compounds with antioxidant activity, in order to obtain a general criterion of the antioxidant power of these varieties and hybrids, due to the relevance of this species and its hybrids in animal feeding.

To conduct studies of the enzymatic systems catalase and peroxidase in multipurpose species, such as *M. alba*, used in animal feeding and traditional medicine.