

## Evaluation of the antioxidant and hepatoprotective activity of *Mucuna pruriens* (L) cv. utilis forage meal and their polyphenols extract in Sprague Dowley rats

### Evaluación de la actividad antioxidante y hepatoprotectora de la harina de forraje de *Mucuna pruriens* (L) vc. utilis y su extracto de polifenoles en ratas Sprague Dowley

Idania Scull Rodríguez<sup>1</sup>, Lourdes Savón Valdés<sup>1</sup>, Iraida Spengler Salabarría<sup>2</sup>  
and Magaly Herrera Villafranca<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Monogástrico, Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

<sup>2</sup>Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana, Cuba.

Email: idascull@ica.co.cu

Idania Scull Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0002-9516-7182>

Lourdes Savón Valdés: <https://orcid.org/0000-0001-9880-0310>

Iraida Spengler Salabarría: <https://orcid.org/0000-0002-2181-4535>

Magaly Herrera Villafranca: <https://orcid.org/0000-0002-2641-1815>

In order to evaluate the antioxidant and hepatoprotective effect of *Mucuna pruriens* (L) cv. utilis forage meal and their polyphenol extract, an intoxication model induced with carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) was used. A total of 60 Sprague Dowley rats from both sex of 7-8 weeks of age were used, distributed in three treatments, according to a completely random design. The treatments consisted in a control group with EAO-1004 diet, which contained the premixture with antioxidants, and two experimental groups, which was supplied the *Mucuna pruriens* forage meal and their polyphenol extract, in a dose of 300 mg/kg body weight respectively, in replacement of the control diet premixture. All groups received the diet of their treatments and water ad libitum. At the end of the experimental period (30d), the animals were slaughtered and biochemical blood indicators were studied, the alanine aminotransferase (ALT) and the aspartate aminotransferase (AST) enzymes were quantified. The activity of the catalase antioxidant enzyme and the antioxidant state of the animals were also determined. The increase of the catalase enzyme concentration in liver (10.42 UI/L) and blood serum (20.50 UI/L) showed that the meal and their extract change the redox state caused by the CCl<sub>4</sub>. The forage meal and their polyphenols extract showed its hepatoprotective effect against the damage action of the CCl<sub>4</sub>, evaluated by the alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase. The results showed that it is possible to use, in diets for rats the forage meal and their polyphenols extract with antioxidants effects similar to those of the control diet, which used synthetic antioxidants, vitamins and minerals. It is suggested to developed similar studies in productive animals, that includes studies of doses optimization for different animal categories.

Key words: oxidative stress, serum polyphenols, catalase, aspartate aminotransferase.

The vegetables have biologically active substances which can exert beneficial effects on the physiology, productivity and health of animals, when acting as antioxidants, antimicrobial and antiparasitics (Salazar *et al.* 2019).

Scientific evidences show that the use of some

Para evaluar el efecto antioxidante y hepatoprotector de la harina de forraje de *Mucuna pruriens* (L) vc. utilis y su extracto de polifenoles, se utilizó un modelo de intoxicación inducida con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>). Se emplearon 60 ratas Sprague Dowley de ambos sexos, de 7-8 semanas de edad, distribuidas en tres tratamientos, según diseño completamente aleatorizado. Los tratamientos consistieron en un grupo control con dieta EAO-1004, que contenía la premezcla con los antioxidantes, y dos grupos experimentales, a los que se les suministró la harina de forraje de *Mucuna pruriens* y su extracto de polifenoles, en una dosis de 300 mg/kg de peso corporal respectivamente, en sustitución de la premezcla de la dieta control. Todos los grupos recibieron la dieta de sus respectivos tratamientos y el agua ad libitum. Al término del período experimental (30 d), los animales se sacrificaron y se estudiaron indicadores de la bioquímica sanguínea, se cuantificaron las enzimas alanino aminotrasferasa (ALT) y el aspartato aminotransferasa (AST). También se determinó la actividad de la enzima antioxidante catalasa y el estatus antioxidante de los animales. El incremento de la concentración de la enzima catalasa en hígado (10.42 UI/L) y suero (20.50 UI/L) indicó que la harina y su extracto transformaron el estado redox producido por el CCl<sub>4</sub>. La harina de forraje y su extracto de polifenoles mostraron su efecto hepatoprotector ante la acción nociva del CCl<sub>4</sub>, evaluado por la alanino aminotrasferasa y aspartato aminotransferasa. Los resultados señalan que es posible utilizar en la dieta de las ratas la harina de forraje y su extracto de polifenoles con efectos antioxidantes similares a los que manifiesta la dieta control, que utiliza antioxidantes sintéticos, vitaminas y minerales. Se sugiere desarrollar en animales productivos estudios similares, que incluyan trabajos de optimización de dosis para diferentes categorías de animales.

Palabras clave: estrés oxidativo, polifenoles séricos, catalasa, aspartato aminotransferasa.

Los vegetales contienen sustancias biológicamente activas que pueden ejercer efectos benéficos en la fisiología, productividad y salud de los animales, al actuar como antioxidantes, antimicrobianos y antiparasitarios (Salazar *et al.* 2019).

Evidencias científicas demuestran que el uso de

plants, such as legumes or some of their components protects the organism from the oxidative stress damages (Rojas *et al.* 2015). Tropical legumes, besides constituting an excellent nutrients source, they also supply secondary compounds with certain chemical structures, able to contribute new products with antioxidant activity (García *et al.* 2014). This is the case of *Mucuna pruriens*, a legume from the Fabaceae family, with potential to prevent damages derivate from the oxidative stress, an aspect a little known in Cuba until today (Longhi *et al.* 2011).

The objective of this study was to evaluate the antioxidant and hepatoprotective activity of *Mucuna pruriens* (L) cv. utilis forage meal and their polyphenols extract, with the use of rats as animal model.

### Materials and Methods

*Plant material collection.* Plants from *Mucuna pruriens* (L) DC. cv. utilis (Wall. ex Wight) L. H. Bailey, sowing in June, in rainy season, in a brown soil with carbonate were used (Hernández *et al.* 2019). An area from "Ayala" farm belonging to the Instituto de Ciencia Animal (ICA) was used. The seeds were obtained in the legumes seed bank from the Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Miguel Sistach Naya" (ICA). Fertilization and irrigation was not used.

The plants cut was manually carry out, with knife, at 80 d after sowing, at a height of 5cm over soil level, and when 100 % was flowered, according to Díaz *et al.* (2003). The plot was totally cut during the morning, moment in which samples were selected, and 50cm of border effect was eliminated.

*Meals elaboration.* The plants (leaves, young stems and flowers) were cut and chopped. Later, were dried at room temperature, in a aired room. Humidity was reduced up 20%, which was monitoring with the dry matter (DM) determination in different moments of the drying process. Samples were milled at 1 mm particle size and stored in paper bags until their use.

*Elaboration of polyphenols extract.* To evaluate the effect of phenolic compounds on antioxidant activity *in vivo*, an extract from *M. pruriens* forage meal was elaborated in triplicate, according to Makkar (2003) methodology. A total of 100 g of meal were weighed and 1000 mL of hydroalcoholic solution (70 %) were added. The extraction was performed for 15 min with the use of a Bandelin Sonorex Sonicator, serie 2000, made in Germany. The supernatant was separated and the extraction process was repeated three times to the solid waste. The resulting solution was filtered and rotovaporated (volume was reduce to 50%). The obtained extract was keep in amber bottles and refrigerated at 5-8 °C temperature until their use.

The organoleptic characteristics of the hydroalcoholic extract, obtained from *M. pruriens* forage meal were

algunas plantas, como las leguminosas, o de algunos de sus componentes, protegen el organismo de los daños del estrés oxidativo (Rojas *et al.* 2015). Las leguminosas tropicales, además de constituir una fuente excelente de nutrientes, también proporcionan compuestos secundarios con determinadas estructuras químicas, capaces de aportar nuevos productos con actividad antioxidante (García *et al.* 2014). Este es el caso de *Mucuna pruriens*, una leguminosa de la familia Fabaceae, con potencial para la prevención de daños derivados del estrés oxidativo, aspecto poco estudiado en Cuba hasta el momento (Longhi *et al.* 2011).

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante y hepatoprotectora de la harina de forraje de *Mucuna pruriens* (L) vc. utilis y su extracto de polifenoles, con la utilización de ratas como modelo animal.

### Materiales y Métodos

*Recolección del material vegetal.* Se emplearon plantas de *Mucuna pruriens* (L) DC. vc. utilis (Wall. ex Wight) L. H. Bailey, sembradas en junio, en la época lluviosa, en un suelo de tipo pardo con carbonato (Hernández *et al.* 2019). Se utilizó para ello un área de la finca "Ayala" del Instituto de Ciencia Animal (ICA) de la República de Cuba. Las semillas se obtuvieron en el banco de semillas de leguminosas de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Miguel Sistach Naya" del propio instituto. No se aplicó fertilización ni riego.

El corte de las plantas se efectuó manualmente, con cuchillo, a los 80 d de sembradas, a altura de 5 cm sobre el nivel del suelo, y cuando 100 % se encontraba en flor, según describe Díaz *et al.* (2003). La parcela se cortó totalmente durante la mañana, momento en el que se seleccionaron las muestras, y se consideró la eliminación de 50 cm de efecto de borde.

*Elaboración de las harinas.* Las plantas (hojas, tallos tiernos y flores) se cortaron y trocearon. Posteriormente, se secaron a temperatura ambiente, en un local ventilado. Se redujo la humedad hasta 20 %, lo que se monitoreó con la determinación de la materia seca (MS) en diferentes momentos del proceso de secado. Las muestras se molinaron a tamaño de partícula de 1 mm y se almacenaron en bolsas de papel hasta el momento de su uso.

*Elaboración del extracto de polifenoles.* Para evaluar el efecto de los compuestos fenólicos en la actividad antioxidante *in vivo*, se elaboró por triplicado un extracto a partir de la harina de forraje de *M. pruriens*, según la metodología propuesta por Makkar (2003). Se pesaron 100 g de la harina y se le añadieron 1000 mL de la solución hidroalcohólica (70 %). Se realizó la extracción durante 15 min. con la asistencia de un equipo de ultrasonido marca Bandelin Sonorex, serie 2000, fabricado en Alemania. Se separó el sobrenadante y al residuo sólido se le repitió tres veces el proceso de extracción. La solución resultante se filtró y se rotoevaporó (se redujo el volumen a 50 %). El extracto obtenido se guardó en frascos de color ámbar y refrigeración, a temperatura de

intense green color, herbarium odor and insipid taste.

*Area of research.* The study was carry out in the Centro de Toxicología Experimental (CETEX) from the Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

The test was performed with the approving of the Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) from CENPALAB. The research was performed according to the Principles of Good Laboratory Practices (MINSAP 2004), the Operational Procedures of Work for Experimental Toxicology (POT) from CETEX (2012), and by the biosafety considerations expressed in the Biosafety Manual from the CETEX (2012).

*Environmental conditions.* The environmental conditions were daily recorded by a RH 600(POT 05.01.06.067) meter of temperature and relative humidity. The mean temperature of the room was  $23.3 \pm 0.3$  °C, humidity  $67.7 \pm 0.9$  % and the photoperiod 12:12 hours light/dark.

*Animals and diets.* A total of 60 Sprague Dawley young rats of both sex with weight between 125-150 g and average age between 7 and 8 weeks were used. They were randomly housed in T3 autoclaveables TECNIPLAST boxes, translucent plastics, individuals, with bottom and stainless metal grid lid.

A total of 20 animals (10/sex) were distributed per treatments. A control with EAO 1004 diet was established, which had the antioxidant premixture (butylhydroxytoluene BHT, vitamins and minerals) (treatment 1), and other two experimental groups, to which was supplied *M. pruriens* forage meal (treatment 2) and their polyphenols extract (treatment 3) in replacement of the antioxidant premixture, present in the control diet, that represents 2 %. To the experimental groups was supplied a unique dose of forage meal (300 mg/kg live weight) and their polyphenols extract. The diets were formulated in accordance with the nutritional requirements for this species (NRC 1995) (table 1).

5-8 °C hasta su uso.

Las características organolépticas del extracto hidroalcohólico, obtenido a partir de la harina de forraje de *M. pruriens*, fueron el color verde intenso, olor herbario y sabor insípido.

*Área de la investigación.* Este estudio se realizó en el Centro de Toxicología Experimental (CETEX) del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Cuba.

El ensayo se realizó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CENPALAB. El experimento tuvo en cuenta los Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio (MINSAP 2004), los Procedimientos Operacionales de Trabajo para la Toxicología Experimental (POT) del CETEX (2012), y por las consideraciones sobre bioseguridad expresadas en el Manual de Bioseguridad del CETEX (2012).

*Condiciones ambientales.* Las condiciones ambientales se registraron diariamente mediante un medidor de temperatura y humedad relativa, marca RH 600 (POT 2010, 05.01.06.067). La temperatura media de la sala fue  $23.3 \pm 0.3$  °C, la humedad  $67.7 \pm 0.9$  % y el fotoperiodo de 12:12 horas luz/oscuridad.

*Animales y dietas.* Se utilizaron 60 ratas jóvenes Sprague Dawley, de ambos sexos, con peso entre 125-150 g y edad promedio entre 7 y 8 semanas. Se alojaron de manera aleatoria en cajas T3 autoclaveables TECNIPLAST, plásticas traslúcidas, individuales, con fondo y tapa de rejilla de metal inoxidable.

Se distribuyeron 20 animales (10/sexo) por tratamientos. Se estableció un control, con dieta EAO 1004, que contenía la premezcla de antioxidante (butilhidroxitolueno BHT, vitaminas y minerales) (tratamiento 1), y otros dos grupos experimentales, a los que se suministró la harina de forraje de *M. pruriens* (tratamiento 2) y su extracto de polifenoles (tratamiento 3) en sustitución de la premezcla antioxidante, presente en la dieta control, que representó 2 %. A los grupos experimentales se les administró una dosis única de la harina de forraje (300 mg/kg de peso vivo) y su extracto

Table 1. Chemical composition of the experimental diets

Indicators (%)	Control diet EAO 1004	( <i>M. pruriens</i> ) forage meal	Polyphenols extract
DM	93.40	88.54	88.91
CP	26.23	26.61	27.90
Ca	0.80	0.56	0.59
P	0.48	0.42	0.43

*Diets ingredients.* The diets were composed by wheat, barley, soybean, sunflower, fish meal, sugar, calcium carbonate and common salt. The premixture contained retinol, cholecalciferol, tocopherol, phylloquinone, thiamine, riboflavin, pantothenic acid, choline, pyridoxine, cobalamin, folic acid, nicotinic acid, ascorbic acid, antioxidant (BHT), magnesium, potassium, iodine,

de polifenoles. Las dietas se formularon de acuerdo con los requerimientos nutricionales para esta especie (NRC 1995) (tabla 1).

*Ingredientes de la dieta.* Las dietas estuvieron compuestas por trigo, cebada, soya, girasol, harina de pescado, azúcar, carbonato de calcio y sal común. La premezcla contenía retinol, colecalciferol, tocoferol,

iron, copper, cobalt, manganese, zinc, selenium and molybdenum.

The adaptation of the animals to the food was carried out when supplying a mixture 50:50 of the EAO 1004 diet and the corresponding diet to each experimental group during three days. Later, in a period of 7d, they intake the diet for each group, to finish the adaptation to the food. Water and food were offered ad libitum.

*Experimental procedure.* The experiment was developed during thirty days. Twenty hours before finished the experimental period, carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ) at 10 % was given to the animals by intraperitoneal way (doses: 1 mL/kg live weight) (POT 2010; 05.02.02.008), with the objective of inducing the oxidative stress in the organism. Later, the rats were slaughtered by the application of a lethal dose of diethyl ether. With 12h fasting, blood (POT 2010; 05.02.02.009) was extracted to the animals through the orbital sinus (five/sex). The blood was collected in 2 mL vial, where was coagulate. Later, was centrifugated at 12 000 r.p.m. in an Eppendorf centrifuge for 10 min. (POT2010; 05.01.06.075) and the serum was separated. A part was use to perform biochemical determination and the other one was stored at  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  to perform other enzymatic determinations. Finally the incision of the abdominal cavity was carried out and the liver and the intestine were extracted for preparing the homogenates.

*Preparation of the liver and intestine homogenates.* A portion of the respective tissues with weight between 1.2 y 1.5 g approximately was cut. It was divided in small fragments and washed twice with 10 mL of sodium chloride solution (NaCl) 0.9 % at  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . A total of 1g of tissue was weighed and it was added 10 mL of trichloroacetic acid solution (5 %) with disodic salt and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)  $1 \times 10^{-3}$  M. It was homogenized for 6min. at 10000 rpm, at  $4\text{ }^\circ\text{C}$  temperature. Later, it was placed in refrigerated centrifuge for 15min, at 5000 rpm and  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . When finished, the precipitate was throwing away and the supernatant was stored at  $4\text{ }^\circ\text{C}$  until performing the conveniently enzymatic determinations.

*Clinical observations.* The clinical observations were daily performed in the morning during all the experimental period. The general state of animals (POT 05.02.02.002) was evaluated, as well as the changes in skin and coat, mucous membrane and eyes, respiratory and circulatory systems, central nervous system and autonomous, somatosense activity and behavior pattern. A particular attention was taking to the appearance of diarrhea, shaking, convulsions, lethargies, salivations, sleep, and/or possible deaths.

*Catalase determination.* The activity of this enzyme was determined according to the methodology described in the PNO/TEC/0314, from Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB) in Cuba. The method is based on measure the

filoquinonas, tiamina, riboflavina, ácido pantoténico, colina, piridoxina, cobalamina, ácido fólico, ácido nicotínico, ácido ascórbico, antioxidante (BHT), magnesio, potasio, iodo, hierro, cobre, cobalto, manganeso, zinc, selenio y molibdeno.

La adaptación de los animales al alimento se efectuó al suministrar una mezcla 50:50 de la dieta EAO 1004 y la dieta correspondiente a cada grupo experimental durante tres días. Posteriormente, en un período de 7 d, consumieron la fórmula destinada a cada grupo, para culminar la adaptación al alimento. El agua y el alimento se ofrecieron ad libitum.

*Procedimiento experimental.* El experimento se desarrolló durante treinta días. Veinticuatro horas antes de concluir el período experimental, se les administró a los animales tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) al 10 % por vía intraperitoneal (dosis: 1 mL/kg de peso vivo) (POT 05.02.02.008), con el propósito de inducir el estrés oxidativo en el organismo. Posteriormente, las ratas se sacrificaron por la aplicación de una dosis letal de éter dietílico. Con previo ayuno de 12 h, se les extrajo sangre (POT 05.02.02.009) a los animales a través del seno orbital (cinco/sexo). La sangre se recolectó en viales de 2 mL, donde se dejó coagular. Luego, se centrifugó a 12 000 r.p.m. en una centrifuga Eppendorf durante 10 min. (POT 2010, 05.01.06.075) y se separó el suero. Una parte se utilizó para realizar las determinaciones bioquímicas, y la otra se conservó a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  para realizar otras determinaciones enzimáticas. Por último, se realizó la incisión de la cavidad abdominal y se extrajo el hígado y el intestino para preparar los homogenatos.

*Preparación de los homogenatos de hígado e intestino.* Se cortó una porción de los tejidos respectivos, con peso entre 1.2 y 1.5 g, aproximadamente. Se dividió en pequeños fragmentos y se lavó dos veces con 10 mL de una disolución de cloruro de sodio (NaCl) 0.9 % a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Se pesó 1 g de tejido y se adicionó 10 mL de una disolución de ácido tricloroacético (5 %) con sal disódica y ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)  $1 \times 10^{-3}$  M. Se homogenizó durante 6 min. a 10000 rpm, a temperatura de  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se introdujo en una centrifuga refrigerada durante 15 min, a 5000 rpm y  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Al terminar se desechó el precipitado y se conservó el sobrenadante a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  hasta realizar las determinaciones enzimáticas convenientes.

*Observaciones clínicas.* Las observaciones clínicas se realizaron diariamente en horas de la mañana durante todo el período experimental. Se evaluó el estado general de los animales (POT 2010; 05.02.02.002), así como la aparición de cambios en piel y pelaje, membranas mucosas y ojos, sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, actividad somatomotora, y patrón de comportamiento. Se prestó particular atención a la aparición de diarreas, temblores, convulsiones, letargos, salivaciones, sueño, coma y/o posibles muertes.

*Determinación de la catalasa.* La actividad de esta enzima se determinó según la metodología descrita en el PNO/TEC/0314, del Centro de Estudios para las

decomposition speed of hydrogen peroxide, catalyzed by the catalase enzyme, at a 240 nm wavelength. For these a spectrophotometer was used (Boehringer 1987). The catalase activity was expressed in international units per liter (IU/L).

*Total phenols in serum (TF).* To determine the total polyphenols a reference solution of tannic acid (Sigma Aldrich) at 0.5 g/L concentration was used. The analysis was carrying out by using the Folin-Ciocalteu reagent, according to the methodology described by Makkar (2003).

*Indicators of the blood biochemical.* A total of 10 animals per treatment (5 per sex) were used. It was determined the total cholesterol (T-CHOL), triglycerides (TG), uric acid (UA), total proteins (TP), alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). An automatic analyzer Cobas Integra 400 PLUS (Roche Diagnostic Systems) (POT 05.01.06.081) was used for these determinations.

*Statistical analysis.* The theoretical assumptions of the analysis of variance for the ALT and AST variables for the errors normality were proven. The Shapiro-Wilk (1965) test and the variance homogeneity (Levene 1960) were used. Both variables fulfill with the assumptions that is why a completely random design in 3 x 2 factorial arrangements was used. The factors were the three treatments (control, forage meal and polyphenols extract), and the sex (females and males). The results were analyzed by the Infostat statistical package (Di Rienzo *et al.* 2012). For means comparison the Duncan (1955) test for  $P < 0.05$  was used.

## Results and Discussion

During the experiment development there were not changes associated to treatments effects on the animal's clinical events, whose behavior was normal for the species, except a male animal from treatment 3, which showed crackling noises and apparent increase of the respiratory frequency, between the 9 and 11 study days. The test end with 100 % of survival.

The determination of the antioxidant effect of the forage meal and their polyphenols extract was evaluated by the quantification of the enzymatic activity of the catalase in serum, liver and intestine. There were interaction of the factors treatment and sex for this enzyme (table 2).

The catalase serum activity showed high values ( $P < 0.05$ ) in the males from the treatment with the polyphenols extract. While, in the liver there was higher activity of the enzyme in the males from the treatment with forage meal, which was similar to the control. In the case of the intestine, the experimental treatments and the control of the males showed low catalase activity than those found in the females from the control group.

The phenolic compounds that the polyphenols extract

Investigaciones y Evaluaciones Biológicas (CEIEB) en Cuba. El método se basa en medir la velocidad de descomposición del peróxido de hidrógeno, catalizada por la enzima catalasa, a longitud de onda de 240 nm. Se utilizó para ello un espectrofotómetro (Boehringer 1987). La actividad de la catalasa se expresó en unidades internacionales por litro (UI/L).

*Fenoles totales en suero (FT).* Para determinar la concentración de polifenoles totales se utilizó una disolución de referencia de ácido tánico (Sigma Aldrich), a concentración 0.5 g/L. El análisis se realizó mediante el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu, según la metodología descrita por Makkar (2003).

*Indicadores de la bioquímica sanguínea.* Se utilizaron 10 animales por tratamiento (5 por sexo). Se determinó colesterol total (CHOL-T), triglicéridos (TG), ácido úrico (AU), proteínas totales (PT), fosfatasa alcalina (ALP), alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST). Se usó para estas determinaciones un analizador automático Cobas Integra 400 PLUS (Roche Diagnostic Systems) (POT 05.01.06.081).

*Análisis estadístico.* Se probaron los supuestos teóricos del análisis de varianza para las variables ALT y AST para la normalidad de los errores. Se utilizó la dócima de Shapiro-Wilk (1965) y la homogeneidad de varianza (Levene 1960). Ambas variables cumplieron con dichos supuestos, por lo que se empleó un diseño completamente aleatorizado en arreglo factorial 3 x 2. Los factores fueron los tres tratamientos (control, harina de forraje y extracto de polifenoles) y los sexos (hembras y machos). Los resultados se analizaron por el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.* 2012). Para la comparación de medias se empleó la dócima de comparación de rangos múltiples de Duncan (1955) para  $P < 0.05$ .

## Resultados y Discusión

Durante el desarrollo del experimento no se hallaron alteraciones asociadas a efectos del tratamiento en los signos clínicos de los animales, cuyo comportamiento fue normal para la especie, excepto un animal macho del tratamiento 3, que mostró ruidos crepitantes y aparente aumento de la frecuencia respiratoria, entre los días 9 y 11 del estudio. El ensayo concluyó con supervivencia del 100 %.

La determinación del efecto antioxidante de la harina de forraje y su extracto de polifenoles se evaluó por la cuantificación de la actividad enzimática de la catalasa en suero, hígado e intestino. Se encontró interacción de los factores tratamiento y sexo para esta enzima (tabla 2).

La actividad sérica de la catalasa mostró valores superiores ( $P < 0.05$ ) en los machos del tratamiento con el extracto de polifenoles. Mientras, en el hígado se observó mayor actividad de la enzima en los machos del tratamiento con la harina de forraje, que fue similar al control. En el caso del intestino, los tratamientos experimentales y el control de los machos presentaron menor actividad de la catalasa que la hallada en las hembras del grupo control.

Table 2. Activity of the catalase antioxidant enzyme in serum, liver and intestine of Sprague Dawley rats, treated with *M. pruriens* forage meal and their polyphenols extract.

Catalase activity (UI/L)	Sex	Treatment			(±) SE Signif.
		Control	Forage meal	Polyphenols extract	
Serum	Male	15.08 <sup>a</sup>	16.42 <sup>a</sup>	20.50 <sup>b</sup>	0.11
	Female	15.08 <sup>a</sup>	16.00 <sup>a</sup>	15.33 <sup>a</sup>	P=0.0493
Liver	Male	12.17 <sup>b</sup>	10.42 <sup>b</sup>	6.67 <sup>a</sup>	0.76
	Female	6.42 <sup>a</sup>	6.05 <sup>a</sup>	6.03 <sup>a</sup>	P=0.0063
Intestine	Male	4.33 <sup>a</sup>	4.33 <sup>a</sup>	3.92 <sup>a</sup>	0.53
	Female	8.00 <sup>b</sup>	5.08 <sup>a</sup>	4.77 <sup>a</sup>	P=0.0166

<sup>a,b</sup>Different letters per rows show significant differences for P < 0.05 (Duncan 1955)

contributes are the main responsible for the increase of the activity of the catalase antioxidant enzyme in the blood serum. The literature reports that the polyphenols which form the different vegetables extracts and foods increased the endogenous antioxidants levels, as the enzymes superoxide dismutase and catalase enzymes (Gupta *et al.* 2006).

To several flavonoids are known by their ability of inhibit the formation of free radicals, aspect related with the basic chemical structure of this compounds. The hydroxyl groups in the C<sub>5</sub> and C<sub>7</sub>, join by the double bond between the C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub>, are essential for its high inhibit activity in the free radicals formation (Spanou *et al.* 2012). Scull (2018) identified flavone glycosides in *M. pruriens* forage meal, compounds that corresponds with type of structure, that is why the inhibit activity observed in this study can attributed, in part, to the structural characteristics of these phenolic compounds.

In the liver, the increase of the enzyme activity, in the control group as in the meal treatment, seems to answer to the effect of the high number of bioactive compounds of different chemical structure presents in the diet. Similar results to this study showed Batista *et al.* (2015), when evaluating the *in vivo* antioxidant activity of the Buriti fruit (*Mauritia flexuosa*) in Wistar rats, and no found differences between the catalase values of the experimental group and the control.

When analyzing the intestine, there were significant differences between the treatment and sex. However, the females that intake the control treatment were the ones that have high activity in this organ. This result could be related with the use of one level of doses for the test products (300 mg/kg live weight) was not enough for the meal and their polyphenols extract showed antioxidant defenses in this organ. This aspect become worse, due to the high fiber (NDF) content the meal has could increase this damages.

The CCl<sub>4</sub> led the oxidative stress and damages in the intestine, which exceed the antioxidant capacity of the catalase, with the consistent decrease of their activity respect to the female control. These results are similar to those reported by Stojanović *et al.* (2016), who observed the decrease of the catalase enzyme activity in

Los compuestos fenólicos que aporta el extracto de polifenoles son los principales responsables del incremento de la actividad de la enzima antioxidante catalasa en el suero sanguíneo. La literatura informa que los polifenoles, que componen los diferentes extractos vegetales y alimentos, incrementan los niveles de antioxidantes endógenos, como las enzimas superóxido dismutasa y catalasa (Gupta *et al.* 2006).

A varios flavonoides se les conoce por su capacidad de inhibir la formación de radicales libres, aspecto relacionado con la estructura química básica de estos compuestos. Los grupos hidroxilos en los C<sub>5</sub> y C<sub>7</sub>, unidos por el doble enlace entre los C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub>, son esenciales para su alta actividad inhibitoria en la formación de los radicales libres (Spanou *et al.* 2012). Scull (2018) identificó flavonas glicosiladas en la harina de forraje de *M. pruriens*, compuestos que corresponden con este tipo de estructura, por lo que la actividad inhibidora observada en este estudio se le puede atribuir, en parte, a las características estructurales de estos compuestos fenólicos.

En el hígado, el aumento de la actividad de la enzima, en el grupo control como en el tratamiento de la harina, parece responder al efecto del elevado número de compuestos bioactivos de diferente estructura química presentes en la dieta. Resultados similares a los de este estudio señalaron Batista *et al.* (2015), al evaluar la actividad antioxidante *in vivo* de la fruta de buriti (*Mauritia flexuosa*) en la ratas Wistar, y no encontrar diferencias entre los valores de catalasa de los grupos experimentales y el control.

Al analizar el intestino, se observó que hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el sexo. Sin embargo, las hembras que consumieron el tratamiento control fueron las que presentaron mayor actividad en este órgano. Este resultado puede estar relacionado con que la utilización de un solo nivel de dosis para los productos de ensayos (300 mg/kg de peso vivo) no fue suficiente para que la harina y su extracto de polifenoles mostraran defensas antioxidantes en este órgano. Este aspecto se agrava, debido a que el alto contenido de fibra (FDN) que tiene la harina pudo incrementar estos daños.

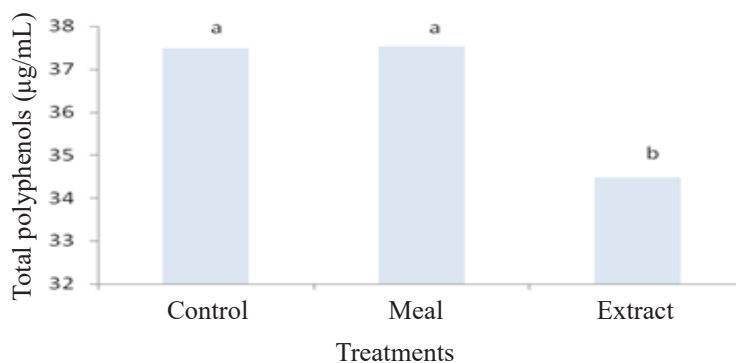
El CCl<sub>4</sub> induce el estrés oxidativo y daños en el intestino, los que superan la capacidad antioxidante de la enzima catalasa, con la consecuente disminución de

Wistar rats intestine, when supplying a solution of D.L homocystein tiolactone.

The antioxidant state of animals was determined by the concentration of phenolic compounds in plasma. There was not interaction of the treatments and sex for the serum polyphenols. Figures 1 and 2 shows the results of the total polyphenols in the serum of the Sprague Dawley rats in experimentation, for the components treatments and sex.

su actividad respecto al control de las hembras. Estos resultados son similares a los informados por Stojanović *et al.* (2016), quienes observaron la disminución de la actividad de la enzima catalasa en el intestino de ratas Wistar, al administrarle una solución de D.L homocisteina tiolactona.

El estado antioxidante de los animales se determinó mediante la concentración de compuestos fenólicos en el plasma. No se encontró interacción de los tratamientos y



P=0.0098; SE ( $\pm$ ) 0.67

Figure 1. Concentration of total polyphenols in rats serum treated with *M. pruriens* forage meal and their polyphenols extracts

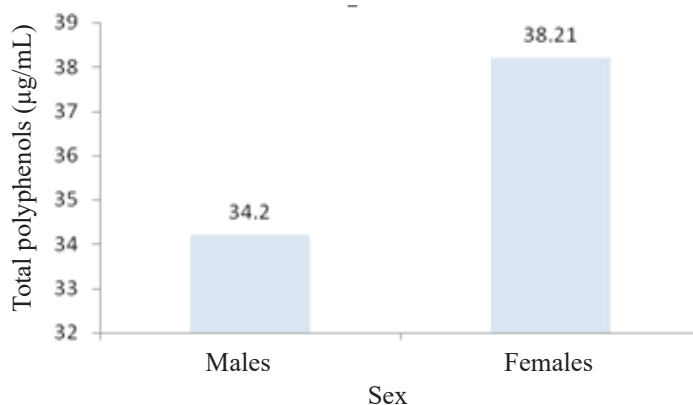
The concentration of total polyphenols in the animals serum that intake the forage meal was similar to that of the control, and differed of the polyphenols content of the group that intake the polyphenols extract. This could be due to chemical structures of the flavonoid glycosides present in the extract, because the aglicone and their glucoside can create derivates, which can be hydrosolubles and more easily to excrete (Kamiloglu *et al.* 2013).

Several studies coincided in showing that compounds with antioxidants properties as polyphenols, can improve the antioxidant oxidant state in the organism (Quiñones *et al.* 2012 and Prescha *et al.* 2018). However, the results are related with the physiology of each animal species, since the action of these compounds directly depend on their bioavailability and intrinsic factors (gastric Ph, digestive enzyme activity and bacterial microflora). These aspects can lead the hydrolysis and/

los sexos para los polifenoles séricos. En las figuras 1 y 2 se muestran los resultados de los polifenoles totales en el suero de las ratas Sprague Dawley en experimentación, para los componentes tratamiento y sexo.

La concentración de polifenoles totales en el suero de los animales que consumieron la harina de forraje fue similar a la del control, y difirió del contenido de polifenoles del grupo que ingirió el extracto de polifenoles. Esto se puede deber a las estructuras químicas de los flavonoides glicosilados presentes en el extracto, ya que las agliconas y su glucósido pueden generar derivados, que pueden ser hidrosolubles y más fácilmente excretables (Kamiloglu *et al.* 2013).

Varios estudios coinciden en señalar que compuestos con propiedades antioxidantes, como los polifenoles, pueden mejorar el estado antioxidante/oxidante en el organismo (Quiñones *et al.* 2012 y Prescha *et al.* 2018). Sin embargo, los resultados están relacionados con la fisiología de cada



P=0.0008; SE ( $\pm$ ) 0.54

Figure 2. Concentration of total polyphenols in the serum of female and male rats, treated with *M. pruriens* forage meal and their polyphenols extract

or transformation of polyphenols to biologically active and bioavailability molecules (Lizárraga-Velázquez *et al.* 2018).

In the sex component there was high ( $P < 0.05$ ) polyphenol concentration in the serum of the male rats with respect to the males total. The genus is another factor that is associated with the differences in the oxidative stress, probably due to the estrogens with antioxidant properties in females. The estrogens has a hydroxyl group in  $C_3$  position, that allows to eliminating reactive species of the oxygen and also showed its protective effect before the cellular damage of the free radicals (Kander *et al.* 2017).

The evaluation of the antioxidant and hepatoprotective effect of the forage meal and their polyphenols extract before the hepatic intoxication, lead by the carbon tetrachloride ( $CCl_4$ ), was performed by the transaminase activity. In the serum levels of the enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) there was interaction of the factors treatment and sex for both enzymes (table 3).

The serum activity of the ALT enzyme differed

especie animal, ya que la acción de estos compuestos dependerá directamente de su biodisponibilidad y de factores intrínsecos (pH gástrico, actividad de las enzimas digestivas y microflora bacteriana). Estos aspectos pueden inducir la hidrólisis y/o transformación de los polifenoles a moléculas biológicamente activas y biodisponibles (Lizárraga-Velázquez *et al.* 2018).

En el componente sexo se encontró mayor ( $P < 0.05$ ) concentración de polifenoles en el suero del total de ratas hembras con respecto al total de los machos. El género es otro factor que está asociado con las diferencias en el estrés oxidativo, probablemente debido a la presencia de estrógenos con propiedades antioxidantes en las hembras. Los estrógenos presentan un grupo hidroxilo en la posición  $C_3$ , que permite eliminar especies reactivas del oxígeno y por tanto, manifestar su efecto protector ante el daño celular de los radicales libres (Kander *et al.* 2017).

La evaluación del efecto antioxidante y hepatoprotector de la harina de forraje y su extracto de polifenoles ante la intoxicación hepática, inducida por el tetracloruro de carbono ( $CCl_4$ ), se realizó por la actividad de las transaminasas. En los niveles séricos de las enzimas alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa

Table 3. Transaminase enzymes in blood serum of rats treated with *M. pruriens* forage meal and their polyphenols extract.

Catalase activity (UI/L)	Sex	Treatment			(±) SE Signif.
		Control	Forage meal	Polyphenols extract	
ALT (U/L)	Male	67.00 <sup>a</sup>	126.67 <sup>ab</sup>	72.00 <sup>a</sup>	28.62 P=0.0385
	Female	187.00 <sup>b</sup>	80.67 <sup>a</sup>	133.33 <sup>ab</sup>	
AST (U/L)	Male	187.00 <sup>a</sup>	349.67 <sup>bc</sup>	202.67 <sup>ab</sup>	50.11 P=0.0366
	Female	488.00 <sup>c</sup>	389.33 <sup>c</sup>	496.67 <sup>c</sup>	

<sup>a,b,c</sup> Different letters per rows show significant differences for  $P < 0.05$  (Duncan 1955)

( $P < 0.05$ ) between females and males that received the control treatment. The groups that intake the resting treatments showed similar performance in both sex. The ALT enzymatic activity in the male control group did not have significant differences between the groups that were added the polyphenols extract and mucuna forage for females and males, respectively. In the serum levels of the ATS enzyme there were not differences between the female groups that intake these treatments, which showed the highest activity values. With respect to males, there were not significant differences in the control groups and those that intake the meal treatment.

When analyzing these results, it was observed that the  $CCL_4$  supply caused in the male rats from the control treatment increase of the ALT serum levels over the reference values (32.2-80.9 UI/L), reported by Alemán *et al.* (1998) and León *et al.* (2011) for Sprague Dawley species. This observation was provided by several authors during the evaluation of the antioxidant activity of different substances, in which a model of hepatic intoxication with carbon tetrachloride was used (Gupta *et al.* 2006 and Bhoomannavar *et al.* 2011). In comparison,

(AST) se encontró interacción de los factores tratamientos y sexos para ambas enzimas (tabla 3).

La actividad sérica de la enzima ALT difirió ( $P < 0.05$ ) entre hembras y machos que recibieron el tratamiento control. Los grupos que consumieron los tratamientos restantes presentaron comportamiento similar en ambos sexos. La actividad enzimática de la ALT en el grupo control de los machos no tuvo diferencias significativas entre los grupos a los que se le añadió el extracto de polifenoles y el forraje de mucuna para las hembras y machos, respectivamente. En los niveles séricos de la enzima AST no se apreciaron diferencias entre los grupos de hembras que consumieron estos tratamientos, los que mostraron los mayores valores de actividad. Con respecto a los machos, se observó que no hubo diferencias significativas en los grupos del control, y aquellos que consumieron el tratamiento de la harina.

Al analizar estos resultados, se observó que la administración de  $CCL_4$  produjo en las ratas hembras del tratamiento control incremento de los niveles séricos de ALT por encima de los valores de referencia (32.2-80.9 UI/L), informados por Alemán *et al.* (1998) y León *et al.* (2011) para la especie Sprague Dawley. Esta observación



the males showed an activity that is considered in the referenced limits for this sex, according the previous mentioned authors.

An aspect to highlighted in female rats is the decrease of the ALT serum levels in the group corresponding to the mucuna forage meal related to the control group ( $P < 0.05$ ). This show the forage meal efficiency as natural antioxidant for counteracts the  $\text{CCl}_4$  toxic effects.

The ALT is an enzyme that is in the hepatocytes mitochondria, whose crossing to the surrounding environment occurs due to damage in the hepatic functioning. The  $\text{CCl}_4$  is a chemical inductor of the hepatic damage that is why the supplying causes increase of the serum levels of this enzyme as a secondary effect (Weber *et al.* 2003). In this sense, the supplying of substances with antioxidant properties could avoid or decrease the toxic effect of this substance.

In the case of the AST enzyme, the protective effect is better for the males from the treatment where the polyphenols extract was supplied. In females, although the serum concentrations of this enzyme did not differ between treatments, the enzymatic activity was superior to the referenced levels (253 UI/L) (León *et al.* 2011). The previous could be due to the high dispersion of data (SE= 50.11 %).

Likewise, the AST is in the cytosol and mitochondria of hepatic cells, heart, skeletal muscle, brain, kidney, pancreas, lung, erythrocytes and lymphocytes, that is why the AST high levels are not specific of hepatic damage (Grattagliano *et al.* 2009). The results with the ALT enzyme are similar to those showed by Yang *et al.* (2018) in the evaluation of the hepatoprotective effect of the methyl ferulic acid before the oxidative stress induced by  $\text{CCl}_4$  in rats.

Substances as total proteins and the uric acid acted as defense mechanism against the oxidative damage of body fluids. In this experiment, where the effect of the replacement of the antioxidant premixture from the control group by the forage meal and their polyphenols extract in the blood biochemical indicators was analyzed, there were not significant interactions between sex and treatments. Tables 4 and 5 show the determinations for the main effects.

The applying of  $\text{CCl}_4$  to the rats did not caused differences for the treatment factor (table 5). All the analyzed indicators were similar to the reference values for the species (León *et al.* 2011).

Al Said *et al.* (2011) when using the  $\text{CCl}_4$  model in rats found that the Grevistenax ethanolic extract, in 250 mg/kg doses, significantly prevent the alkaline phosphatase increase.

In several researches of natural products with hepatoprotective and antioxidant activity is referred, generally, decrease of the protein synthesis, caused by the carbon tetrachloride (Bhoomannavar *et al.* 2011 and

se documentó por distintos autores durante la evaluación de la actividad antioxidante de diferentes sustancias, en las que se utilizó un modelo de intoxicación hepática con tetracloruro de carbono (Gupta *et al.* 2006 y Bhoomannavar *et al.* 2011). En contraposición, los machos mostraron una actividad que se considera en los límites referenciados para este sexo, según los autores previamente citados.

Un aspecto a destacar en las ratas hembras es la disminución de los niveles séricos de ALT en el grupo correspondiente a la harina de forraje de mucuna con relación al grupo control ( $P < 0.05$ ). Esto evidencia la eficiencia de la harina de forraje como antioxidante natural para contrarrestar los efectos tóxicos del  $\text{CCl}_4$ .

La ALT es una enzima que se halla en la mitocondria de los hepatocitos, cuyo paso al medio circundante se produce debido a un daño en el funcionamiento hepático. El  $\text{CCl}_4$  es un inductor químico del daño hepático, por lo que el suministro ocasiona aumento de los niveles séricos de esta enzima como un efecto secundario (Weber *et al.* 2003). En este sentido, la administración de sustancias con propiedades antioxidantes podría evitar o disminuir el efecto tóxico de esta sustancia.

En el caso de la enzima AST, el efecto protector se observa mejor para los machos del tratamiento donde se administró el extracto de polifenoles. En las hembras, aunque las concentraciones séricas de esta enzima no difirieron entre tratamientos, la actividad enzimática fue superior a los niveles referenciados (253 UI/L) (León *et al.* 2011). Lo anterior se puede deber a la alta dispersión de los datos (EE= 50.11 %).

Asimismo, la AST está presente en el citosol y mitocondria de células hepáticas, corazón, músculo esquelético, cerebro, riñón, páncreas, pulmón, eritrocitos y linfocitos, por lo que los niveles elevados de AST no son específicos de daño hepático (Grattagliano *et al.* 2009). Los resultados con la enzima ALT son similares a los señalados por Yang *et al.* (2018) en la evaluación del efecto hepatoprotector del ácido metil ferúlico ante el estrés oxidativo inducido por el  $\text{CCl}_4$  en ratas.

Sustancias como las proteínas totales y el ácido úrico actúan como mecanismos de defensa contra el daño oxidativo de fluidos corporales. En este experimento, donde se analizó el efecto de la sustitución de la premezcla antioxidante del grupo control por la harina de forraje y su extracto de polifenoles en los indicadores de la bioquímica sanguínea, no se observaron interacciones significativas entre sexos y tratamientos. En las tablas 4 y 5 se muestran las determinaciones para los efectos principales.

La administración de  $\text{CCl}_4$  a las ratas no ocasionó diferencias para el factor tratamiento (tabla 5). Todos los indicadores analizados fueron similares a los valores de referencia para la especie (León *et al.* 2011).

Al Said *et al.* (2011) encontraron al utilizar el modelo de  $\text{CCl}_4$  en ratas que el extracto etanólico de Grevistenax, en dosis de 250 mg/kg, previno significativamente la elevación de la fosfatasa alcalina.

En diferentes investigaciones de productos naturales

Table 4. Performance of the blood biochemical indicators in rats treated with *M. pruriens* forage meal and their polyphenols extract.

Blood biochemical	Control	Forage meal	Polyphenols extract	(±) SE Signif.	Reference values <sup>1</sup>
ALP (U/L)	110.33	119.67	120.00	11.66 P=0.8047	82.8-311.7
PT (g/L)	68.00	66.48	67.93	1.49 P=0.7246	56.69-73.5
AU (mg/dL)	0.89	1.01	0.84	0.12 P=0.5957	0.87-4.72
CHOL-T (mmol/L)	1.95	1.91	1.84	0.15 P=0.8670	2.23-4.70
TG (mmol/L)	0.66	0.82	0.60	0.12 P=0.4242	2.49-6.65

<sup>1</sup>Reference values, according to León *et al.* (2011).

Table 5. Sex component for the biochemical blood indicators in rats treated with *M. pruriens* forage meal and their polyphenols extract.

Blood biochemical	Female	Male	(±) SE Signif.	Reference values <sup>1</sup>
ALP (U/L)	86.33	147.00	9.52 P=0.0007	F: 82.8- 297.3 M: 85.4- 311.7
PT (g/L)	69.30	65.64	1.22 P=0.0550	F: 56.69-73.5 M: 59.9- 73.5
AU (mg/dL)	0.89	0.94	0.10 P=0.7289	F: 2.22- 4.72 M: 0.97- 4.72
CHOL-T (mmol/L)	2.14	1.66	0.12 P=0.0188	F: 2.28- 3.28 M: 2.23 - 4.70
TG (mmol/L)	0.52	0.86	0.10 P=0.0313	F: 4.24-7.37 M: 2.49-6.65

<sup>1</sup>Reference values, according to León *et al.* (2011).

Heba *et al.* 2011). These reports are not corresponding with the results found in this experiment, which could be mean that the mucuna forage meal and their polyphenols extract exerted their antioxidant action. This not allowed that the liver biosynthetic capacity could be affected.

The serum levels of the cholesterol and triglycerides of the experimental treatments were similar to the control. It is known that the CCl<sub>4</sub> cause hepatic damage through peroxidation process of the lipids that are in the membrane of the hepatic tissue, or through oxidant mechanisms (Surendra and Bodakhe 2007, Bhoomannavar *et al.* 2011 and Heba *et al.* 2011). In addition, the carbon tetrachloride is a very lipophilic compound, that could also acting increasing fat solubility and making easier its passing to the bloodstream.

Related to sex factor (table 5), the males differed to the females in all the analyzed indicators, except the AU levels. Females, in general, were superior to males for total proteins and cholesterol, while the males exceed the females in the serum values of phosphatase and triglycerides.

The fact that the males have serum concentrations of alkaline phosphatase higher than the females could be due to their fasting growing and this enzyme reached higher values in fast growing animals (Wolford *et al.* 1986). Similar results were found by Alemán *et al.* (1998) and Hatayama *et al.* (2003), when they analyzed biochemical blood indicators in laboratory rats from the Sprague Dawley species.

con actividad hepatoprotectora y antioxidante se refiere, generalmente, disminución de la síntesis de proteínas, causada por el tetracloruro de carbono (Bhoomannavar *et al.* 2011 y Heba *et al.* 2011). Estos informes no se corresponden con los resultados hallados en este experimento, lo que pudiera significar que la harina de forraje de mucuna y su extracto de polifenoles ejercieron su acción antioxidante. Esto no permitió que se afectara la capacidad biosintética del hígado.

Los niveles séricos de colesterol y triglicéridos de los tratamientos experimentales fueron similares al control. Se conoce que el CCl<sub>4</sub> causa daño hepático por medio de procesos de peroxidación de los lípidos presentes en la membrana del tejido hepático, o sea, a través de mecanismos oxidantes (Surendra y Bodakhe 2007, Bhoomannavar *et al.* 2011 y Heba *et al.* 2011). A este hecho contribuye que el tetracloruro de carbono es un compuesto muy lipofílico, que pudiera también actuar aumentando la solubilidad de las grasas y facilitando su transporte hacia el torrente sanguíneo (Surendra y Bodakhe 2007).

Con relación al factor sexo (tabla 5), se encontró que los machos difirieron de las hembras en todos los indicadores analizados, excepto en los niveles de AU. Las hembras, en general, fueron superiores a los machos para proteínas totales y colesterol, en tanto que los machos superaron a las hembras en los valores séricos de fosfatasa alcalina y triglicéridos.

El hecho de que los machos tengan concentraciones séricas de fosfatasa alcalina más elevadas que las hembras se puede deber a que crecen más rápido, y esta enzima alcanza valores más altos en animales de rápido

León *et al.* (2011), when reporting the common performance ranges for hematochemical indicators in rats, explained that the differences between genus can be due to the organism physical size and the hormonal changes of each sex. Kander *et al.* (2017) showed the relation between the genus and the oxidative stress, since stress is involved in many diseases that are in different ways between males and females. For the oxidative stress occurred, should exist imbalance between the ERO production and the antioxidant defense system. That is why, it is considered that there is difference in the expression and/or activities of the antioxidant enzymes between man and women.

In spite of the results showed until today, a great number of researchers to better explore the function that the genus developed in the gene expression of the antioxidants and other genes associated to the oxidative stress are needed.

The results of this experiment showed that the *M. pruriens* forage meal and their polyphenols extract have antioxidant activity and hepatoprotective functions against the oxidative stress damage in Sprague Dawley rats. It suggested to evaluate their antioxidant potential in productive animals and to include studies of doses optimization for different animal categories.

The performed study should contribute and stimulate the use of the aggregate value of this legume as local resource for animal feeding, because the use of plants in productive systems is still poor.

#### Acknowledgments

Thanks to the researches, specialists and technicians from the Centro de Toxicología Experimental (CETEX), del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), for carry out part of this experiment.

crecimiento (Wolford *et al.* 1986). Resultados similares hallaron Alemán *et al.* (1998) y Hatayama *et al.* (2003), cuando analizaron indicadores de la bioquímica sanguínea en las ratas de laboratorio de la especie Sprague Dawley.

León *et al.* (2011), al informar los rangos de comportamiento normal para los indicadores hematoquímicos en ratas, argumentaron que las diferencias entre género se pueden explicar debido al tamaño físico del organismo y a los cambios hormonales de cada sexo. Kander *et al.* (2017) señalaron la relación entre el género y el estrés oxidativo, ya que el estrés está involucrado en muchas enfermedades que se presentan de manera diferente entre varones y hembras. Para que ocurra el estrés oxidativo, debe existir desequilibrio entre la producción de ERO y el sistema de defensa antioxidante. Por tanto, se considera que hay diferencia en la expresión y/o actividades de las enzimas antioxidantes entre hombres y mujeres.

A pesar de los resultados mostrados hasta el momento, se necesita mayor número investigaciones para explorar mejor la función que desempeña el género en la expresión génica de los antioxidantes y otros genes asociados al estrés oxidativo.

Los resultados de este experimento mostraron que la harina de forraje de *M. pruriens* y su extracto de polifenoles poseen actividad antioxidante y funciones hepatoprotectoras contra el daño del estrés oxidativo en ratas Sprague Dawley. Se sugiere evaluar su potencial antioxidante en animales productivos e incluir estudios de optimización de dosis para diferentes categorías de animales.

El estudio realizado debe contribuir e incentivar el aprovechamiento del valor agregado de esta leguminosa como recurso local para la alimentación animal, ya que el uso de plantas en los sistemas productivos todavía es insuficiente.

#### Agradecimientos

Se agradece a los investigadores, especialistas y técnicos del Centro de Toxicología Experimental (CETEX), del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), por la realización de una parte de este experimento.

#### References

- Alemán, C.L., Más, R.M., Rodeiro, I., Noa, M., Hernández, C., Menéndez, R. & Gámez, R. 1998. "Reference database of the main physiological parameters in Sprague-Dawley rats from 6 to 32 months". *Laboratory Animals*, 32(4): 457-466, ISSN: 0023-6772, DOI: <https://doi.org/10.1258/002367798780599802>.
- Al-Said, M.S., Mothana, R.A., Al-Sohaibani, M.O. & Rafatullah, S. 2011. "Ameliorative effect of *Grewia tenax* (Forssk) fiori fruit extract on CCL<sub>4</sub>-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats". *Journal of Food Science*, 76(9): T200-T206, ISSN: 0022-1147, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02381.x>.
- Batista, A., Carvalho M.C., Moreira, P.H., Trindade, N.R., da Silva, A.K., Marinho, P.F., de Lima, A., de Assis, R.C. & Moreira, E. 2015. "In vitro and in vivo antioxidant activity of Buriti fruit (*Mauritia flexuosa* L.f.)". *Nutrición Hospitalaria*, 32(5): 2153-2161, ISSN: 0212-1611, DOI: <http://doi.org/10.3305/nh.2015.32.5.9603>.
- Bhoomannavar, V.S., Patil, V.P., Shivakumar, H., Nanjappaiah, H.M. & Navanath, K. 2011. "Anti-ulcer activity of *Neptunia oleracea* Lour". *Pharmacologyonline*, 3: 1015-1020, ISSN: 1827-8620.
- Boehringer, M. 1987. *Biochemical Information. A revised biochemical reference sources. Enzymes for routine*. 1st Ed. Ed. Boehringer Mannheim, Berlin, Germany, p. 15-16
- CETEX. 2012. *Procedimientos Operacionales de Trabajo (POT). Manual de Bioseguridad del CETEX*, CENPALAB, Mayabeque, Cuba

- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStat version 2012 [Windows]. Grupo InfoStat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <http://www.infostat.com.ar>
- Díaz, M.F., González, A., Padilla, C. & Curbelo, F. 2003. "Performance of forage and grain production of *Canavalia ensiformis*, *Lablab purpureus* and *Stizolobium niveum* plantations sown in September". Cuban Journal of Agricultural Science, 37(1): 65-71, ISSN: 2079-3480.
- Duncan, D.B. 1955. "Multiple range and multiple F test". Biometrics, 11(1): 1-42, ISSN: 0006341X, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- García, N., García, M.R., Castillo, A.M., Sahagún, J. & Jiménez, A. 2014. "Componentes nutricionales y antioxidantes de dos especies de Guaje (*Leucaena spp.*): Un recurso ancestral subutilizado". Revista Chapingo Serie Horticultura. 20:157, DOI: 10.5154/r.rchsh.2013.07.023, [Consulted: August 25, 2017].
- Grattagliano, I., Ubaldi, E., Portincasa, P. & Palasciano, G. 2009. "Liver disease: early signs you may be missing". The Journal of Family Practice, 58(10): 514-521, ISSN: 0094-3509.
- Gupta, A.K., Chitme, H., Dass, D.K. & Misra, N. 2006. "Antioxidant activity of Chamomile recutita capitula methanolic extracts against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in rats". Journal Pharmacology Toxicology, 1(2): 101-107, ISSN: 1816-496X, DOI: <https://doi.org/10.3923/jpt.2006.101.107>.
- Hatayama, K., Kobayashi, J., Ishii, T., Kinoshita, Y., Ichikawa, Y. & Okazaki, S. 2003. Background data of blood chemistry parameters in toxicity studies using Crj: CD (SD) IGS rats at 10, 19 and 32 weeks of age. In: Biological reference data on CD (SD) IGS Rats-2002/2003. (Maeda Y. and Shibuya, K., Eds.) Ed. CD (SD) IGS Study Group, Yokohama, Japan.
- Heba, E., Yossef, A.A., Khedr, Z. & Mohamed, Z.M. 2011. "Hepatoprotective and antioxidant effects of *Zizyphus spina-christi* fruits on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats". Nature and Science, 9: 1-7, ISSN: 1545-0740.
- Hernández, A., Pérez, J.M., Bosch, D. & Castro, N. 2019. Clasificación de los suelos de Cuba: énfasis en la versión de 2015. Cultivos Tropicales. 40(1): a15-e15, ISSN: 1819-4087.
- Kamiloglu, S., Serali, O., Unal, N. & Capanoglu, E. 2013. "Antioxidant activity and polyphenol composition of black mulberry (*Morus nigra* L.) products". Journal of Berry Research, 3(1): 41-51, ISSN: 1878-5123, DOI: <https://doi.org/10.3233/JBR-130045>.
- Kander, M.C., Cui, K. & Liu, Z. 2017. "Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases". Journal of Cellular and Molecular Medicine, 21(5): 1024-1032, ISSN: 1582-4934, DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.13038>.
- León, A., Blanco, C., Peña, A., Ronda, M., González, B.O., Arteaga, M.E. & Bada, A.M., González, Y. & Mancebo, A. 2011. "Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cemp: SPRD". REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 12(11): 1-10, ISSN: 1695-7504.
- Levene, H. 1960. Robust tests for the equality of variance. Contributions to Probability and Statistics. 1st Ed. Ed. Stanford University Press, Palo Alto, California, USA, p. 278-292
- Lizárraga-Velázquez, C.E., Hernández, C., González-Aguilar, G.A. & Basilio-Heredia, J.B. 2018. "Antioxidant and immunostimulant properties of polyphenols in carnivorous farmed fish". Biotecnología y Ciencias Agropecuarias, 12(2): 127-136, ISSN: 2007-7521, DOI: <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v12i2.904>.
- Longhi, J.G., Pérez, E., Lima, J.J. & Bileski, L.M. 2011. "In vitro evaluation of *Mucuna pruriens* (L.) DC. antioxidant activity". Brazilian Journal of Pharmaceutical Science, 47(3): 535-544, ISSN: 2175-9790, DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000300011>.
- Makkar, H.P.S. 2003. Quantification of tannins in tree and shrub foliage. A laboratory manual. 1st Ed. Ed. Springer Netherlands, Netherlands, ISBN: 978-94-017-0273-7, DOI: <https://doi.org/10.1007/978-94-017-0273-7>.
- MINSAP (Ministerio de Salud Pública). 2004. Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio No Clínico de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental, Regulación 39/2004, La Habana, Cuba.
- NRC (National Research Council). 1995. Nutrient Requirements of Laboratory Animal. 4th Rev. Ed. Ed. The National Academies Press, Washington DC, U.S.A., ISBN: 978-0-309-05126-2, DOI: <https://doi.org/10.17226/4758>.
- PNO/TEC/0314. 2003. Determinación de catalasa. CEIEB, La Habana, Cuba.
- PNO/TEC/0345. 2005. Determinación de la capacidad reductora de hierro férrico del plasma (FRAP). CEIEB, La Habana, Cuba.
- POT (2010). Manual de procedimientos operacionales de trabajo. Centro de Toxicología Experimental. Centro Nacional para la Producción de animales de laboratorio, CENPALAB. Ed. 2000-2010, Cuba.
- Prescha, A., Zabłocka-Słowińska, K., Płaczowska, S., Gorczyca, S., Łuczak, A., Majewska, M. & Grajeta, H. 2018. "Diet quality and its relationship with antioxidant status in patients with rheumatoid arthritis". Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018(8506343): 1-10, ISSN: 1942-0900, DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/8506343>.
- Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. 2012. "Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular". Nutrición Hospitalaria, 27(1): 76-89, ISSN: 0212-1611, DOI: <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>.
- Rojas, V., Callacna, M. & Arnaiz, V. 2015. "Uso de un aditivo a base de cantaxantina y extracto de achiote en dietas de gallinas de postura y su efecto sobre la coloración de la yema y la vida de anaquel del huevo". Scientia Agropecuaria, 6(1): 191-199, ISSN: 2077-9917, DOI: <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.03.05>.
- Román-Cortés, N., García-Mateos, M del R., Castillo-González, A.M., Sahagún-Castellanos, J., Jiménez-Arellanes, M.A. 2014. "Nutritional components and antioxidants of two species of guaje (*Leucaena spp.*): an underutilized traditional resource". Revista Chapingo Serie Horticultura, 20(2): 157-170, ISSN: 1027-152X, DOI: <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2013.07.023>.
- Salazar, I., Rodríguez, R., Betancourt, C., Martínez, Y. & Guillaume, G. 2019. "Análisis de los metabolitos secundarios del polvo de hojas de *Origanum vulgare* y *Ficus pandurata*". Revista de Producción Animal, 31(1): 61-63, ISSN: 2224-7920.

- Savón, L. 2010. Harina de forrajes tropicales. Fuentes potenciales para la alimentación de especies monogástricas. 2nd PhD Thesis. Departamento de Fisiología y Bioquímica, Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba, p. 252.
- Scull, I. 2018. Caracterización química de la harina de forraje de *Mucuna pruriens* (L) D. cv. utilis (Wall. Ex Wight) L.H. Bailey y su evaluación como antioxidante natural para la alimentación animal. PhD Thesis. Departamento de Fisiología y Bioquímica, Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba, p. 101.
- Shapiro, S. & Wilk, B. 1965. "An analysis of variance test for normality (complete samples) ", *Biometrika*, 52 (3/4): 591-611, ISSN: 1464-3510, DOI: <https://doi.org/10.2307/2333709>.
- Spanou, C., Veskoukis, A.S., Kerasioti, T., Kontou, M., Angelis, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.L. & Kouretas, D. 2012. "Flavonoid Glycosides Isolate from Unique Legume Plant Extracts as Novel Inhibitors of Xanthine Oxidase". *Plos One*, 7(3): e32214, ISSN: 1932-6203, DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0032214>.
- Stojanović, M., Šćepanović, L., Bosnić, O., Mitrović D., Jozanov-stankov, O., Šćepanović, V., Šćepanović, R., Stojanović, T., Ilić, S. & Djurić, D. 2016. "Effects of acute administration of D,L- homocysteins thiolactone on the antioxidative status of rat intestine and liver". *Acta Veterinaria Belgrade*, 66(1): 26-36, ISSN: 1820-7448, DOI: <https://doi.org/10.1515/acve-2016-0002>.
- Surendra, H. & Bodakhe, A.R. 2007. "Hepatoprotective Properties of *Bauhinia variegata* Bark Extract". *Yakugaku Zasshi*, 127(9): 1503-1507, ISSN: 0031-6903, DOI: <https://doi.org/10.1248/yakushi.127.1503>.
- Weber, L.W.D., Boll, M. & Stampfl, A. 2003. "Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model". *Critical Reviews in Toxicology*, 33(2): 105-136, ISSN: 1040-8444, DOI: <https://doi.org/10.1080/713611034>.
- Wolford, S.T., Schoer, R.A., Gohs, F.X. & Gallo, P.P. 1986. "Reference range database for serum chemistry and haematology values in laboratory animals". *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 18(2): 161-188, ISSN: 1528-7394, DOI: <https://doi.org/10.1080/15287398609530859>.
- Yang, C., Li, L., Zuheng, M.A., Zhong, Y., Pang, W., Xiong, M., Fang, S. & Li, Y. 2018. "Hepatoprotective effect of methyl ferulic acid against carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats". *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(3): 2228-2238, ISSN: 1792-0981, DOI: <https://doi.org/10.3892/etm.2017.5678>.

**Received: June 24, 2019**

**Accepted: February 21, 2020**