

39



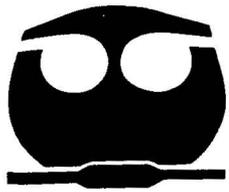
# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DE LOS TANINOS DEL FRIJOL NEGRO  
JAMAPA *in vitro* SOBRE LA ACTIVIDAD  
ENZIMATICA DE LA MALTASA, SACARASA Y  
LACTASA DEL INTESTINO DELGADO DE RATAS.

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A  
SANDRA VERONICA MARTINEZ ACOSTA



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado asignado:**

<b>Presidente</b>	Prof. Ángela Sotelo López
<b>Vocal</b>	Prof. Bernardo Lucas Florentino
<b>Secretario</b>	Prof. Lucía Cornejo Barrera
<b>1º Suplente</b>	Prof. Leticia Gil Vieyra
<b>2º Suplente</b>	Prof. Enrique Martínez Manrique

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria.



Aseora, Ángela Sotelo López



Supervisor, Rosa María Argote Espinosa



Sustentante, Sandra Verónica Martínez Acosta.

Dedico especialmente esta tesis a mis padres Matias y María del Carmen, porque gracias a sus esfuerzos, a su apoyo siempre incondicional, a su gran cariño y sobre todo por la inmensa confianza que me han brindado durante todo este tiempo, he logrado alcanzar hasta el momento cada uno de mis objetivos.

Los quiero mucho.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser una excelente institución académica la cual permitió mi formación profesional y me brindo la oportunidad de desarrollarme tanto física como intelectualmente.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por el apoyo económico otorgado a través del proyecto IN-202998 para la realización de este estudio.

A la M.C. Angela Sotelo López por ser una guía académica invaluable. Por su apoyo y confianza en la realización de la presente.

Al Dr. Atonatiuh y al personal del Bioterio del Edificio "A" de la Facultad de Química por la asesoría otorgada.

A mis hermanos Georgina, Sara, Clara, Francisco, Olga, Graciela y Laura, porque siempre estuvieron a mi lado para brindarme un buen consejo, darme más de un momento de alegría, de apoyo moral, de dedicación y ofrecerme la mano cuando más lo necesitaba. Gracias.

Un agradecimiento muy cordial a Rosita Argote, que me enseñó que siempre alcanzaría mis metas al ser tenaz y no claudicar en los momentos difíciles. Gracias por tú gran ejemplo y amistad. Sabes que siempre te recordaré.

A todos mis amigos del laboratorio 111: Argelia, Anita, Carlos, Gaby, Helga, Iliana, Lety, Nancy, Noriko y Rosy, se que me llevó valiosos recuerdos de cada uno de ustedes; su compañía hizo que cada momento fuese único y especial.

A la Sra. Vicky le quiero agradecer su grata compañía, sus agradables conversaciones y sus valiosos consejos.

A Claudia y Blanca por ser mis grandes amigas y cómplices de travesuras, tristezas y alegrías, durante los casi 5 años que convivimos en la Facultad. Porque no importando los buenos o malos momentos, se que cuento con ustedes.

A todos mis amigos Amor, Alma, Brenda, Diana, Hilda, Joaquín, Joseline, Mayanín, Verónica, Myrna, Perla y Silvia, les agradezco su amistad incondicional. Tienen un lugar especial en mi corazón.

Ili no creas que lo he olvidado:

*"Hombres necios que acusais a la  
mujer sin razón..."*

## INDICE

<b>Capítulo 1</b>	<b>Introducción</b>	<b>4</b>
<b>Capítulo 2</b>	<b>Objetivos</b>	<b>7</b>
	<b>Justificación</b>	<b>8</b>
	<b>Hipótesis</b>	<b>8</b>
<b>Capítulo 3</b>	<b>Antecedentes</b>	
	<b>Frijol Negro</b>	
	<b>Generalidades</b>	<b>10</b>
	<b>Composición química</b>	<b>10</b>
	<b>Factores tóxicos y antinutricionales</b>	<b>11</b>
	<b>Compuestos Polifenólicos</b>	
	<b>Generalidades</b>	<b>12</b>
	<b>Clasificación</b>	<b>12</b>
	<b>Interacciones</b>	<b>14</b>
	<b>Acción biológica</b>	<b>15</b>
	<b>Inhibición de enzimas</b>	<b>16</b>
	<b>Disacaridasas del Intestino Delgado</b>	
	<b>Hidratos de carbono</b>	<b>18</b>
	<b>Disacaridasas</b>	<b>18</b>
	<b>Digestión de los hidratos de carbono</b>	<b>19</b>
	<b>Métodos de determinación de la actividad de las disacaridasas</b>	<b>21</b>
	<b>Unidad de actividad enzimática</b>	<b>21</b>
<b>Capítulo 4</b>	<b>Metodología</b>	
	<b>Diagrama de flujo</b>	<b>24</b>
	<b>Preparación de las muestras</b>	<b>25</b>
	<b>Determinación de taninos</b>	<b>27</b>
	<b>Determinación de proteína</b>	<b>31</b>
	<b>Determinación de glucosa</b>	<b>35</b>
	<b>Ensayo enzimático</b>	<b>39</b>
	<b>Evaluación del efecto de los taninos</b>	<b>43</b>
	<b>Análisis estadístico</b>	<b>45</b>
<b>Capítulo 5</b>	<b>Resultados y Discusión</b>	
	<b>Determinación en las muestras de frijol</b>	<b>47</b>
	<b>Determinación de taninos</b>	

## ÍNDICE

	Curva patrón	47
	Determinación muestras	48
	Determinación de proteína	
	Curva patrón	50
	Determinación muestras	50
	Determinación de glucosa	
	Curva patrón glucosa	52
	Ensayo enzimático (determinación muestras)	52
	Efecto de los taninos en la actividad de las disacaridasas	57
	Inhibición sobre la maltasa	57
	Inhibición sobre la sacarasa	58
	Inhibición sobre la lactasa	59
Capítulo 6	Conclusiones	62
Capítulo 7	Bibliografía	64



# CAPITULO I

---

## INTRODUCCIÓN

En México una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en la infancia es la desnutrición. La alimentación idónea parte de la base del grupo de alimentos del país y se consideran: a) cereales, tubérculos y leguminosas, b) frutas y verduras y c) alimentos de origen animal. Los azúcares y las grasas son considerados como grupo complementario de la alimentación diaria.<sup>1</sup> En este modelo se prestigan las leguminosas y su combinación con cereales a fin de incrementar su contenido de aminoácidos.<sup>1,2</sup>

La creciente demanda de alimentos en la república mexicana conlleva a la búsqueda de fuentes de abastecimiento económicamente accesibles y que aseguren el futuro alimentario.<sup>2,3</sup> Entre los alimentos vegetales, las leguminosas presentan una importante alternativa porque son fuente rica en proteínas, además, muestran una gran aceptación y bajos precios.<sup>2,4</sup>

Dentro de las leguminosas más consumidas se encuentra el frijol, el cual forma parte de la alimentación tradicional de la dieta mexicana<sup>5</sup>, siendo la principal fuente de proteína vegetal.<sup>2,6-9</sup> El frijol negro también aporta un alto contenido de hidratos de carbono, una cantidad aceptable de vitaminas y minerales,<sup>2,5,7</sup> sin embargo su deficiencia de aminoácidos azufrados<sup>10,11</sup> y la presencia de factores antinutricionales y tóxicos pueden dañar en varios grados la utilización biológica de sus nutrimentos, particularmente de la proteína.<sup>3,5,10,12-14</sup> Estudios realizados han demostrado que el proceso de cocción es el responsable de la eliminación de sustancias tóxicas, a excepción de los taninos, en donde solo se presenta una reducción<sup>5,8,10,13,15,16</sup> y su actividad está basada en su estructura química, la cual es rica en grupos -OH que los convierte en compuestos altamente afines a las proteínas;<sup>17</sup> logrando en la dieta tener un efecto en la disponibilidad y la calidad nutricia de las proteínas que provienen de los alimentos de la dieta,<sup>3,9,10,16,18-21</sup> así como las presentes en las enzimas digestivas.<sup>5,11,14,16,19-26</sup>

El enfoque dado al conocimiento del mecanismo de acción de los taninos contenidos en los frijoles sobre la actividad biológica de las enzimas maltasa, sacarasa y lactasa presentes en el intestino delgado, es de gran relevancia debido a la posible disminución de su actividad biológica y las repercusiones que ello tenga en la nutrición.

El conocer adecuadamente el mecanismo de acción de los taninos nos ayudará a utilizar diversas leguminosas no convencionales que presentan un alto potencial nutricional, pero que tienen un alto contenido de factores antinutricionales, como los taninos; lo cual

## INTRODUCCIÓN

las excluye de la alimentación humana y animal; disminuyendo las posibilidades de obtener proteínas de origen vegetal a un bajo costo.

El presente trabajo utilizó tres diferentes etapas de vida de las ratas (15, 21 días y 2 meses de vida), donde se evaluó la actividad enzimática de la maltasa, la sacarasa y la lactasa; así mismo en estas disacaridas se adicionaron soluciones de taninos procedentes del frijol negro Jamapa, donde se pudieron observar los efectos de los polifenoles sobre la actividad hidrolítica de dichas enzimas en las condiciones dadas a éste estudio.



## CAPITULO II

---

### OBJETIVOS

**GENERAL**

- ↳ Conocer el efecto que puedan tener los taninos de la cáscara del frijol negro Jamapa sobre las disacaridasas (maltasa, sacarasa y lactasa) que se generan en la mucosa intestinal.

**PARTICULARES**

- ↳ Evaluar la cantidad de taninos presentes en el extracto obtenido de la cáscara del frijol negro Jamapa.
- ↳ Determinar la cantidad de proteína presente en el extracto enzimático de la mucosa intestinal .
- ↳ Establecer la actividad enzimática de las enzimas maltasa, sacarasa y lactasa.
- ↳ Evaluar el efecto que tienen los taninos del frijol negro Jamapa en un ensayo *in vitro* sobre la actividad de las enzimas disacaridasas.

## JUSTIFICACIÓN

Aun cuando no se conoce bien el mecanismo de acción de los taninos, diversos estudios han demostrado que la cascarilla de los frijoles tiene un alto contenido de taninos y son la causa de un bajo aprovechamiento de los macronutrientes de esta leguminosa, por lo que es importante conocer el efecto que tienen los taninos del frijol sobre la actividad de las enzimas digestivas.

## HIPÓTESIS

La disminución de la actividad de las disacaridasas presentes en el intestino delgado de las ratas será proporcional a la cantidad de taninos totales ingeridos, es decir, a mayor cantidad de taninos totales ingeridos hay mayor disminución en la actividad biológica de las disacaridasas.



## CAPITULO III

---

### ANTECEDENTES

## FRIJOL NEGRO

### Generalidades.

El frijol pertenece a la familia de las leguminosas, subfamilia de *Papilionoideas*, tribu Faseoleas, subtribu Faseolineas y género *Phaseolus*. Se cultiva en áreas templadas y en regiones semitropicales.<sup>2</sup>

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) ocupa un lugar importante en la dieta mexicana y en los países latinoamericanos. Siendo el frijol negro la variedad más consumida en el sureste del país y en el D.F., con una frecuencia de consumo de al menos cinco veces por semana en un 74% de la población que los incluye en su dieta.<sup>7</sup>

La constitución química del frijol depende de la variedad, de la localización geográfica y de las condiciones de cultivo del mismo.<sup>4,12</sup>

### Composición Química.

En el frijol las proteínas representan el 18-22 %; se encuentran en mayor parte en los cotiledones (95%), el resto se distribuye en el embrión (3%) y en la cáscara (1-2%). Su perfil de aminoácidos es rico en lisina y la metionina es el aminoácido limitante primario. Los hidratos de carbono se encuentran en una proporción del 50-60%, y se conforman por mono y oligosacáridos, almidón y otros polisacáridos. El contenido de lípidos es muy bajo comparado con otras leguminosas, el cual está en un 2-2.5%, y están constituidos principalmente por una mayor proporción de ácidos grasos insaturados (aprox. 85%), que de ácidos grasos saturados (aprox. 15%). Contiene alrededor de un 4% de fibra, que se localiza principalmente en la cáscara del frijol; como hemicelulosa y pectina. Finalmente presenta del 10-12 % de humedad. En cuanto a las cenizas su contenido tiene un 4% aproximadamente y éstas son ricas principalmente de sales de fósforo, potasio, magnesio y calcio.<sup>2,27</sup>

### Factores Tóxicos y Antinutricionales.

Los frijoles presentan cantidades apreciables de agentes que afectan el aprovechamiento de los nutrimentos y que son llamados factores antinutricionales por ejemplo, inhibidores de proteasas, inhibidores de amilasas, fitatos, hidratos de carbono de difícil digestión, saponinas, factor antiniacina, compuestos fenólicos y algunos considerados tóxicos como los glucósidos cianogénicos y hemaglutininas (lectinas).<sup>2, 4-6, 12</sup>

En el frijol, los taninos y compuestos fenólicos están presentes en los tejidos de las plantas<sup>5, 17, 19, 22, 26, 28</sup> y están concentrados en las cáscaras; se ha observado que entre mayor colorido tenga la cáscara mayor será el contenido de taninos;<sup>3, 9, 11, 12, 29, 30</sup> con lo que un descascarado de la semilla de esta leguminosa incrementaría significativamente el valor nutritivo de las proteínas.<sup>17, 18</sup>

En general el frijol se consume de diferentes maneras, siempre con un proceso de cocción preliminar. Durante la cocción de los alimentos ocurren cambios en la estructura de la proteína<sup>2, 6</sup> y la pérdida de algunos factores antinutricionales,<sup>2, 4, 5, 16</sup> con excepción de los polifenoles.<sup>5, 6, 11, 14, 17, 28</sup> Una cocción insuficiente deja presentes agentes antinutricionales, mientras que un calentamiento en exceso puede resultar en una reducción del valor nutritivo de la proteína del frijol.<sup>6-9</sup> Además, se ha encontrado que una buena proporción de taninos son extraídos en el caldo resultante del cocimiento.<sup>6, 10, 11, 13, 15, 28</sup>

## COMPUESTOS POLIFENOLICOS (TANINOS).

### Generalidades.

El uso de los taninos data del siglo XVII en el que se utilizaban para curtir pieles, lo cual es una consecuencia de la interacción de estos compuestos con las proteínas de la piel.

Definición. El término polifenoles se refiere a la familia de compuestos polifenólicos, de los cuales aquellos que precipitan las proteínas en solución acuosa son llamados taninos,<sup>17</sup> que tienen peso molecular entre 500-3000,<sup>19, 20, 26, 30</sup> y una de las características principales de los grupos hidroxilo de los fenoles es que son buenos donadores de protones en la formación de puentes de hidrógeno. Algunos de los fenoles poliméricos tienen muchos de estos grupos donadores, formando complejos con otras moléculas que son estables y tienden a precipitarlas.<sup>19, 24</sup>

Los taninos son sustancias que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza,<sup>12</sup> son parte importante de los metabolitos secundarios involucrados en la defensa de las plantas. Se encuentran principalmente en las semillas de ciertos cultivos pigmentados de sorgo,<sup>5, 12, 18, 31</sup> de leguminosas<sup>9, 12</sup> como: chícharos,<sup>4, 19</sup> garbanzo,<sup>9</sup> frijol,<sup>2-4, 9, 13-16, 21, 26-29</sup> algunas frutas<sup>13, 17, 24</sup> y raíces.<sup>24, 32</sup>

### Clasificación.

De acuerdo a su estructura, propiedades fisicoquímicas y a su reactividad a diversos agentes hidrolíticos, los taninos se han dividido en dos grupos: el de los taninos hidrolizables y el de los taninos condensados.<sup>5, 14, 24, 33</sup>

Los taninos hidrolizables (figura 1) son fácilmente cortados por enzimas y por ácidos diluidos, obteniéndose azúcares como la glucosa y ácidos fenol-carboxílicos como el ácido gálico (la mayoría son polímeros de glucosa);<sup>5, 14, 24, 30-33</sup> el ácido tánico es el más común de los taninos hidrolizables.<sup>5, 17</sup>

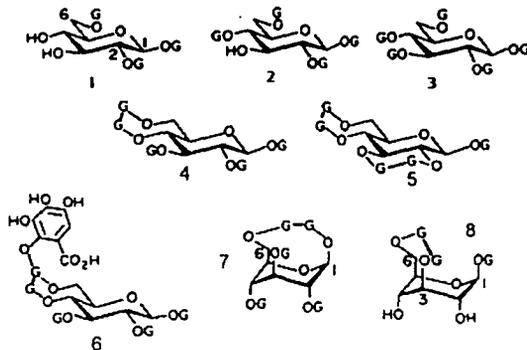


Figura 1. TANINOS HIDROLIZABLES. 1)  $\beta$ -1,3,6-tri-O-galoil-D-glucosa , 2)  $\beta$ -1,2,4,6-tetra-O-galoil-D-glucosa , 3)  $\beta$ -penta-O-galoil-D-glucosa , 4) telimagrandina , 5) casuarictina , 6) rugosina , 7) davidina , 8) corilagina .

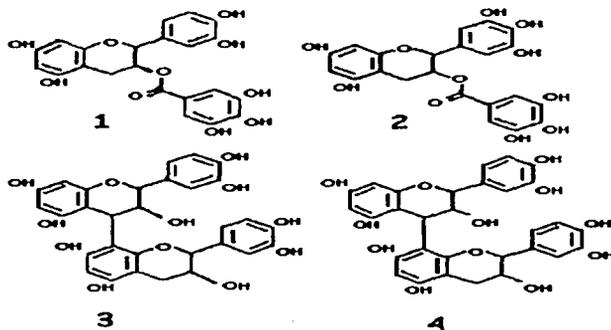


Figura 2. TANINOS CONDENSADOS. 1) (+)-3-o-galoitequina , 2) (-)-3-o-galoilepigalocatequina , 3) proclanidina B-3, 4) proclanidina B-2.

Los taninos condensados (figura 2) son sustancias poliméricas formadas por unidades de moléculas de flavan-3-ol se denominan proantocianidinas debido a su propensión para despolimerizarse en medio ácido para producir pigmentos antocianidínicos como la cianidina, o flavan-3,4-diols (leucoantocianidinas).<sup>5, 20, 24, 30-33</sup>

### Interacciones.

Los estudios de la asociación reversible de los polifenoles con proteínas tienen una larga historia. Esta asociación se debe a un fenómeno de superficie.<sup>21</sup> Las tres principales características de la estructura de los polifenoles y propiedades son de importancia en la formación de complejos con proteínas son: a) el tamaño del polifenol, b) flexibilidad conformacional y c) solubilidad en agua (baja solubilidad favorece una fuerte asociación).<sup>6, 9, 21, 33</sup>

La eficacia de los polifenoles para enlazar a la proteína deriva del hecho que los polifenoles son ligandos multi-dentados capaces de ligar simultáneamente a más de un punto en la superficie de la proteína. A baja concentración de proteína el polifenol se asocia a más de un sitio sobre la superficie de la proteína, formando una monocapa la cual es menos hidrofílica que la proteína (figura 3 a). Cuando la concentración de proteína es alta la capa de la superficie es relativamente hidrofóbica y es formada por complejos del polifenol sobre la proteína y por entrecruzamiento de diferentes moléculas de la proteína por los polifenoles multi-dentados, lo que conduce a la agregación y precipitación (figura 3 b).<sup>21</sup>

Se requieren de una mayor cantidad de polifenoles para precipitar a las proteínas en una solución diluida que en una solución concentrada. Un fenol puede precipitar proteínas si se mantiene una concentración suficiente para llevar a un equilibrio en favor del complejo fenol-proteína y así formar una capa hidrofóbica de simples moléculas de fenoles sobre la superficie proteína (figura 3 c). Los fenoles pueden competir con los polifenoles por los sitios de formación de complejos sobre la superficie de la proteína.<sup>21</sup>

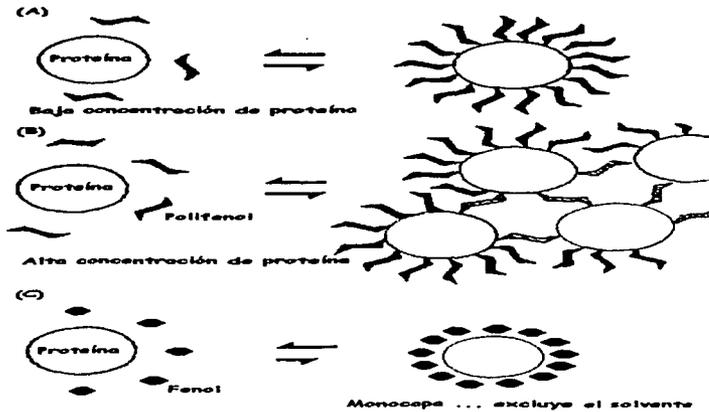


Figura 3. COMPLEJOS Y PRECIPITACIÓN POLIFENOL-PROTEÍNA. a) baja concentración de proteína, b) alta concentración de proteína y c) precipitación, equilibrio fenol-proteína.

Acción biológica.

Anti-mutagénico. Algunas moléculas como el ácido clorogénico, elálgico, quercetina, rutina y ácido tánico disminuyen la formación de ciertos tipos de tumores.<sup>32</sup>

Anti-microbiano. Inhibe la actividad de hongos, bacterias y virus y sirve como defensa natural contra microbios en frutas, sin embargo se va perdiendo con la maduración.

Antioxidante. Origina beneficios a la salud, al recoger los radicales libres y detener los daños de las reacciones.<sup>24, 32</sup>

Actividad antinutricional. Pueden enlazar células epiteliales y causar precipitación.<sup>3, 20, 24, 32</sup> Por penetración a través de la superficie celular puede inducir daño al hígado, daña también la mucosa del tracto gastrointestinal e incrementa la pérdida de proteína y aminoácidos indispensables.<sup>23, 25, 32</sup>

Los taninos condensados son reconocidos como factores antinutricionales en la dieta de los animales monogástricos, porque se ha encontrado que en altas concentraciones

pueden reducir la absorción de las proteínas del intestino delgado,<sup>22</sup> por la formación de complejos tanino-proteína con varias enzimas digestivas como:  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasa, tripsina pancreática, quimotripsina y  $\beta$ -glucosidasa,<sup>2,13,43</sup> excluyendo la formación de productos absorbibles por el intestino delgado.<sup>2,4,12,16,42,46,49</sup>

### Inhibición de enzimas.

Los polifenoles interactúan con las proteínas por formación de fuertes enlaces no-covalentes, a partir del hecho que son ligandos poli-dentados con un múltiple potencial de ligar sitios por los grupos fenólicos y anillos arilo sobre la periferia de la molécula. La asociación de polifenoles con proteínas es ampliamente un fenómeno de superficie y es posiblemente un proceso que tiene lugar en dos distintas fases. La primera es en la que el polifenol busca sitios y regiones sobre la proteína donde numerosos anillos aromáticos son acomodados por el desarrollo de interacciones hidrofóbicas (figura 4 i). La primera etapa es reforzada por enlaces hidrógeno entre los residuos fenólicos y grupos polares en la vecindad del sitio primario de enganche del polifenol a la superficie de la proteína (figura 4 ii).<sup>21</sup>

La formación de complejos es pH dependiente y está muy cercano al punto iso-eléctrico de la proteína.<sup>8, 17, 20, 21, 24</sup> Los complejos pueden ser disociados por adición de solventes hidrofóbicos.<sup>21, 24</sup>

Una característica común de las proteínas y polipéptidos con alta afinidad por los polifenoles del sorgo fue su alto contenido de prolina, debido a la flexible conformación de los polipéptidos y a su capacidad de formar fuertes enlaces hidrógeno con los polifenoles.<sup>21</sup>

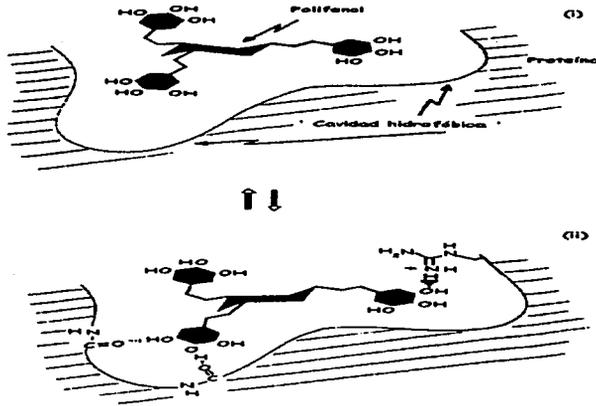


Figura 4. ASOCIACIÓN DE POLIFENOLES CON PROTEÍNAS. i) inserción del polifenol, ii) puentes hidrógeno con la superficie de la proteína.

## DISACARIDASAS INTESTINO DELGADO.

### Hidratos de Carbono.

Las plantas usan hidratos de carbono, generalmente azúcares y almidones, como sustancias de reserva que pueden ser oxidadas por muchos animales (todos los herbívoros y muchos animales omnívoros) para proveerlos de energía en los procesos metabólicos.<sup>35,36</sup>

Los hidratos de carbono están presentes en los alimentos y se encuentran principalmente como almidón, sacarosa y maltosa.<sup>35-36</sup> El almidón es una mezcla de dos polímeros de glucosa, uno es la amilosa con enlaces  $\alpha$ -1, 4 y la amilopectina con enlaces  $\alpha$ -1,4 y ramificaciones  $\alpha$ -1, 6, en proporción 1:3. La sacarosa es el azúcar ordinario, formado por una molécula de glucosa y una de fructuosa unidas por un enlace  $\alpha$ -1, 2. La lactosa el azúcar de la leche esta formado de galactosa y glucosa unidas por un enlace  $\beta$ -1, 4; <sup>37, 38</sup> la cual es una importante fuente de calorías para los infantes <sup>35-39</sup> y también está presente en alimentos derivados de la leche. La estaquiosa y la rafinosa están presentes en leguminosas como los frijoles, los cuales escapan a la absorción en el intestino delgado (porque no se cuenta con las enzimas necesarias para degradarlas) y así pueden servir como sustrato a enzimas de las bacterias del colon causando flatulencia.<sup>39</sup>

### Disacaridasas.

En el borde de las células epiteliales del cepillo del intestino delgado se liberan muchas enzimas como las disacaridasas, peptidasas y proteínas no enzimáticas que funcionan como receptores, así también como proteínas transportadoras de glucosa, aminoácidos, sodio y quizás ácidos grasos. La absorción se realiza fundamentalmente en la porción del intestino delgado del duodeno y del yeyuno.<sup>37</sup>

Las enzimas disacaridasas son sintetizadas en el epitelio del cepillo del borde del intestino de vertebrados. Separados en dos unidades, donde cada una tiene un sitio catalítico y es asegurado al lado citosólico de la membrana por un segmento hidrofóbico de un amino terminal.<sup>37</sup> Cuatro glucosidasas han sido aisladas del borde del cepillo intestinal de mamíferos: Sacarosa-isomaltasa que es un complejo de dos subunidades,

donde cada una hidroliza maltosa y sacarosa y otro que hidroliza isomaltosa (hay 80% de actividad maltasa), maltosa-glucoamilasa (y amilasa) requiere de iones cloruro (20% actividad maltasa). Un complejo  $\beta$ -galactosidasa que es una lactasa-hetero-beta-glicosidasa que tienen toda la actividad de lactasa.<sup>5, 35</sup>

Digestión de los Hidratos de Carbono.

La sacarosa, la lactosa y la maltosa son hidrolizadas por disacaridasas (figura 5) del intestino delgado, sobre la superficie de la membrana en el cepillo del borde, en los enterocitos maduros presentes en las células de las vellosidades y no en las de las criptas.<sup>36, 38</sup> En el hombre la mayor actividad de la maltasa, sacarasa y lactasa están en el yeyuno, es menor en el ileon y en el duodeno. El inicio del duodeno carece de actividad sacarasa, isomaltasa y lactasa. El yeyuno es el sitio de mayor absorción de disacáridos (maltosa, sacarosa y lactosa) en el hombre. La rata muestra el mismo patrón.<sup>36</sup>

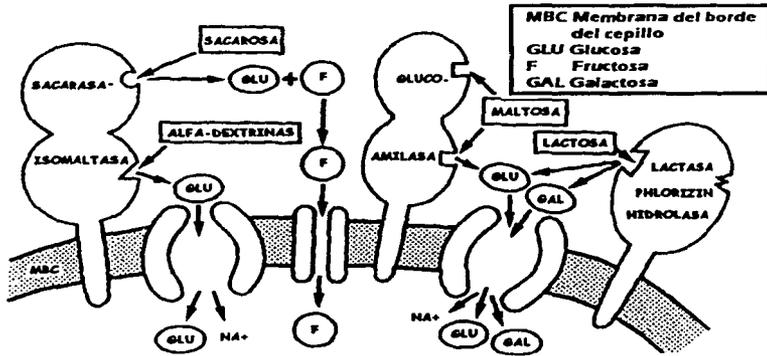


Figura 5. DIGESTIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO EN EL INTESTINO DELGADO.

La asimilación de los hidratos de carbono empieza con la digestión del almidón intraluminalmente con la hidrólisis del almidón a oligómeros apropiados (amilasa,

las células absorptivas de la superficie del intestino delgado. El grado en que el almidón es digerido varía de un alimento a otro; en individuos normales entre el 2 y el 20 % no es completamente digerido.<sup>37, 38</sup> La sacarosa y lactosa junto con la maltosa, maltotriosa y dextrinas son hidrolizadas por glucosidasas presentes en superficie de la membrana del borde del cepillo del intestino delgado, donde la sacarosa y la lactosa se hidrolizan por una sola enzima y los productos de la digestión del almidón (entre ellos la maltosa) son hidrolizados por más de una enzima.<sup>37</sup>

Las actividades de la sacarasa e isomaltasa se encuentran en dos cadenas de péptidos de la proteína sacarosa-isomaltasa, unidas por fuerzas no-covalentes; la cual hidroliza tanto a la sacarosa, como maltosa e isomaltosa (enlaces  $\alpha$ -1, 6).<sup>37, 38</sup> La glucoamilasa hidroliza únicamente los dímeros de maltosa (enlaces  $\alpha$ -1, 4). Los cambios en los niveles de la actividad hidrolítica, tanto de la sacarasa y maltasa pueden ser inducidas por la alimentación.<sup>38</sup> Los mamíferos desarrollan su actividad sacarasa y maltasa en la vida intrauterina, la cual aumenta después del destete.<sup>35, 36, 38, 41</sup>

La actividad de la lactasa reside en una cadena de lactasa-phlorizina hidrolasa la cual contiene un sitio para lactasa independiente del sitio para phlorizina.<sup>37-39</sup> La regulación de las disacaridasas como en el caso de la lactasa es la reducción de su actividad con el desarrollo, en todos los mamíferos.<sup>35-39</sup> En el humano se alcanza su máxima actividad al nacer y va declinando con la infancia hasta los 5 años. Las ratas alcanzan su máxima actividad entre los 2-3 días de nacida manteniéndose hasta los 14 días y su actividad declina drásticamente hacia los 21 días, manteniendo estos niveles en una parte de su edad adulta, hasta dejar de presentar actividad alguna.<sup>38, 39</sup>

Algunos estudios in vitro muestran que la actividad maltasa e invertasa de los homogeneizados de intestino de ratas tienen su pH óptimo en 6.3<sup>5</sup> y para lactasa en 6.0.<sup>5, 40</sup>

Una lista de enfermedades asociadas con la disminución de los niveles de disacaridasas incluye enteritis aguda y subaguda, enfermedad celiaca, colitis ulcerativa, giardiasis, Kwashiorkor entre otras.<sup>36, 41</sup>

### Métodos de Determinación de la Actividad de las Disacaridasas.

Algunas técnicas *in vitro* utilizadas para determinar la actividad de las enzimas maltasa, sacarasa y lactasa se basan en el uso de un pequeño segmento invertido y cerrado del intestino delgado, el cual se llena previamente con una pequeña cantidad de solución de disacárido, después se incuban; posteriormente se determina la cantidad de glucosa que fue absorbida por el intestino. Esta técnica se ve limitada por los volúmenes utilizados y por la pobre oxigenación dentro del segmento del intestino delgado, la cual no se puede suministrar durante el periodo de incubación.

Otras preparaciones *in vitro* incluyen porciones o membranas de las vesículas y la determinación de glucosa por un método indirecto, la cual es sencilla y rápida (en comparación a la mencionadas anteriormente),<sup>42</sup> además las hidrólisis de los disacáridos por enzimas intestinales han mostrado una cinética de orden cero, donde la cantidad de producto hidrolizado formado durante un cierto periodo de tiempo es proporcional a la cantidad de enzima presente.<sup>43</sup> En este último método la glucosa obtenida -producto de la hidrólisis enzimática - es evaluada colorimétricamente por el método enzimático de la glucosa oxidasa-peroxidasa. Una de las ventajas de ésta técnica es que la proteína presente en la muestra no interfieren con la lectura de la glucosa.<sup>40, 43</sup>

Para evitar que está técnica se vea limitada por impurezas se puede hacer uso de soluciones buffer de tris-(hidroximetilaminometano). La adición de buffer Tris al método enzimático de la glucosa-oxidasa-peroxidasa permite el uso de éste técnica de determinación de glucosa con todas las disacaridasas.<sup>43</sup>

### Unidad de Actividad Enzimática.

La presencia de una enzima se demuestra generalmente siguiendo la desaparición del sustrato o la aparición de un producto de la reacción; para ello la enzima es incubada con el sustrato bajo condiciones controladas a intervalos de tiempo apropiados. La actividad enzimática es expresada en términos de unidades (U). Una unidad es la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto bajo condiciones de 37 °C.<sup>44, 45</sup>

$$\text{Unidad de actividad enzimática} = \left[ \frac{\mu\text{g glu} \times \text{factor de dilución}}{60 \text{ min} \times 0.5 \text{ ml} \times \text{unidades de glu} \times 180} \right]^{44,45}$$

Las unidades de actividad enzimática se expresan en U / ml. Las unidades de glucosa para los casos en que el hidrolizado use sacarosa y lactosa será de 1, y de 2 para el caso de maltosa. Los 0.5 ml indican la cantidad de mucosa homogeneizada diluida que se utiliza en el ensayo.

Para calcular la actividad específica de una enzima se debe expresar en términos de U / mg proteína; los cálculos son los siguientes:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Unidad de actividad enzimática (U / ml)}}{\text{Concentración de proteína (mg / ml)}}^{45}$$

Para ello se recomienda que se realice la determinación del contenido de proteína de la muestra (en miligramos).

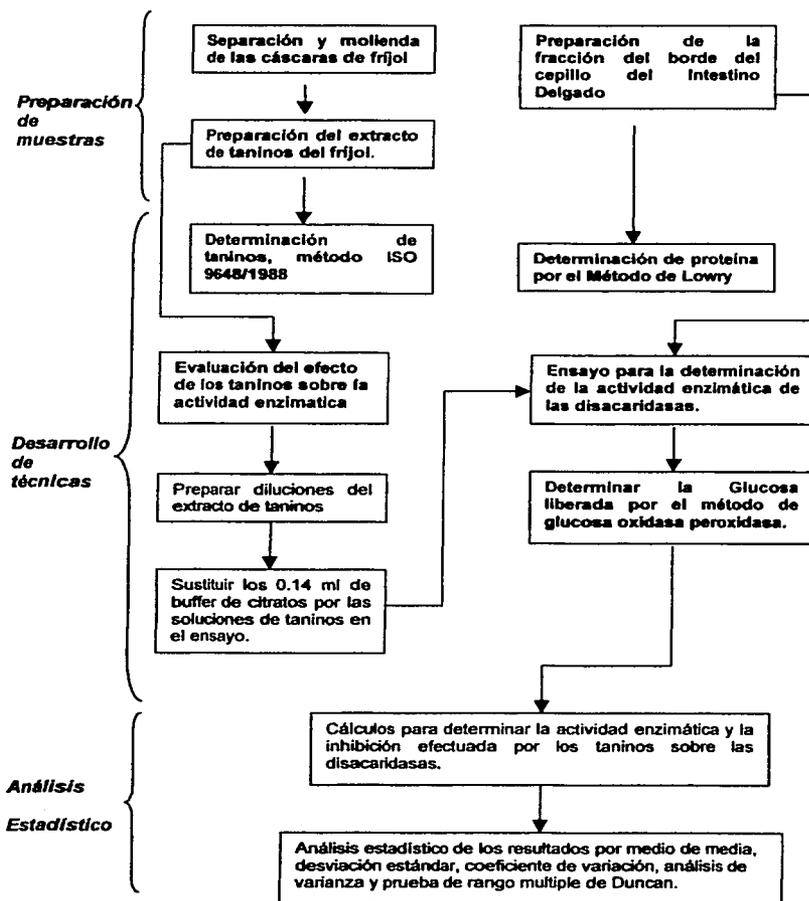


## CAPITULO IV

---

### METODOLOGÍA

A continuación se presenta un esquema que permite visualizar el desarrollo experimental de este trabajo y posteriormente se encontrará el desarrollo de cada una de las técnicas empleadas.



## PREPARACION DE LAS MUESTRAS

### OBTENCION DEL HARINA DE LA CASCARA DEL FRIJOL NEGRO JAMAPA.

El método empleado para la obtención del harina de la cáscara se realiza de acuerdo a lo descrito por Carmona<sup>5</sup> y Desphande.<sup>12</sup>

Se pesan 50 g de frijol negro Jamapa y se coloca en un tamiz y éste a su vez en una autoclave, para que se expongan a la corriente de vapor generada esta última (sin presión) por 1 h; posteriormente se secan a 55° C por 24 h, en estufa de vacío. Se separa la cáscara del frijol manualmente.<sup>5</sup>

Las cáscaras se muelen en molino mecánico Cyclone (Udy Analyzer Company), utilizando una malla para obtener un tamaño de partícula de 0.5 - 0.8 mm, lo cual permita una elevada recuperación de polifenoles.<sup>12</sup>

Nota: Los taninos en la muestra molida se oxidan fácilmente<sup>12</sup>; por ello se recomienda se proceda al análisis lo más pronto posible.

### PREPARACION DEL EXTRACTO DE TANINOS DEL FRIJOL NEGRO JAMAPA.

El extracto de taninos se obtiene de acuerdo a la técnica descrita por Desphande.<sup>12</sup>

Se pesan 0.9 g de la cáscara molida del frijol negro dentro de un tubo de centrifuga, y se adicionan 30 ml de metanol (99.9% de pureza). Tapar y agitar por  $20 \pm 1$  minutos en parrilla de agitación a 500 r.p.m. con un agitador magnético. Posteriormente se centrifuga por 10 minutos a 3000 r.p.m. Separar el sobrenadante.

El sobrenadante obtenido se lleva a sequedad en un rotavapor a 65 °C. La muestra se reconstituye en 5 ml de agua desionizada y se centrifuga a 2000 r.p.m por 10 minutos, para remover el material insoluble. El sobrenadante reconstituido se afora a 5 ml con el agua desionizada.

Hacer una dilución 1 : 5 de este extracto (en agua desionizada), para determinar el contenido de taninos por el método ISO 9648-1988.

#### HOMOGENEIZADOS DE LA FRACCIÓN DEL BORDE DEL CEPILLO DEL INTESTINO DELGADO DE RATAS.

La obtención de los extractos del intestino delgado de las ratas se basa en la técnica empleada por Carmona.<sup>5</sup>

Se usan ratas Wistar hembras, lactantes de 15 días ( $30 \pm 3$  g), recién destetadas de 21 días ( $40 \pm 4$  g) y jóvenes de 60 días ( $200 \pm 20$  g), manteniéndose en el bioterio en jaulas individuales, con ciclos de luz/obscuridad 12 h/12h y se alimentaron con una dieta comercial Purina y agua *ad libitum*. Las ratas recién destetadas y jóvenes se dejan en ayuno por 12 h y las lactantes 4 horas, antes de sacrificarlas.

Se sacrifican las ratas por dislocación de la cabeza y se extrae inmediatamente el intestino delgado, se lava con solución fría de cloruro de sodio (NaCl) 0.15 M; se abre el intestino e inmediatamente se raspa la mucosa de todo el intestino delgado con un portaobjetos y se adiciona solución de NaCl 0.15 M en una proporción de 4 volúmenes ( $V/m$ ) respecto al peso de la mucosa del intestino delgado raspada.

En un homogeneizador con pistilo de vidrio se deposita la mucosa y se homogeneiza manualmente (5 minutos). Se guarda en un congelador a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  por 24 h. En este caso el homogeneizado se descongela y homogeneiza nuevamente (2 minutos). Se guardan las muestras en alícuotas de 1 ml a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Nota: Mientras se trabaja la mucosa esta se debe mantener en baño de hielo.

## DESARROLLO DE TÉCNICAS

### DETERMINACION DEL CONTENIDO DE TANINOS.

El método ISO 9648-1988 <sup>46</sup> fue empleado para la determinación de taninos totales en los extractos metanólicos de la cáscara del frijol negro Jamapa.

#### 1. PRINCIPIO

Este método se basa en la extracción de taninos por agitación de una muestra problema con dimetilformamida (DMF) Después de centrifugar la muestra, se toma una alícuota del sobrenadante y se le adicionan citrato férrico amoniacal y solución de hidróxido de amonio. Para determinar el contenido de taninos se prepara una curva de calibración usando ácido tánico (como estándar de referencia). Tanto la curva como las muestras problemas se leen en el espectrofotómetro a 525 nm.

**Nota:** Para las pruebas realizadas a la cáscara y cotiledón del frijol, se utiliza la técnica descrita tal cual indica la ISO 9648-1988; sin embargo se realiza una modificación en el proceso de extracción a esta técnica puesto que se usa un extracto de taninos para el ensayo enzimático de inhibición que proviene de la agitación con metanol 99.9%.

#### 2. REACTIVOS

□ Solución estándar de ácido tánico (2 g/L). Sigma T-0125  
Pesar 2 g de ácido tánico y llevar a 1000 ml con agua en un matraz aforado. Proteger de la luz. La solución sólo se puede almacenar por una semana.

- Solución de hidróxido de amonio ( 8 g/ L  $\text{NH}_3$ ).

De un reactivo de hidróxido de amonio con 28-30% de  $\text{NH}_3$  y una densidad de 0.896 g/L, se deben tomar 3.1 ml de hidróxido de amonio y llevar a 100 ml con agua.

- Solución de dimetilformamida (DMF) (75%  $v/v$ ).

Colocar 75 ml de DMF en un matraz aforado de 100 ml. Diluir con agua; permitir que la solución llegue a temperatura ambiente y después llevar al aforo.

- Solución de citrato férrico amoniacal (3.5g/L).

Pesar 3.5 g de citrato férrico amoniacal y llevar a 1000 ml con agua. El reactivo debe tener entre 17 % y 20% de hierro ( $m/m$ ). Se debe preparar 24 h antes de su uso.

Nota: Todos los reactivos deberán ser grado analítico. El agua deberá ser destilada.

### 3. EQUIPO

- Agitador mecánico Multi-stir plate 4 (Modelo SP-13025), con agitador magnético.
- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Centrifuga Sorvall (Modelo Super T 21).
- Espectrofotómetro Sequoia-Turner (Modelo 340), con celdas de 1 cm.
- Estufa de vacío Duo-Vax Oven (Modelo 3620).
- Malla, con tamaño de partícula de 0.8 mm.
- Molino Cyclone (Modelo CSM 564026).
- Pipetas automáticas (1-5 ml y 1- 10 ml).
- Vortex.

#### 4. DETERMINACION DE TANINOS EN EL EXTRACTO METANOLICO OBTENIDO DEL FRIJOL NEGRO JAMAPA.

A continuación se muestran las modificaciones realizadas a la técnica ISO 9648-1988, para la determinación de taninos en solución acuosa proveniente del extracto metanólico (ver preparación de muestras).

*Blanco de la muestra.* Tomar 1 ml del extracto de taninos del frijol negro Jamapa diluido 1:5 con una pipeta automática y colocarlo en un tubo de ensaye. Agregar 5 ml de agua, 1ml de solución de DMF y 1 ml de solución de hidróxido de amonio, agitar por unos segundos en el vortex.

*Muestra.* Tomar 1 ml de la muestra diluida 1:5 (se hizo una modificación de la técnica original, ya que la muestra proviene de un extracto metanólico y no del extracto con DMF) con pipeta automática y colocarlo en un tubo de ensaye. Agregar 4 ml de agua, 1 ml de solución de DMF y 1 ml de la solución de citrato férrico amoniacal, agitar por unos segundos, haciendo uso del vortex; posteriormente adicionar 1 ml de solución de hidróxido de amonio y agitar nuevamente unos segundos haciendo uso del vortex. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente por 10 minutos.

Medir la absorbancia del blanco de la muestra y de las muestras a 525 nm. El resultado es la diferencia entre la absorbancia de la muestra y la absorbancia del blanco de la muestra. Para conocer el contenido de taninos en la muestra se hace uso de una curva patrón usando ácido tánico (como estándar de referencia).

Nota: Se realizará un blanco de cada muestra y las determinaciones en la muestra serán por triplicado.

#### 5. PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION (CON ACIDO TANICO).

Se preparan 8 matraces volumétricos de 25 ml y se usaran pipetas graduadas para adicionar respectivamente 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, ml de la solución de ácido tánico (2 mg/ml), y se llevará hasta la marca de aforo con DMF. La escala de concentración así obtenida le

corresponden los contenidos de ácido tánico de 0, 80, 160, 240, 320, 400, 480, 560 µg /ml respectivamente.

De cada uno de los matraces tomar 1 ml de solución e introducirlos en un tubo de ensaye. Añadir 5 ml de agua y 1 ml de citrato férrico amoniacal a cada tubo; agitar por unos segundos haciendo uso de un vortex. Añadir 1 ml de solución de hidróxido de amonio a cada tubo, agitar nuevamente con el vortex por unos segundos. Dejar reposar los tubos a temperatura ambiente por 10 minutos.

Leer las absorbancias a una longitud de onda de 525 nm. Trazar una gráfica de absorbancia contra concentración de ácido tánico (expresado como µg de ácido tánico).

**Nota:** La curva puede no pasar por el origen, sin embargo no deberá de ser corregida por el cero de la escala.

## 7. CALCULOS.

A la absorbancia obtenida de la muestra se le resta la absorbancia de su blanco.

La concentración de la muestra, se lee a partir de la curva patrón hecha con ácido tánico y los resultados se expresan en microgramos de equivalentes de ácido tánico por mililitro

La concentración obtenida de la muestra se multiplica por el factor de dilución. El resultado se convierte de microgramos a miligramos.

**DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY.**

Para la determinación de la proteína presente en las muestras de intestino delgado se basó en la técnica de Lowry.<sup>47</sup>

**1. PRINCIPIO.**

Este método combina el uso de la reacción de biuret, donde las proteínas reaccionan con los iones cobre en medio alcalino, con la reducción del reactivo fenol Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdico-fosfotungstico) por la tirosina y el triptofano. Para determinar el contenido de proteína se prepara una curva de calibración usando albumina sérica bovina (como estándar de referencia). Tanto la curva como las muestras problemas se leen en el espectrofotómetro a 750 nm.

**2. REACTIVOS.**

- Solución de hidróxido de sodio (0.8mol / L).

Disolver 32 g de hidróxido de sodio (NaOH) en agua y llevar a 1000 ml.

- Reactivo A.

Disolver 0.2 g de tartrato disódico dihidratado ( $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) y 10 g de carbonato de sodio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en 69 ml de solución de hidróxido de sodio (0.8 mol / L) y llevar a 100 ml con agua.

- Reactivo B.

Disolver 2 g de tartrato disódico ( $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) y 1 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) en 12.5 ml de solución de hidróxido de sodio (0.8mol/L), llevar a 100 ml con agua. Almacenar protegido de la luz.

□ **Reactivo Mezcla.**

Mezclar 25 volúmenes de solución de hidróxido de sodio (0.8 mol / L), 18 volúmenes de reactivo A y 2 volúmenes de reactivo B. Preparar inmediatamente antes de su uso.

□ **Reactivo C.**

Diluir 1 volumen de reactivo Folin-Ciocalteu comercial con 2 volúmenes de agua. Esta mezcla deberá prepararse diariamente inmediatamente antes de su uso.

□ **Solución estándar de Albúmina Sérica Bovina. Sigma A-3425.**

Disolver albúmina sérica bovina con agua y llevar a una concentración de 1 mg/ml. Para alcanzar esta concentración se pesó 0.0108 g de albúmina sérica bovina y se lleva a 10 ml con agua destilada.

A partir de esta solución se prepara la curva patrón.

□ **Solución salina (0.15 M).**

Disolver 8.766 g de cloruro de sodio en agua y llevar a 1000 ml.

**Nota:** Todos los reactivos deberán ser grado analítico. El agua deberá ser destilada.

### 3. EQUIPO.

- Balanza analítica.
- Centrifuga Sorvall (Modelo Super T 21).
- Espectrofotómetro Sequoia Turner (Modelo 340), con celdas de 1 cm.
- Homogeneizador con pistilo de vidrio Pyrex con capacidad de 40 ml.
- Pipetas automáticas (100-1000  $\mu$ L, 1-5 ml y 1- 10 ml).

#### 4. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE PROTEINA EN LOS HOMOGENEIZADOS DE LA MUCOSA DEL INTESTINO DELGADO DE RATAS.

A 1.2 ml de homogeneizado diluido (nota 2); adicionar 0.9 ml de reactivo mezcla y agitar en vortex, adicionar 0.6 ml de reactivo C y agitar inmediatamente, adicionar nuevamente 0.6 ml de reactivo C y mezclar vigorosamente; incubar por 45 minutos protegiéndolos de la luz.

Leer las absorbancias de las muestras problema en un espectrofotómetro a 750 nm. Se debe ajustar el espectrofotómetro con el blanco de reactivos de la curva patrón.

Para conocer el contenido de proteína en la muestra se hace uso de una curva patrón usando albúmina sérica bovina.

Nota 1: Las determinaciones se harán por triplicado, para cada muestra problema.

Nota 2: Para la determinación de proteína por este método se proceden a hacer diluciones del homogeneizado concentrado, donde se busca que las soluciones tengan un contenido de 0.01 a 0.1 mg / ml de proteína. En este estudio se usaron diluciones de 1:400

#### 5. PREPARACION DE LA CURVA PATRON DE ALBUMINA.

Preparar soluciones con concentraciones de 0, 5, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}$  / ml, a partir de la solución de albúmina sérica bovina (1mg/ml).

A 1.2 ml de cada solución estándar; añadir 0.9 ml de reactivo mezcla y agitar en vortex, adicionar 0.6 ml de reactivo C y agitar inmediatamente, adicionar nuevamente 0.6 ml de reactivo C y mezclar vigorosamente; incubar por 45 minutos protegiéndolos de la luz.

Leer las absorbancias a 750 nm, usando el espectrofotómetro contra blanco de reactivos.

Trazar gráfica de absorbancia contra concentración de albúmina sérica bovina (expresado como  $\mu\text{g}$  de albúmina sérica bovina).

6. CÁLCULOS.

La concentración de proteína de la muestra se lee a partir de la curva de calibración y los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  proteína/ ml.

Este resultado se multiplica por el factor de dilución. El resultado se convierte de microgramos a miligramos.

## DETERMINACION DE GLUCOSA POR EL METODO DE GLUCOSA OXIDASA PEROXIDASA.

Esta determinación colorimétrica utilizó la técnica de Trinder<sup>53</sup> con modificaciones de Dahlqvist<sup>43</sup> y Bergmeyer.<sup>45</sup>

### 1. PRINCIPIO.



Para determinar la concentración de glucosa liberada en el ensayo enzimático, la glucosa es oxidada por la glucosa oxidasa (GOD) en solución acuosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona en presencia de la peroxidasa (POD) con el fenol y la 4-aminofenazona, para formar un cromógeno rojo.

La intensidad del color que se desarrolla es proporcional a la concentración de glucosa y puede ser medida en el espectrofotómetro a 520 nm.

### 2. REACTIVOS

- Reactivo "A" de glucosa oxidasa peroxidasa (Hycel No. 70408), para maltasa y lactasa.

Disolver el contenido del frasco con agua destilada, aforar a 500 ml.

- Buffer Tris (0.5 mol / L, pH = 7.0).

Disolver 61 g Tris en 85 ml de ácido clorhídrico, 5 mol/L, y diluir con agua a 1000 ml; si es necesario ajustar el pH a 7.0

□ Reactivo "B" de glucosa oxidasa peroxidasa (Hycel No. 70408), para sacarasa.  
Disolver el contenido del frasco en 50 ml de agua a temperatura ambiente, aforar a 500 ml con buffer Tris pH 7.0.

□ Solución estándar de glucosa (10 mg/ml). J.T. Baker, No. 50-99-7  
Disolver 100 mg de glucosa anhidra en agua y llevar a 10 ml.

**Nota:** Todos los reactivos deberán ser grado analítico. El agua para la preparación de los reactivos debe ser destilada.

### 3. EQUIPO.

- Baño de agua WWR Brand Inmersion Circulators (Modelo 1112).
- Centrifuga Sorvall (Modelo Super T 21).
- Espectrofotómetro Sequoia Turner (Modelo 340), con celdas de 1 cm.
- Pipetas automáticas (50-200  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L, 2-10 ml)
- Vortex

### 4. DETERMINACION DE LA GLUCOSA LIBERADA EN LOS HIDROLIZADOS DEL ENSAYO ENZIMATICO DE LAS DISACARIDASAS.

#### ENZIMAS: MALTASA Y LACTASA.

En un tubo de ensayo adicionar 0.2 ml del hidrolizado obtenido en el ensayo enzimático de las disacaridasas (el cual se explica en páginas posteriores) y agregar 2.5 ml de reactivo A de glucosa-oxidasa-peroxidasa (el cual debe estar a temperatura de 37°C), mezclar por agitación en un vortex e incubar a 37°C por 10 min. Dejar reposar 20 min. y leer en el espectrofotómetro a 520 nm contra blanco de reactivos.

**ENZIMA: SACARASA**

En un tubo de ensaye adicionar 0.5 ml del hidrolizado y agregar 2.5 ml de reactivo B de glucosa-oxidasa-peroxidasa (a temperatura de 37°C), mezclar por agitación en un vortex e incubar a 37°C por 10 min. Dejar reposar 20 min. y leer en el espectrofotómetro a 520 nm contra blanco de reactivo.

**5. CURVA PATRÓN DE GLUCOSA.****PARA DETERMINAR LA GLUCOSA LIBERADO EN LA HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA MALTOSA Y LACTOSA**

A partir de una solución estándar de glucosa concentrada (10 mg/ml) realizar una dilución 1:10 para tener una solución de glucosa de 1mg/ml y tomar alícuotas de 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 ml y llevar a 1 ml con agua desionizada.

Para la determinación de glucosa se toman 0.2 ml de las diluciones anteriores, las cuales tendrán concentraciones de 100, 80, 60, 40 y 20 µg, respectivamente, a las que posteriormente se les agregan 2.5 ml de reactivo de glucosa-oxidasa-peroxidasa (previamente llevado a 37°C), mezclar e incubar a 37°C por 10 min. Dejar reposar 20 min. y leer en el espectrofotómetro a 520nm.

El blanco de la curva (de reactivos) se obtiene al adicionar 0.2 ml de agua desionizada y 2.5 ml de reactivo de glucosa-oxidasa-peroxidasa. El cual se mezcla e incuba a 37°C por 10 min. y se lee a 520 nm.

El espectrofotómetro se debe de ajustar con el blanco de reactivos de la curva patrón.

**PARA DETERMINAR LA GLUCOSA LIBERADA EN LA HIDROLISIS ENZIMATICA DE LA SACAROSA**

A partir de una solución estándar de glucosa concentrada (10 mg/ml) realizar una dilución 1:10 para tener una solución de glucosa de 1mg/ml y tomar alícuotas de 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1 ml y llevar a 1 ml con agua desionizada.

Para la determinación de glucosa se toman 0.2 ml de las diluciones anteriores, las cuales tendrán concentraciones de 100, 80, 60, 40 y 20  $\mu\text{g}$ , respectivamente, y adicionarles 0.3 ml de buffer Tris (para contrarrestar la dilución efectuada por el buffer Tris, al detener la reacción en el ensayo para determinar la actividad enzimática) y posteriormente agregar 2.5 ml de reactivo de glucosa-oxidasa-peroxidasa (previamente llevado a 37°C), mezclar e incubar a 37°C por 10 min. Dejar reposar 20 min. y leer en el espectrofotómetro a 520nm. El blanco de la curva (de reactivos) se obtiene al adicionar 0.2 ml de agua desionizada con 0.3 ml de buffer Tris pH 7.0 y 2.5 ml de reactivo de glucosa-oxidasa-peroxidasa. Se mezcla e incuba a 37°C por 10 min. Posteriormente se lee a 520 nm.

El espectrofotómetro se debe de ajustar con el blanco de reactivos de la curva patrón.

## 6. CÁLCULOS

Las curvas patrón de glucosa se elaboran con al menos 4 estándares de glucosa de concentraciones entre los 0-100  $\mu\text{g}$  de glucosa y se leen en un espectrofotómetro a 520 nm. Se elabora una gráfica de concentración contra absorbancia.

La concentración de glucosa en microgramos por mililitro de la solución evaluada (muestra menos el blanco), se lee a partir de la curva de calibración.

Este resultado se multiplica por el factor de dilución. El resultado se convierte de microgramos a miligramos.

## ENSAYO ENZIMÁTICO EN LAS DISACARIDASAS Y EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS TANINOS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

El ensayo para determinar la actividad enzimática de las disacaridasas y el efecto inhibitorio de los taninos, utilizan las técnicas empleadas por Carmona.<sup>5</sup>

### 1. PRINCIPIO.



Este método se basa en la incubación de un disacárido (maltosa, sacarosa, lactosa), con la disacaridasa apropiada, seguida de un ensayo de liberación de glucosa en condiciones adecuadas de temperatura y tiempo.

La glucosa liberada en el ensayo enzimático se determina por el método de glucosa oxidasa peroxidasa.

### 2. REACTIVOS.

- Buffer de citratos pH= 6.0, (0.1 M)<sup>52</sup>.

Disolver 0.265 g de ácido cítrico monohidratado y 2.9282 g de citrato de sodio dehidratado en agua y llevar a 100 ml. Ajustar a pH 6. Guardar en refrigeración, protegido de la luz.

- Buffer de citratos pH = 6.3, (0.1 M)<sup>52</sup>.

Disolver 0.1583 g de ácido cítrico monohidratado y 3.0984 g de citrato de sodio dehidratado en agua y llevar a 100 ml. Ajustar a pH 6.3. Guardar en refrigeración, protegido de la luz.

- Solución de maltosa (50 mg / ml).Sigma M-5885.

Disolver 0.5263 g de maltosa monohidratada en buffer de citratos pH 6.3 y llevar a 10 ml con buffer pH 6.3. Guardar en refrigeración.

- Solución de sacarosa (50 mg / ml). Sigma S-7903.

Disolver 0.5 g de sacarosa anhidra en buffer de citratos pH 6.3 y llevar a 10 ml. Guardar en refrigeración.

- Solución de lactosa (50 mg / ml). Sigma L-3625.

Disolver 0.5263 g de lactosa monohidratada en buffer de citratos pH 6.0 y llevar a 10 ml. Guardar en refrigeración.

- Ácido clorhídrico (5 mol / L)

Tomar 41.5 ml de ácido clorhídrico (PM. 36.46 g/mol, 37 % ácido clorhídrico y densidad 1.187 g/ml) y llevar a 100 ml.

- Buffer Tris (0.5 mol / L, pH = 7.0).

Disolver 61 g Tris en 85 ml de ácido clorhídrico, 5 mol/L, y diluir con agua a 1000 ml; si es necesario ajustar el pH a 7.0

- Solución salina (0.15 M).

Disolver 8.766 g de cloruro de sodio en agua y llevar a 1000 ml.

- Solución de taninos del frijol negro Jamapa (1 mg/ml).

Del extracto de taninos obtenido anteriormente (ver preparación muestras), realizar la dilución respectiva para obtener esta concentración de 1 mg /ml, expresado como equivalentes de ácido tánico (E.A.T.).

**Nota:** Todos los reactivos deberán ser grado analítico. El agua para la preparación de los reactivos debe ser destilada.

### 3. EQUIPO.

- Baño de agua, VWR Brand Inmersion Circulators (Modelo 1112).
- Centrifuga Sorvall (Modelo Super T 21).
- Espectrofotómetro Sequoia Turner (Modelo 340), con celdas de 1 cm.
- Homogeneizador con pistilo de vidrio, Pyrex con capacidad de 40 ml.

- Pipetas automáticas (50-200  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L, 2-10 ml)
- Vortex

#### 4. PREPARACION DE LOS HIDROLIZADOS DE LAS DISACARIDASAS.

##### MALTASA

En un tubo de ensaye se prepara la mezcla de ensayo en la que se adicionan: 0.5 ml de la fracción del borde del cepillo diluida— usado como fuente de enzima -, 0.36 ml de solución de maltosa (50 mg/ml) y 0.14 ml de buffer de citratos 0.1 M a pH 6.3. La reacción empieza con la adición de la solución de maltosa. La mezcla se incubada a 37°C por 60 min. La reacción se interrumpe al colocar los tubos de las muestras por 4 minutos en un baño de agua hirviendo ( $92 \pm 1$  °C).

El blanco de la muestra se obtiene al adicionar el sustrato y meter inmediatamente el tubo al baño de agua hirviendo, dejarlo durante 4 min. Esto tiene como propósito corregir las lecturas al determinar la cantidad de glucosa libre presente en la fracción del borde del cepillo del intestino delgado y del sustrato.

Para determinar la concentración de glucosa liberada en la muestra se hace uso del método de glucosa Oxidasa Peroxidasa (explicado anteriormente).

Nota : Las diluciones respectivas son: 1:70 en ratas lactantes, 1:100 para ratas recién destetadas y 1:150 para ratas jóvenes.

##### SACARASA

En un tubo de ensaye adicionar 0.5 ml de la fracción diluida del borde del cepillo – como fuente de enzima -, 0.36 ml de solución sustrato de sacarosa (50mg/ml) y 0.14 ml de buffer de citratos pH 6.3. La reacción empieza con la adición de la solución de

sacarosa, la mezcla de reacción se incuba a 37°C por 60 min. La reacción se detiene al adicionar 1.5 ml de buffer Tris pH 7.0 a las muestras (nota 2).

El blanco de la muestra se obtiene al adicionar al tubo los 1.5 ml de buffer Tris pH 7.0, inmediatamente después de adicionar el sustrato. Para corregir las lecturas al determinar la cantidad de glucosa libre presente en la fracción del borde del cepillo del intestino delgado y del sustrato.

Para determinar la concentración de glucosa liberada en la muestra se hace uso del método de glucosa oxidasa peroxidasa (descrito anteriormente).

Nota 1: Las diluciones son: 1:5 en ratas lactantes, 1:10 para las ratas recién destetadas y 1:15 para las ratas jóvenes.

Nota 2: El usar el buffer Tris pH 7.0 tiene la doble función de interrumpir la actividad de la disacaridasa al final del periodo de incubación e inhibir la actividad de disacaridasas contaminantes propias del reactivo que puedan limitar su uso con todas las disacaridasas.

## LACTASA

En un tubo de ensayo adicionar 0.5 ml de la fracción del borde del cepillo diluida, como fuente de enzima, 0.36 ml de solución sustrato de lactosa (50 mg/ml) y 0.14 ml de buffer de citratos pH. 6.0. La reacción empieza con la adición de la solución de lactosa y la mezcla de ensayo se incuba a 37°C por 60 minutos. La reacción se interrumpe al colocar los tubos de las muestras en agua hirviendo ( $92 \pm 1$  °C) durante 4 min.

El blanco de la muestra se obtiene al adicionar el sustrato y meter inmediatamente el tubo al agua hirviendo y dejarlo por un tiempo de 4 min. Con la finalidad de corregir las lecturas al determinar la cantidad de glucosa libre presente en la fracción del borde del cepillo del intestino delgado y del sustrato.

Para determinar la concentración de glucosa liberada en la muestra se hace uso del método de glucosa oxidasa peroxidasa (ver determinación de glucosa).

**Nota:** Las diluciones en estos ensayos fueron: ratas lactantes 1:20, ratas recién destetadas de 1:3 y en ratas jóvenes de 1:5.

## 5. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS TANINOS DEL FRIJOL NEGRO JAMAPA

Tomar 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 ml del extracto de taninos (1 mg/ml) y llevar a 1.4 ml con agua desionizada o buffer de citratos al pH respectivo, para tener concentraciones de 100, 80, 60, 40, 20 y 10 µg/0.14 ml. En esta determinación se sustituyen los 0.14 ml de buffer de citratos por los 0.14 ml de la respectiva solución de taninos en solución acuosa.

El experimento se sigue conforme se indica en la preparación de hidrolizados de la mezcla de ensayo.

Se corrigen las lecturas al determinar la cantidad de glucosa libre presente en la fracción del borde del cepillo del intestino delgado, así como, del sustrato y de la solución de taninos.

**Nota:** Tanto el blanco de reactivos (corrección por glucosa en fracción del borde del cepillo del intestino delgado y del sustrato), como el blanco de la muestra (ensayo libre de taninos) llevan los 0.14 ml de buffer de citratos al pH correspondiente.

## 6. CALCULOS ACTIVIDAD ENZIMATICA.

La cantidad de glucosa liberada (muestra menos el blanco) es medida a partir de la curva estándar.

La actividad enzimática se expresa frecuentemente en términos de unidades (U). Donde una unidad de actividad disacaridasa es la conversión de un micromol de disacarido por minuto a 37 °C.

$$\text{Unidad de actividad enzimatica} = \left[ \frac{\mu\text{g glu} \times \text{factor de dilución}}{60 \text{ min} \times 0.5 \text{ ml} \times \text{unidades de glu} \times 180} \right]$$

Las unidades de actividad enzimática se expresan en U / ml. Las unidades de glucosa será de 1 para los casos en que el hidrolizado use sacarosa y lactosa y de 2 para el caso de maltosa. Los 0.5 ml indican la cantidad de mucosa homogeneizada diluida que se utiliza en el ensayo.

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Unidades de actividad enzimática (U / ml)}}{\text{Concentración de proteína (mg / ml)}}$$

Para calcular la actividad específica de una enzima se expresa en términos de U / mg de proteína.

#### 7. CALCULOS DEL EFECTO DE LOS TANINOS SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA (% INHIBICIÓN).

La cantidad de glucosa formada (muestra menos el blanco y en su caso menos la absorbancia de la solución de taninos) es medida a partir de la curva estándar.

Para calcular el porcentaje de inhibición se hace uso de la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición enzimática} = \left[ \frac{100 - (\text{Actividad específica del ensayo con Taninos} \times 100)}{\text{Actividad específica del ensayo libre de Taninos}} \right]$$

Se debe determinar el % de inhibición enzimático para cada uno de los ensayos en que se adicionó una solución con equivalentes de ácido tánico (10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg E.A.T)

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los análisis estadísticos aplicados a los resultados obtenidos en este trabajo fueron los siguientes: media, desviación estándar, coeficiente de variación, análisis de varianza para clasificación de una vía y prueba de rango múltiple de Duncan; haciendo uso del programa estadístico Statgraphics versión 5.0.<sup>51</sup>



# CAPITULO V

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

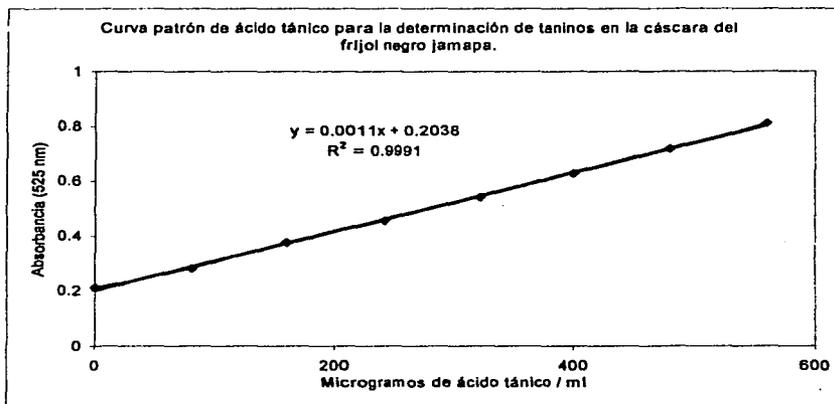
### DETERMINACIONES EN LAS MUESTRAS DE FRIJOL.

Se encontró que la porción de la cáscara del frijol representa un 9-11 % y el restante porcentaje del peso total de la semilla es del cotiledón.

### DETERMINACION DEL CONTENIDO DE TANINOS

#### Curva Patrón.

Para evaluar el contenido de taninos por medio de la técnica ISO-9648-1988, se preparó una curva patrón con soluciones estándares de ácido tánico con concentraciones de 0 a 560  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (gráfica 1) presentando una respuesta lineal entre estos límites de detección. Por medio de esta técnica los resultados de los extracto problema se expresan como equivalentes de ácido tánico.



Gráfica 1. Para determinar el contenido de taninos en el extracto metanólico se usan soluciones estándar con concentraciones de 0, 80, 160, 240, 320, 400, 480, 560  $\mu\text{g}$  de ácido tánico, en las condiciones de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente.

**Determinación en las muestras.**

Con esta técnica se determinó el contenido de taninos totales tanto de la cáscara como del cotiledón, ya que en el frijol no sólo se encuentran taninos condensados, sino también taninos hidrolizables.

En la tabla 1, se presentan los resultados del contenido de taninos tanto de la cáscara como del cotiledón y se observa que los taninos se concentran en el extracto de la cáscara de los frijoles. Así también al evaluar los taninos del extracto del cotiledón la concentración no fue cuantificable debido a que presentó una absorbancia menor a la del blanco de la curva estándar; lo cual indica que los compuestos polifenólicos están estrechamente ligados a la pigmentación de la cáscara del frijol en estudio.

Tabla 1. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE TANINOS TOTALES EN LAS  
FRACCIONES DE FRIJOL NEGRO JAMAPA.

Fracción frijol negro Jamapa	Contenido de taninos totales (g E.A.T.* / 100 g muestra)	Desviación estándar
Cáscara	1.64 <sup>1</sup>	0.01966
Cotiledón	N.C. <sup>2</sup>	---

Se hizo en dos extractos por triplicado, en las condiciones de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. Los resultados están expresados como equivalentes de ácido tánico.\*

<sup>1</sup> % C. V. < 1.2

<sup>2</sup> No cuantificable

Se considera que la técnica ISO para determinar el contenido de taninos totales es muy precisa ya que el coeficiente de variación entre las muestras es muy bajo.

Para evitar errores al cuantificar el contenido de taninos totales en las muestras, es necesario hacer una nueva curva patrón de ácido tánico cada que se haga una determinación a las muestras de la cáscara del frijol; además, es necesario cuidar muy de cerca la vida útil de los reactivos para no alterar los resultados de las muestras. Cabe señalar que es muy importante cuidar las muestras al realizar la agitación, ya que podría

ser otra variable que afecte esta determinación, por una deficiente extracción de los taninos.

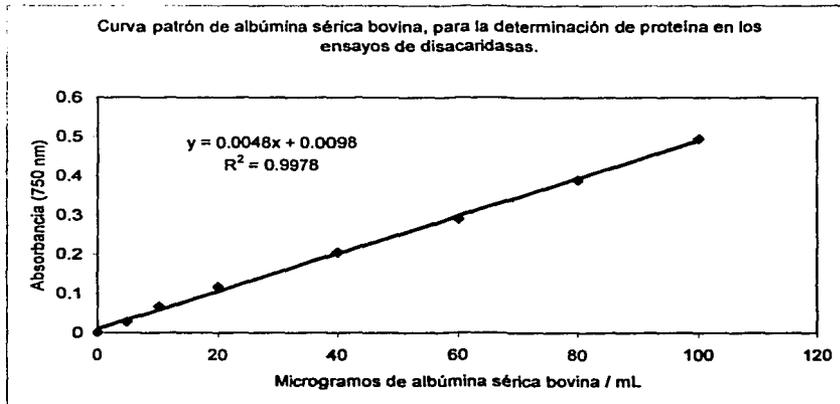
Al realizar las determinaciones de la actividad de las disacaridasas se encontró el problema de que la DMF es un solvente muy tóxico y al quedar posibles residuos afectaría el ensayo con las disacaridasas; por lo que se procedió a evaluar la posibilidad de usar un disolvente diferente. Para este fin se usaron extractos con: a) Metanol acidificado con 1% de HCl, con el cual se logra una mayor recuperación de taninos totales sin embargo no se reconstituye completamente en el agua desionizada; b) El metanol absoluto, donde si se logra una reconstitución completa en el agua desionizada, aun cuando se tiene una menor recuperación de taninos totales. En la bibliografía se reporta que el metanol acidificado con 1% de HCl también arrastra otros compuestos no fenólicos a diferencia del metanol absoluto,<sup>12</sup> el cual es usado como solvente de extracción en métodos para la evaluación de taninos como el de vainillina. Los resultados anteriores, muestran que la mejor opción como disolvente después de la DMF, es el metanol absoluto, aunque la recuperación es menor.

Conforme a lo anterior, se buscó obtener un extracto como se indica en la metodología, por lo cual el extracto metanólico (b) se destila a sequedad en un rotavapor (con vacío) en baño de agua a una temperatura de 60 °C y posteriormente se reconstituyeron en 5 ml de agua desionizada con una concentración de taninos totales  $\geq 1$  mg de E.A.T. / ml de la cáscara del frijol negro, la cual se uso posteriormente en el ensayo de evaluación del efecto de los taninos sobre la actividad de las disacaridasas.

## DETERMINACION DE PROTEÍNA

### Curva Patrón.

Al evaluar la proteína presente en el extracto de la mucosa intestinal haciendo uso del método de Lowry, se encontró que la curva patrón realizada en esta técnica permite obtener datos lineales dentro del rango de 0 y 100  $\mu\text{g}$  de albúmina sérica bovina (Gráfica 2).



Gráfica 2. Para cuantificar la proteína presente en los homogeneizados del intestino delgado se usaron soluciones estándar de albúmina sérica bovina con concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}$  en las condiciones de 45 minutos de incubación a temperatura ambiente protegidas de la luz.

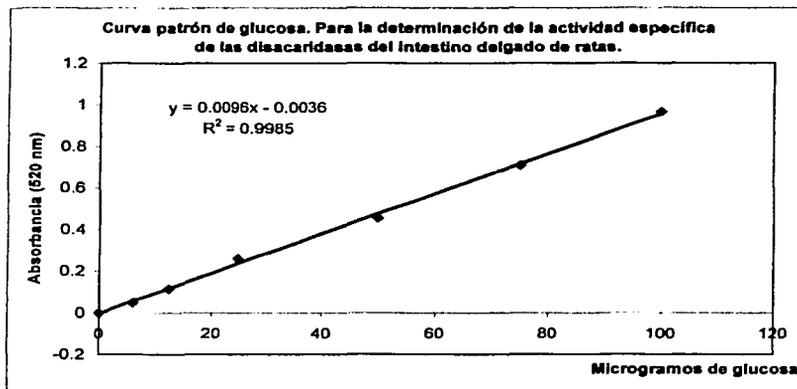
### Determinación en las muestras.

Las determinaciones por sextuplicado (sobre un mismo extracto) del contenido de proteína en los homogeneizados de la mucosa del intestino delgado de ratas por este método, se encontró un contenido de proteína de  $4.92 \pm 0.108$  mg/ml de muestra, que

presentan un coeficiente de variación del 2.2%, lo que indica precisión en la determinación.

Para lograr óptimos resultados en esta técnica la curva patrón se debe de elaborar todos los días en que se realicen determinaciones de proteína en la muestra, además es importante considerar que al preparar las soluciones de albúmina sérica bovina se debe evitar lo más posible la formación de espuma, para lograr el aforo exacto.

## DETERMINACIÓN DE GLUCOSA. ENSAYO ENZIMÁTICO

Curva patrón glucosa.

Gráfica 3. Condiciones de incubación a 37 °C por 10 minutos.

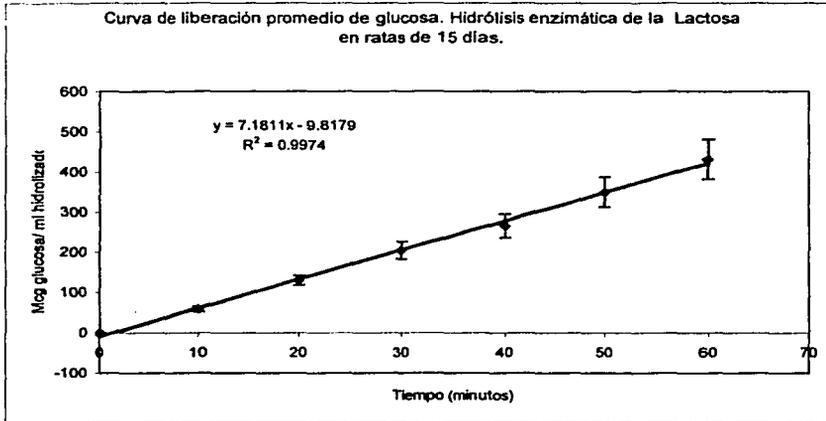
Al evaluar la glucosa presente en el extracto de la mucosa intestinal haciendo uso del método de glucosa-oxidasa-peroxidasa, se encontró que la curva patrón realizada en esta técnica permite obtener datos lineales dentro de los límites de detección de 0 y 100  $\mu\text{g}$  de glucosa (Gráfica 3).

Determinación en las muestras.

Para la determinación de la actividad enzimática se empleó un método de hidrólisis de las disacaridasas, usando como sustrato el disacárido respectivo en condiciones de 60 minutos a 37 °C y pH 6.3 para la maltasa y la sacarasa y pH 6.0 para la lactasa; donde la cantidad de producto hidrolizado (glucosa) es proporcional a la cantidad de enzima presente.<sup>43</sup>

Posteriormente se midió la glucosa liberada, por el método colorimétrico de glucosa oxidasa peroxidasa, los resultados se expresan por mililitro de hidrolizado.

Para los ensayos tanto de la maltasa, sacarasa y lactasa, en las condiciones descritas en la metodología se encontró que la liberación de glucosa es lineal con respecto al tiempo (condiciones de estudio de 60 minutos, a 37 °C), donde es muy importante respetar los tiempos de incubación y que todos los reactivos estén a 37 °C para lograr una óptima liberación de glucosa. En la gráfica 4 se muestra un ejemplo de las curvas de liberación obtenidas en el ensayo, donde se confirma que las condiciones de estudio son las adecuadas para determinar la actividad enzimática para cualquiera de las disacaridasas en estudio.

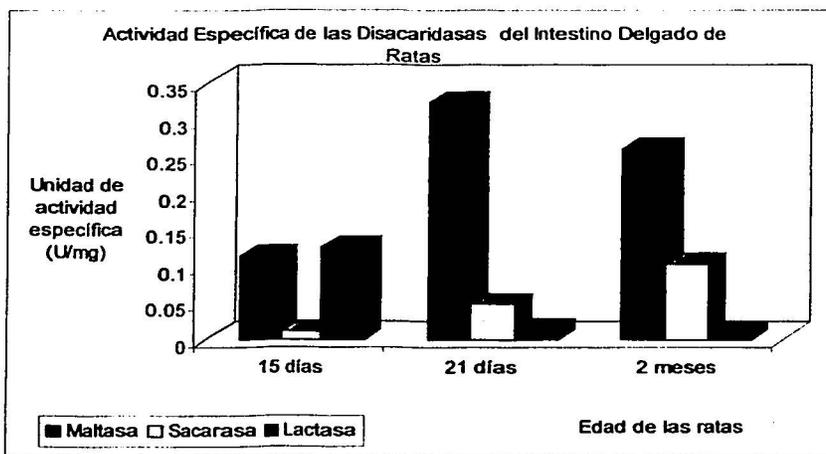


Gráfica 4. Curvas de liberación de glucosa en condiciones de: 0.5 ml de extracto enzimático diluido, 0.36 ml de sustrato en concentración de 50 mg/ml Lactosa y 0.14 ml de buffer de citratos pH 6.0. Donde la concentración de glucosa en µg/ml de hidrolizado se midió a los 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min de incubación a 37 °C. Se usaron n = 3 ratas y las determinaciones se hicieron por duplicado.

En el caso de que los hidrolizados presenten turbiedad por precipitación de la proteína después de que la actividad de la disacaridasa ha sido interrumpida por calor (agua en

ebullición) y antes de determinar la glucosa liberada, se puede centrifugar el hidrolizado para aclarar la muestra y que no interfiera en la lectura de glucosa en la muestra, como podría ser en los casos en que las disacaridasas presenten una baja actividad enzimática y se requiere de una muestra más concentrada para realizar el ensayo de liberación de glucosa.

Al evaluar la actividad enzimática de las disacaridasas del intestino delgado de las ratas en términos de micromoles de disacárido hidrolizado por minuto a 37 °C por mg de proteína se observó una variación en la actividad de la enzima conforme va creciendo la rata, la cual es presentada en la gráfica 5.



Gráfica 5. Efecto de la edad en la actividad de las disacaridasas del intestino delgado de ratas. En condiciones de 0.5 ml de extracto enzimático diluido, 0.36 ml de sustrato en concentración de 50 mg/ml (Maltosa, Sacarosa o Lactosa) y 0.14 ml de buffer de citratos (pH 6.3 para Sacarasa y Maltosa y pH 6.0 para Lactasa) a los 60 min de incubación a 37°C. Se usaron n = 3 ratas y las determinaciones se hicieron por duplicado.

En el caso de la maltasa se observa que la rata si presenta actividad a los 15 días, y que esta alcanza su máximo a los 21 días, llegado el momento de su destete, esto debido a que las ratas comienzan a recibir alimento a los 18 días de nacidas; posteriormente hay

una disminución en la actividad a los 2 meses, donde, se supone los valores de actividad enzimática han alcanzado los niveles de una rata adulta y permanecerán más o menos estables. Esto coincide con lo reportado en la bibliografía, donde se encontró que las ratas presentan cierta actividad de estas enzimas al nacer y que conforme su dieta cambia, la producción de esta enzima se va incrementando alcanzando su máxima actividad al momento del destete, y que estos valores decrecen un poco conforme avanza la edad de la rata, lo cual se ve compensado con el aumento de tamaño del intestino.<sup>36, 38</sup>

La sacarasa es reportada en la bibliografía con un comportamiento similar al de la maltasa<sup>36</sup>, sin embargo en este estudio se encontró que la actividad en la rata es muy baja a los 15 días de nacida, casi no perceptible y que se incrementa con el tiempo (la edad), siendo mayor a los 21 días, alcanzando la máxima actividad a los 2 meses. La explicación a este fenómeno radicarla en el tipo de dieta con que se alimenta a la rata, la cual no estimula de igual manera la acción hidrolítica de la sacarasa como la de la maltasa.

Al observar el comportamiento en la lactasa, se visualiza que el máximo de actividad entre las edades en estudio se presenta a los 15 días, y que ésta disminuye drásticamente a los 21 días hasta presentar casi la pérdida de la actividad a los dos meses. Lo cual coincide con lo informado por otros autores,<sup>35, 36 38,40</sup> donde los mamíferos al dejar de consumir leche y al no recibir de otro alimento la lactosa una vez que han cambiado su dieta, tienden a perder la actividad de esta disacaridasa.

Al realizar el análisis de varianza de una sola vía con un 90 % de nivel de confianza y la prueba de rango múltiple de Duncan, como métodos estadísticos para evaluar los resultados obtenidos de las diferentes actividades enzimáticas de las ratas en estudio, se encontró que cualquiera de las disacaridasas de los homogeneizados de las ratas a las cuales se les determinó la actividad enzimática en una misma edad (dentro de un mismo grupo) no presentan diferencia estadísticamente significativa, excepto por el caso de la lactasa a los 21 días la cual muestra diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, al estudiar el comportamiento de estos entre las edades en estudio de 15 días, 21 días y 2 meses (entre grupos), se logró observar que presentan diferencia estadísticamente significativa en su actividad enzimática tanto en las enzimas maltasa, sacarasa y lactasa.

Por otro lado en la tabla 2 se observa que el % de coeficiente de variación entre los duplicado de las tres ratas evaluadas es bajo, confirmando que la técnica permite obtener datos reproducibles, a excepción del 22.1 % presentado por las ratas al determinar la actividad de la lactasa a los 21 días, lo cual se explicaría al decir que en este momento de transición en el cambio de dieta de la leche a la dieta comercial que se origina a partir de los 18 días de nacidas, provoca una actividad muy variable debido a que las ratas no aceptan e ingieren de igual forma la dieta comercial que empiezan a consumir.

Tabla 2. CUADRO DE COMPARACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE LAS DISACARIDASAS DEL INTESTINO DELGADO DE RATAS DE TRES EDADES.

DISACARIDASAS		15 DÍAS	21 DÍAS	2 MESES
Maltasa	Actividad enzimática U/ mg de proteína*	$0.1138 \pm 5.84 \times 10^{-3}$	$0.3236 \pm 9.42 \times 10^{-3}$	$0.2606 \pm 7.61 \times 10^{-3}$
	% Coeficiente de variación	5.13	2.91	2.91
Sacarasa	Actividad enzimática U/ mg de proteína*	$0.0105 \pm 4.54 \times 10^{-4}$	$0.048 \pm 1.55 \times 10^{-3}$	$0.103 \pm 3.52 \times 10^{-3}$
	% Coeficiente de variación	4.31	3.2	3.4
Lactasa	Actividad enzimática U/ mg de proteína*	$0.126 \pm 2.39 \times 10^{-3}$	$0.0137 \pm 3.03 \times 10^{-3}$	$0.00980 \pm 1.23 \times 10^{-4}$
	% Coeficiente de variación	1.9	22.1	1.3

En condiciones: 0.5 ml de extracto enzimático diluido, 0.36 ml de sustrato en concentración de 50 mg/ml (Maltosa, Sacarosa o Lactosa) y 0.14 ml de buffer de citratos (pH 6.3 para Sacarasa y Maltasa y pH 6.0 para Lactasa). Donde la actividad enzimática se mide a los 60 min de incubación a 37°C. Se usaron n = 3 ratas y las determinaciones se hicieron por duplicado.

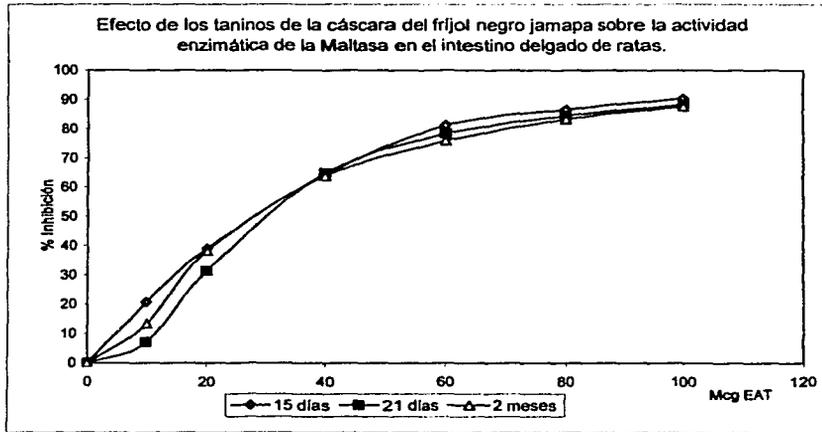
\* La actividad enzimática esta expresada en U / mg de proteína, es decir, las micromoles de disacárido hidrolizado por minuto a 37 °C por mg de proteína.

### EFFECTO DE LOS TANINOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS DISACARIDASAS

Para evaluar el efecto inhibitorio de los taninos sobre la actividad de las disacaridasas se hizo uso del ensayo de referencia con 0  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido tánico.

Al evaluar el efecto de inhibición de los taninos del frijol negro Jamapa sobre las disacaridasas de la fracción del borde del cepillo del intestino delgado, se utilizaron soluciones de 10-100  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido tánico en 0.14 ml, los cuales se adicionaron en los ensayos enzimáticos, observándose que estas enzimas se ven afectadas por la adición de los compuestos polifenólicos al medio de ensayo, como se muestra en las gráficas 6, 7 y 8. Donde se incluyó un blanco de la muestra la cual no presenta taninos (0  $\mu\text{g}$  E.A.T.).

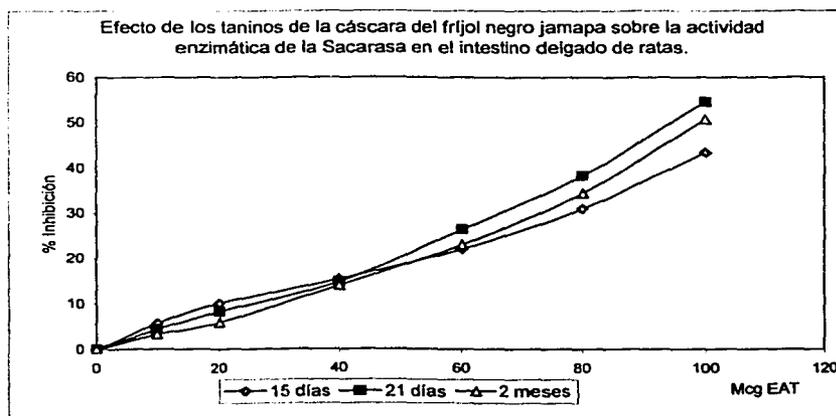
#### Inhibición sobre la maltasa



Gráfica 6. Se tomaron en cuenta las siguientes condiciones: 0.5 ml de extracto enzimático diluido, 0.36 ml de Maltosa (50 mg/ml) y 0.14 ml del extracto de taninos del frijol (0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g}$ ). Donde la actividad enzimática de la Maltasa es tomada a los 60 min a 37°C. Se usaron  $n = 3$  ratas y las determinaciones se hicieron por duplicado.

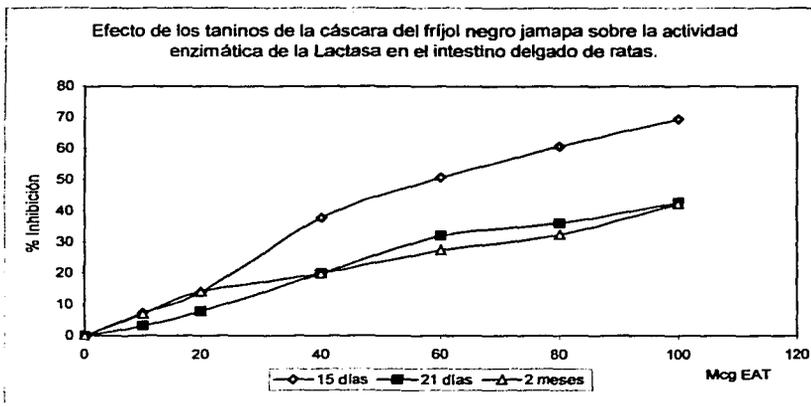
Para la maltasa los % de inhibición máxima son de:  $90.4 \pm 2.77$  en las ratas lactantes,  $88.3 \pm 2.97$  en las ratas recién destetadas y de  $87.7 \pm 2.35$  en las ratas jóvenes. Esta enzima se ve fuertemente inhibida debido a que en las diferentes edades evaluadas esta se presenta siempre disponible para formar complejos con los taninos, los que afectan su actividad hidrolítica.

#### Inhibición sobre la sacarasa



Gráfica 7. Se tomaron en cuenta las siguientes condiciones: 0.5 ml de extracto enzimático diluido, 0.36 ml de Sacarosa (50 mg/ml) y 0.14 ml del extracto de taninos del frijol (0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu$ g). Donde la actividad enzimática de la Sacarasa es tomada a los 60 min a 37°C. Se usaron  $n = 3$  ratas y las determinaciones se hicieron por duplicado.

En el caso de la sacarasa se encuentran % de inhibición máximos de:  $43.4 \pm 2.56$  en las ratas lactantes,  $54.6 \pm 2.96$  en ratas recién destetadas y  $50.7 \pm 1.39$  en ratas jóvenes, al adicionar 100  $\mu$ g E.A.T. Donde el comportamiento es muy similar, sin embargo es aún menor en las ratas lactantes, lo que indicaría una menor disposición de esta enzima para interactuar con los taninos del medio.

**Inhibición sobre la lactasa**

Gráfica 8. Se tomaron en cuenta las siguientes condiciones: 0.5 ml de extracto enzimático diluido, 0.36 ml de Lactosa (50 mg/ml) y 0.14 ml del extracto de taninos del frijol (0, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg). Donde la actividad enzimática de la lactasa es tomada a los 60 minutos a 37°C. Se usaron  $n = 3$  ratas y las determinaciones se hicieron por duplicado.

La actividad enzimática de la lactasa al adicionarle 100 µg E.A.T. alcanza % de inhibición de:  $69.5 \pm 1.07$  en ratas lactantes,  $42.7 \pm 2.99$  en ratas recién destetadas y  $42.3 \pm 2.35$  en ratas jóvenes. Donde la máxima inhibición alcanzada es para las ratas de 15 días. Un punto importante es que en el caso de la lactasa a los 15 días esta alcanza una inhibición mucho más fuerte que en las otras edades evaluadas, lo cual se entendería se debe a que en esta edad la lactasa esta más ampliamente distribuida, por necesidad de la rata de consumir este disacárido.

Se puede apreciar en todos los ensayos de inhibición de la actividad enzimática de las disacaridasas realizados en este experimento, que la hidrólisis de los disacáridos se ve afectada cuando se adicionan los taninos extraídos al frijol negro al medio de ensayo. La inhibición va aumentando conforme se incrementa la concentración de taninos.

Se observa que de las tres disacaridasas evaluadas (en las tres diferentes edades) que la maltasa disminuye más rápidamente su actividad enzimática, en comparación con la sacarasa y la lactasa.

Por estudio estadístico, mediante del análisis de varianza de una sola vía con un intervalo de confianza del 90 % y de la prueba de rango múltiple no se encontraron diferencias significativas entre las determinaciones realizadas al efecto inhibitorio de las disacaridasas evaluadas a las tres edades de ratas en estudio, para el caso de la maltasa.

Se encontró que la enzima lactasa y sacarasa muestran diferencia significativa en las inhibiciones máximas de las ratas de 15 días con respecto a las de 21 días y 2 meses.

El no encontrar diferencia significativa en el efecto inhibitorio entre las ratas de 21 días y las de 2 meses, para los casos de sacarasa y lactasa, es probablemente a que su distribución a lo largo del intestino es más uniforme.

A partir de estudios anteriores, donde, únicamente se evaluó el efecto de compuestos fenólicos y ácido tánico sobre la sacarasa -rata adulta- (Welsch, C.A. y col., 1989); y de las determinaciones del efecto de los taninos condensados purificados sobre las disacaridasas en una sola edad -rata adulta- (Carmona A. y col., 1996); y del presente trabajo, donde se evaluaron los efectos de los taninos totales en las disacaridasas en tres diferentes etapas de vida de la rata -ratas lactantes, recién destetadas y adulto joven-; se observa que los taninos presentan una fuerte afinidad por las disacaridasas del intestino delgado, lo cual implica una disminución en el aprovechamiento de los nutrimentos del frijol u otros alimentos que contengan taninos.



## CAPITULO VI

---

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- La técnica ISO 9648/1988 nos permite obtener la óptima concentración de los taninos contenidos en el extracto hecho a la cáscara del frijol negro Jamapa: además de que se encontró que es lineal y tiene un límite de detección entre los 0 y 560  $\mu\text{g}$  de ácido tánico.
  
- En la técnica para determinar proteína por el método de Lowry es necesario realizar una curva en cada una de las determinaciones enzimáticas de las muestras, dado que la concentración de proteína del extracto de la mucosa intestinal de rata varía entre las ratas recién destetadas y las ratas jóvenes y las determinaciones realizadas por el método de Lowry son lineales entre los 0 y 100  $\mu\text{g}$  de proteína, por lo que es necesario que la muestra se encuentre dentro de éste intervalo.
  
- En la técnica de glucosa oxidasa peroxidasa se observa linealidad entre los 0 y 100  $\mu\text{g}$  glucosa; por lo que las muestras deberán ajustarse a estas concentraciones para evitar errores en la determinación.
  
- Se encontró que en las condiciones establecidas para el ensayo con las enzimas maltasa, sacarasa y lactasa, se obtiene una liberación lineal de la glucosa al realizarse la hidrólisis enzimática.
  
- Se observó que los taninos extraídos de la cáscara del frijol negro Jamapa, sí inhiben la actividad de las enzimas disacaridasas del intestino delgado de ratas en las tres edades en estudio y que conforme se aumenta la concentración de las soluciones de taninos en la mezcla de ensayo, se disminuye la actividad enzimática de las disacaridasas (sacarasa, maltasa y lactasa). Confirmando lo establecido previamente en la hipótesis de este trabajo.

## CONCLUSIONES

- En las gráficas obtenidas se observa que la maltasa disminuye más rápidamente su actividad enzimática, en comparación con la sacarasa y la lactasa. Donde la lactasa y sacarasa se ven inhibidas de manera similar, aún cuando la lactasa se encuentre en valores ligeramente por debajo de la sacarasa.



## CAPITULO VII

---

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Amaya H., Acevedo E., Bressani R. "Efecto del recalentamiento sobre la disponibilidad de hierro y el valor nutritivo de la proteína del frijol negro (*Phaseolus vulgaris*) cocido." Arch. Lat. Nutr. Vol. 41 (1991), pag. 222-237.
- 2) Flores Velis María Margarita. "Aspectos nutricionales del frijol negro". Universidad La Salle, México, D.F. 1981.
- 3) Moseley G., Griffiths D. W. " Varietal Variation in the Anti-nutritive Effects of Field Beans (*Vicia faba*) when Fed to Rats." J. Sci. Food Agric. Vol. 30, (1979), pag. 772-778.
- 4) Griffiths, D. W. "The Polyphenolic Content an Enzyme Inhibitory Activity of Testas from Bean (*Vicia faba*) and Pea (*Pisum spp.*) Varieties." J. Sci. Food Agric. Vol. 32, (1981), pag. 797-804.
- 5) Carmona A., Borgoudd L., Borges G., Levy-Benshimol A. "Effect of black bean tannins on in vitro carbohydrate digestion and absorption". J Nutr. Biochem. Vol. 7, (1996), pag. 445-450.
- 6) Goycoolea Valencia Francisco Martín. "Efecto de los tratamientos caseros de preparación de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre el contenido de taninos y valor nutritivo de las proteínas". Universidad La Salle, México, D.F. 1988.
- 7) Castellanos J., Guzmán H., Mejía C., Jiménez A. y col. "Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en México." Arch. Lat. Nutr. Vol. 47, No. 2, (1997), pag. 163-167.
- 8) Aw T. L., Swanson B. G. "Influence of Tannin on *Phaseolus vulgaris* Protein Digestibility and Quality." J. Food Sci. Vol. 50, (1985), pag. 67-71.
- 9) Rockland L. B., Radke T. M. "Legume Protein Quality." Food Tech. Vol. 35, No. 3, (1981), pags. 79-82.

- 10) Carmona A., Seild D. S., Jaffé W. G. "Comparison of extraction methods and assay procedures for the determination of the apparent tannin content of common beans". J.Sci. Food Agric. Vol. 56, (1991) pag. 291-301.
- 11) Elías L. G., Fernández D. G., Bressani R. "Possible Effects of Seed Coat Polyphenolics on the Nutritional Quality of Bean Protein." J. Food Sci. Vol. 44, No. 2, (1979), pag. 524-527.
- 12) Desphande S. S., Cheyran M. "Evaluation of vanillin assay for tannin analysis of dry bean". J. Food Sci. Vol. 50, (1985), pag. 905-910.
- 13) Bressani R., Mora D. R., Flores R., Gómez-Brenes R. "Evaluación de dos Métodos para Establecer el Contenido de Polifenoles en Frijol Crudo y Cocido. Efecto que estos Provocan en la Digestibilidad de la Proteína." Arch. Lat. Nutr. Vol. 41, (1991), pag. 569-583.
- 14) Shamah T., Vázquez C., Cervantes L., Chávez A. "Guías de alimentación y nutrición. Una propuesta didáctica." Arch. Lat. Nutr. Vol. 47, No. 3, (1997), pag. 256-261.
- 15) Goycoolea F., González E., Barrón J. M., Valencia M. E. "Efecto de los tratamientos caseros en la preparación de frijol pinto (*Phaseolus vulgaris L.*) sobre el contenido de taninos y valor nutritivo de las proteínas". Arch. Lat. Nutr. Vol. 40, (1990), pag. 263-274.
- 16) Bressani R., Elías L. G., Wolzak A., col. "Tannin in Common Beans: Methods of Analysis and Effects on Protein Quality." J. Food Sci. Vol. 48, (1983), pag.1000,1001,1003.
- 17) Hui Y. H. "Tannins." Encyclopedia of Food Science and Technology. Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. Vol. 4, pag. 2505-2509.

- 18) Jambunathan R, Mertz E. T. "Relationship Between Tannin Levels, Rat Growth, and Distribution of Proteins in Sorghum". J. Agric. Food Chem. Vol. 21, (1973), pag. 692-696.
- 19) Friedman M., Griffiths D. W. "The Inhibition of Digestive Enzymes by Polyphenolic Compounds." Advances in Experimental Medicine and Biology, Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods. Ed. Plenum Press, New York. Vol. 199, (1986), pag. 509-516.
- 20) Zhu M., Phillipson D., Greengrass P. M., Bowery N. E., Cai Y. "Plant Polyphenols: Biologically Active Compounds or Non-Selective Binders to Protein." Phytochemistry. Vol. 44, No. 3, (1997), pag. 441-447.
- 21) Spencer C. M., Cai Y., Martin R., Gaffney S.H. y col. "Polyphenol Complexation-Some Thoughts and Observations." Phytochemistry. Vol. 27, No. 8, (1988), pag. 2397-2409.
- 22) Terrill T. H., Rowan A. M., Douglas G. B., Barry T. N. "Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains". J. Sci. Food Chem. Vol. 58, (1992), pag. 321-329.
- 23) Welsch C. A., Lachance P. A., Wasserman B. P. "Effects of Native and Oxidized Phenolic Compounds on Sucrase Activity in Rat Brush Border Membrane Vesicles." J. Nutr. Vol. 119, (1989), pag. 1737-1740.
- 24) Parr A. J., Botwell G. P. "Review. Phenols in The Plant and in Man. The Potential for Possible Nutritional Enhancement of the Diet by Modifying the Phenols Content or Profile." J. Sci. Food Agric. Vol. 80, (2000), pag. 985-1012.
- 25) Jung H. J., Fahey G. C. "Effects of Phenolic Monomers on Rat Performance and Metabolism." J. Nutr. Vol. 113, (1983), pag. 546-555.

- 26) Haslam E. "Polyphenol-Protein Interactions." Biochem. J. Vol. 139, (1974), pag. 285-288.
- 27) Muñoz M., Chávez A., Roldan J. Ledesma J. Mendoza E., Pérez F. Tabla de valor nutritivo de los alimentos. Editorial Pax, 2° reimpression. México, D.F. (1996).
- 28) Mondragón M. C., González D. R. "Caldos de frijoles en relación a su contenido de aminoácidos y polifenoles." Arch. Lat. Nutr. Vol. 28, (1978), pag. 41-61.
- 29) Griffiths D. W., Moseley G. "The Effect of Diets Containing Field Beans of High or Low Polyphenolic Content on The Activity of Digestive Enzymes in the Intestine of Rats." ". J. Sci. Food Agric. Vol. 31, (1980), pag. 255-259.
- 30) Mangan J. L. "Nutritional Effects of Tannins in Animal Feeds." Nutr. Res. Rev. Vol. 1, (1988), pag. 209-231.
- 31) Glick Z., Joslyn M. A. "Food Intake Depression and other Metabolic Effects of Tannic Acid in the Rat." J. Nutr. Vol. 100, (1970), pag. 509-515.
- 32) King-Tom Chug, Cheng-I Wei. "Food Tannins and Human Health: A Double-Edged Sword?" J. Food Sci. Vol. 51, No. 9, (1997), pag. 124.
- 33) Strumayer D. H., Malin M. J. "Condensed tannins in grain sorghum: isolation, fractionation and characterization". J. Agric. Food Chem. Vol. 23, (1975), pag. 909-914.
- 34) Donovan J., Crespy V., Manach C. y col. "Catechin Is Metabolized by Both the Small Intestine and Liver of Rats." J. Nutr. Vol. 131, No. 6, (2001), pag. 1753-1757.
- 35) Prosser J, Morris E. "Nutrition." Environmental and Metabolic Animal Physiology, 4° edición. Editorial Wiley-Liss. New York, (1991), pag. 213-216, 231-235.

- 36) Semenza G. "Intestinal Oligosaccharidases And Disaccharidases." Handbook of Physiology, Section 6: Alimentary Canal, Vol. 5: Bile, Digestion; Ruminant physiology. Ed. Waverly Press. American Physiology Society, New York, (1968), pag. 2543-2561.
- 37) Tresguerres J. A. F. "Fisiología del sistema digestivo. Bases morfológicas del proceso de absorción-secreción." Fisiología Humana. Ed. Interamericana \* McGraw-Hill. Madrid, (1992), pag. 776-786.
- 38) Haubrich, Schaffer, Berk. "Carbohydrate Assimilation". Gastroenterology, 5a edición. Ed. W.B. Saunders Company, New York. Vol. 2, (1991), pag. 955-962.
- 39) Castillo R. O., Reisenauer A. M., Kwong L. K. y col. "Intestinal lactase in the neonatal rat." J. Biol. Chem. Vol. 265, (1990), pag. 15889-15893.
- 40) Nils G., Dahlqvist A. "Human Small Intestine  $\beta$ -Galactosidases: Specific Assay of Three Different Enzymes." Anal. Biochem. Vol. 47, (1972), pag. 527-538.
- 41) Thomsen L. L., Tasman-Jones C. "Disaccharidase Levels of the Rat Jejunum are Altered by Dietary Fibre." Digestion. Vol. 23, (1982), pag. 253-258.
- 42) Carmona A. "A Simple in Vitro Perfusion System to Measure Intestinal Nutrient Uptake" J. Nutr. Biochem. Vol. 9, (1998), pag. 53-57.
- 43) Dahlqvist A. "Method for Assay of Intestinal Disaccharidases." Anal. Biochem. Vol. 7, (1964), pag. 18-25.
- 44) Plummer D. T. Bioquímica práctica. Capítulo 9: "Enzimas". 2ª edición. Editorial Mc-Graw Hill, Bogotá, (1981). pag. 230-272.
- 45) Bergmeyer H. U. (editor en jefe) " $\alpha$  - glucosidases (disaccharidases)." Methods of Enzymatic Analysis, 3ª edición. Editores Jurgen Bergmeyer and Marianne Grassl. Weinheim, (1996). Vol. 4, pag. 208-217.

- 46) International Standard. Sorghum-Determination of tannin content. First edition, (1988). ISO No. 9648.
- 47) Bergmeyer H. U. (editor en jefe). The Lowry Method. Methods of enzymatic analysis. 3a edición. Editores Jurgen Bergmeyer and Marianne Grassl. Weinheim, vol.1, (1988), pag. 88-91.
- 48) Hycel de México, S.A. de C.V. glucosa (oxidasa). Método Enzimático, Colorimétrico, De Punto Final, Trinder, GOG-POD. No. 70408.
- 49) Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R. J. "Protein measurement with the Folin phenol reagent". J. Biochem. Vol. 193, (1951), pag. 265-275.
- 50) Stryer L. "Enzimas: conceptos básicos y cinética". Bioquímica, 4ª edición. Ed. Reverte. Barcelona, (1995). Tomo 1. pag. 186-200.
- 51) Montgomery D. C. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana. México, D.F. (1991). Capítulo 7, pag.
- 52) Dirección electrónica: <http://w3.one.net/~jwclymer/cit.html>. Jeffrey Clymer. Citric buffer calculation. Version No. 1, Septiembre 8, (1997). Consultada el 4 de Septiembre del 2000.
- 53) Trinder P. Glucose measurement with glucose-oxidase-peroxidase reagent. Annal Clinical Biochemical. Vol .7, No. 3, (1994).