

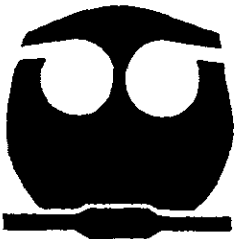


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFEECTO DE LOS TANINOS DEL FRIJOL NEGRO (Phaseolus vulgaris) EN LA MUCOSA INTESTINAL DE RATA A NIVEL ULTRAESTRUCTURAL.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
MARISOL JAZMIN GIL FRANCO



MEXICO, D. F.

Handwritten signature/number

2000



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

**Presidente:** M. en C. Angela Sotelo López.  
**Vocal:** M. en C. Lucía Cornejo Barrera.  
**Secretario:** Prof. Leticia Gil Vieyra.  
**1er Suplente:** M. en C. Ignacio Camacho Arroyo.  
**2do Suplente:** Prof. Inés Miranda Martínez.

## LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA.

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

Departamento de Microscopía Electrónica. Instituto de Fisiología Celular. Ciudad  
Universitaria.

**Asesor del tema.**

M en C. Angela Sotelo López



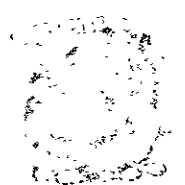
**Asesor Técnico.**

M en C. Rosa María Argote Espinosa.



**Sustentante**

Marisol Jazmín Gil Franco.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

## AGRADECIMIENTOS

**A DIOS.** *Por prestarme salud y vida para poder alcanzar esta meta y por las bendiciones que me has dado hasta ahora.*

**A MIS PADRES.** *No existe palabra alguna en el mundo, con la cual yo pueda expresar todo mi agradecimiento y amor hacia ustedes, pero lo que si puedo decir es que aún nos queda toda una vida para vivir y experimentar cosas nuevas juntos, aprendiendo todo lo que nadie mejor que ustedes me pueden transmitir. Los adoro y los amo mucho, que si hubiera otra oportunidad de vivir, los volvería a escoger a ustedes como mis Padres sin pensarlo ni un segundo siquiera. Soy lo que soy gracias a ustedes, por sus principios, por su amor. Pero antes que nada ADMIRO, su sacrificio por nosotros, la fortaleza que tienen como pareja, como personas, como padres, como amigos. Espero poder lograr todo lo que ustedes han hecho en la Vida algún día, porque esto es solo el comienzo. Se merecen todo lo mejor de la vida. Que Dios los Bendiga ahora y siempre. GRACIAS. LOS AMO.*

**JULIO.** *Este logro también es tuyo, porque formas parte de mi vida, porque eres mi otra mitad, porque por el hecho de llevar la misma sangre, nos hace mucho mas unidos. Te doy gracias por tu paciencia, apoyo y comprensión en todos los sentidos, y ojalá, la vida nos conduzca a muchos éxitos más, como hasta ahora. TE QUIERO MUCHO.*

**ABUELITOS.-** *Mis abuelitos preciosos, Dios me dio la bendición de tenerlos conmigo hasta ahora y ojalá que por muchos años más. Gracias por su cariño y amor que sólo ustedes pueden brindar. Que Dios los bendiga ahora y siempre.*

**ALEJANDRO.** *Gracias por el amor y el cariño que me brindaste cada momento que estuvimos juntos. El haberte tenido siempre a mi lado, me hizo mas reconfortante los momentos difíciles y quiero que sepas que formas parte de mi vida para siempre, porque tu eres la persona a la cual he logrado amar tan intensamente. Y una vez más me atrevo a decirte que TE AMO.*

**A MI MAESTRA ANGELA.** No sé como agradecerle todo lo que me ha ayudado a que esto haya sido posible, simplemente sin usted, este documento no existiría. Este trabajo es completamente suyo. Gracias por demostrarme que las cosas que uno haga siempre, ya sea laboral o personal, siempre hay que hacerlas con nuestro mejor esfuerzo, para llegar a ser y a estar donde esta usted. La admiro mucho como persona y como profesional en toda la extensión de la palabra. GRACIAS.

**ROSITA.** Amiga y maestra excepcional. Tu sabes que sin ti, sin tu ayuda, no existiría ensayo biológico ni muchos menos la Tesis. Gracias, Mil Gracias por levantarme en esos momentos que creta que ya no podía levantarme, por tus estimulaciones a seguir realizando nuestras metas, hasta alcanzarlas, pase lo que pase. Este trabajo también es tuyo. Quiero que sepas que te estimo y te admiro muchísimo. Muchas Gracias.

**MARK WEST, RODOLFO Y JORGE.** Y en conjunto al Departamento de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, les agradezco muchísimo, que me hayan compartido lo más preciado para ustedes, que son sus conocimientos y su enseñanza, su apoyo, ayuda y paciencia, para que este trabajo fuera posible. MIL GRACIAS.

**Dra. ROCIO SALCEDA.** Y a todas las personas que laboran en su laboratorio y al Instituto de Fisiología Celular. Muchas gracias por ofrecirme ayuda, cuando más la necesitaba, por demostrarme que nada ni nadie puede interrumpir tu destino, mas que por uno mismo. Gran parte de este trabajo, lo realice junto con ustedes en su laboratorio, y me llena de orgullo el haberlo hecho, pero sobre todo el haberla conocido, porque es una persona maravillosa. GRACIAS.

**LETY y Sra. VICKY.** Y a todo los que integran el Laboratorio 111, a mis compañeros con los cuales realizamos al mismo tiempo la tesis. Muchas Gracias por hacerme partícipe de ustedes, y por su gran ayuda. Los voy a recordar siempre con mucho cariño.

**LILIANA.** *Mi amiga de toda una vida, mi amiga con la cual pasé toda mi adolescencia y que hasta la fecha seguimos compartiendo éxitos, y experiencias inolvidables, buenas y malas, pero pasara lo que pasara tu siempre estuviste ahí, al pie del cañón. La vida nos puso en el mismo camino y se lo agradezco mucho, así como a ti te agradezco que me ofrecieras tu amistad sincera, tu cariño y apoyo, que solo tu me puedes brindar, y que me toco vivir contigo. GRACIAS Y RECUERDA QUE TE QUIERO MUCHO.*

**GABY, ZULLY, CRISTINA, VICKY, SOFIS.** *Mis mejores amigas de la Preparatoria, y de la Secundaria, la época escolar más bonita, y donde en ningún lugar, sino ahí, es donde se encuentra uno a personas tan maravillosas como ustedes. Muchas gracias por hacerme parte de sus vidas, por ofrecerme su amistad incondicional y sincera y por compartir experiencias padrísimas.*

**A MIS COMPAÑEROS DE LA UNIVERSIDAD.** *Tendría que mencionar al grupo 14, mi primer grupo en la Facultad, donde se encuentran a los amigos que perduran para toda tu carrera, unos continuaron en la facultad, otros se fueron para encontrar la vida que estaban buscando, pero los que quedaron bien saben el esfuerzo que implicó llegar a esto: Karen, Jessica, Bella, Danny Boy, Haissman, Beto, Gaby, Barbarita, Marco, José, y demás que espero no olvidarme de alguien importante, pero ustedes saben quienes son, y si lo hice les ruego me disculpen.*

**LUPIS.** *A mi amiga Simplona, con la cual la vida me hizo reir casi hasta llegar a un ataque cardíaco, con la que viví experiencias muy padres y con la que espero seguir viviéndolas. Te quiero mucho, recuérdalo siempre.*

**SERGIO LARA y LUPITA.** *Mi Doctor consentido, al cual quiero muchísimo, tu también formas parte de esto, porque sin tus curas maravillosas, yo no hubiera podido ir a mis clases, porque a cada rato me enfermaba, pero tus consejos y tus terapias me ayudaron a sacar todo esto adelante. Mi Doctor Maravilloso quiero decirte que te admiro mucho. GRACIAS. Lupita, muchas gracias por tus consejos de mama, me sirvieron mucho.*

*Sería una lista interminable agradecer a cada una de las  
personas que han formado parte de mi vida, pero les  
agradezco infinitamente a cada uno de ustedes.*

GRACIAS

# INDICE

Pág

• Resumen.....	1
• Introducción.....	2
• Objetivos.....	5
<b>I ANTECEDENTES.</b>	
<b>1.1 Leguminosas y su digestibilidad.....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Taninos en frijol blanco y frijol negro.....	7
<b>1.2 Taninos.....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Composición química.....	9
1.2.2 Clasificación.....	10
A. Taninos hidrolizables.....	10
❖ Galotaninos.....	11
❖ Elagitaninos.....	11
B. Taninos condensados.....	12
<b>1.3 Disolventes y métodos empleados para la extracción y determinación de taninos.....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Extracción de taninos.....	14
A. Dimetilformamida.....	14
B. Metanol al 80% en HCl al 1%.....	15
1.3.2 Efecto del contenido de agua junto con el disolvente de extracción.....	16
1.3.3 Métodos de cuantificación de taninos.....	17
A. Métodos para fenoles totales.....	18
❖ Azul de Prusia.....	18
❖ Folin- Denis.....	18
❖ Complejos ión metal-fenol.....	18
B. Métodos de precipitación.....	19
C. Métodos con grupos funcionales.....	20
D. Métodos para taninos condensados.....	20
❖ Prueba de la vainillina.....	20
❖ Butanol-HCl.....	21



E. Métodos para taninos hidrolizables.....	22
❖ Ensayo con Iodato.....	22
❖ Ensayo con ácido Nitroso.....	22
<b>1.4 Taninos Termoestables ó Termolábiles?.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Efecto de los taninos utilizados como parte de una dieta.....</b>	<b>24</b>
1.5.1 Disminución en la ingesta de alimento.....	24
1.5.2 Efecto en la digestibilidad.....	24
1.5.3 Inhibición de la hidrólisis enzimática de la celulosa.....	25
1.5.4 Inhibición de la proteína del cacahuate.....	25
1.5.5 Dieta con frijol negro cocido.....	25
1.5.6 Efecto en ratas.....	26
<b>1.6 Efectos benéficos de los taninos.....</b>	<b>27</b>
<b>1.7 Microscopía Electrónica.....</b>	<b>27</b>
1.7.1 Descripción.....	28
A. Columna	
Principal.....	28
❖ Sistema de iluminación.....	28
❖ Sistema de formación de imagen.....	28
❖ Sistema de registro y observación.....	28
B. Sistema de vacío.....	29
C. Fuente de poder.....	29
D. Sistema de manejo.....	29
❖ Interruptor general.....	29
❖ Refrigeración.....	29
❖ Vacío.....	29
❖ Interruptor de alta tensión.....	29
❖ Filamento.....	29
❖ Emisión.....	29
❖ Alimentación.....	29
❖ Condensador y objetivo.....	29
1.7.2 Preparación de las muestras biológicas.....	30
A. Fijación.....	30

B. Deshidratación.....	31
C. Inclusión.....	31
D. Corte.....	33
E. Contraste.....	34

## II. METODOLOGÍA.

<b>2.1 Extracción y Determinación de Taninos.....</b>	<b>35</b>
2.1.1 Reactivos .....	35
2.1.2 Equipo y material .....	36
2.1.3 Muestras .....	37
2.1.4 Acondicionamiento de la muestra .....	37
2.1.5 Método de extracción de taninos .....	38
2.1.6 Método de determinación de taninos.....	40
2.1.6.1 Método de determinación de taninos en las muestras.....	40
2.1.6.2 Curva patrón.....	42
2.1.7 Determinación de taninos en agua de remojo de frijol negro.....	44
<b>2.2 . Ensayo</b>	
<b>Biológico.....</b>	<b>45</b>
2.2.1 Reactivos .....	45
2.2.2 Equipo y material .....	45
2.2.3 Ensayo biológico con ácido tánico. ....	46
2.2.4 Preparación del extracto para el ensayo biológico .....	48
2.2.4.1 Cocción.....	48
2.2.4.2 Liofilización... ..	48
2.2.4.3 Obtención del extracto de taninos.....	49
2.2.5 Ensayo biológico con taninos extraídos del frijol negro cocido.....	51
<b>2.3. Procesamiento de muestras para microscopía electrónica. ....</b>	<b>55</b>
2.3.1 Reactivos .....	55
2.3.2 Equipo y material .....	56
2.3.3 Procesamiento de muestras para MET.....	57

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

<b>3.1 Curva Patrón.</b> .....	61
❖ <b>Tabla 3.1.</b> .....	62
❖ <b>Gráfico 3.1.</b> .....	63
<b>3.1.1 Determinación de absorbancia en curva patrón después de un almacenamiento en refrigeración.</b> .....	64
❖ <b>Tabla 3.1.1.A.</b> .....	65
❖ <b>Tabla 3.1.1.B.</b> .....	66
❖ <b>Tabla 3.1.1.C.</b> .....	66
❖ <b>Gráfico 3.1.1.A.</b> .....	67
❖ <b>Gráfico 3.1.1.B.</b> .....	68
❖ <b>Gráfico 3.1.1.C.</b> .....	69
<b>3.2 Frijol Blanco.</b> .....	70
❖ <b>Tabla 3.2.1.</b> .....	72
❖ <b>Tabla 3.2.2.</b> .....	73
❖ <b>Tabla 3.2.3.</b> .....	73
❖ <b>Tabla 3.2.4.A.</b> .....	74
❖ <b>Tabla 3.2.4.B.</b> .....	74
<b>3.3 Sorgo.</b> .....	75
❖ <b>Tabla 3.3.1.</b> .....	76
❖ <b>Tabla 3.3.2.</b> .....	76
❖ <b>Tabla 3.3.3.</b> .....	77
❖ <b>Tabla 3.3.4.A.</b> .....	77
❖ <b>Tabla 3.3.4.B.</b> .....	78
<b>3.4 Frijol Negro Crudo.</b> .....	79
❖ <b>Tabla 3.4.1.</b> .....	80
❖ <b>Tabla 3.4.2.</b> .....	80
❖ <b>Tabla 3.4.3.</b> .....	81
❖ <b>Tabla 3.4.4.A.</b> .....	81
❖ <b>Tabla 3.4.4.B.</b> .....	82
<b>3.5 Frijol Negro Cocido.</b> .....	83
❖ <b>Tabla 3.5.1.</b> .....	84
❖ <b>Tabla 3.5.2.</b> .....	84
<b>3.6 Taninos en agua de remojo.</b> .....	85
❖ <b>Tabla 3.6.1.</b> .....	86

<b>3.7 Ensayo Biológico.</b>	
3.7.1 Ensayo biológico con ácido tánico.....	87
❖ Figuras 3.7.1.A y 3.7.1.B.....	90
❖ Figuras 3.7.1.C y 3.7.1.D.....	91
❖ Figuras 3.7.1.E y 3.7.1.F.....	92
3.7.2 Ensayo biológico con taninos extraídos de 5g de frijol negro cocido.....	93
❖ Figuras 3.7.2.A y 3.7.2.B.....	96
❖ Figuras 3.7.2.C y 3.7.2.D.....	97
❖ Figuras 3.7.2.E y 3.7.2.F.....	98
❖ Figuras 3.7.2.G y 3.7.2.H.....	99
❖ Figuras 3.7.2.I y 3.7.2.J.....	100
❖ Figuras 3.7.2.K y 3.7.2.L.....	101
❖ Figuras 3.7.2.M y 3.7.2.N.....	102
3.7.3 Ensayo biológico con taninos extraídos de 10g de frijol negro cocido.....	103
❖ Figuras 3.7.3.A y 3.7.3.B.....	104
❖ Figuras 3.7.3.C y 3.7.3.D.....	105
❖ Figuras 3.7.3.E y 3.7.3.F.....	106
❖ Figuras 3.7.3.G y 3.7.3.H.....	107
4 CONCLUSIONES.....	108
5 BIBLIOGRAFÍA.....	110

## RESUMEN

Los alimentos de origen vegetal son una fuente importante de proteína, pero su valor nutricional depende no sólo de la composición química sino también de la medida en que los nutrimentos son digeridos, absorbidos y utilizados. Los taninos, al unirse a las proteínas disminuyen su digestibilidad, es decir, interfieren en la biodisponibilidad de los nutrimentos para que sean absorbidos y digeridos. Es por eso que se realizó la extracción de los taninos, en semillas de leguminosas: frijol negro y frijol blanco (*Phaseolus vulgaris*), y en un cereal: el sorgo (*sorghum*), basándonos en el método ISO 9648:1988. El mejor disolvente a emplear para la extracción fue: Dimetilformamida al 75%. La cuantificación de Taninos se lleva a cabo por medio del método registrado en la ISO 9648 – 1988, con algunas modificaciones. La determinación se recomienda que se realice con harina recién obtenida.

Para el estudio biológico se realizó un experimento agudo administrando vía intragástrica a ratas ácido tánico en una dosis única con 100mg de ácido tánico, junto con una rata control, a la que se le administra vía intragástrica solución salina al 0.9%. Los cortes de intestino delgado (duodeno), de rata, son procesados para su observación mediante el uso del microscopio electrónico de transmisión (XEOL 1200CX II), en donde el efecto más evidente se observa a nivel de microvellosidad y mitocondrias. Un segundo ensayo biológico se realizó, con el extracto de taninos extraídos del frijol negro cocido de 5 y 10g respectivamente, que en una dosis única equivalen al consumo de una ración diaria por una persona adulta. El frijol negro es cocido en agua por 2h, para posteriormente ser secado por liofilización, el contenido de taninos fue 34% menor que el de la semilla cruda. La concentración administrada vía intragástrica a ratas Wistar, fue de 0.8872mg de ácido tánico y 1.6820mg de ácido tánico respectivamente, ambos tratamientos se comparan con ratas control, a las cuales se les administró vía intragástrica solución salina al 0.9%. El efecto que se observa en la célula intestinal del duodeno, no representa ningún cambio morfológico evidente, comparado con la muestra control, que demuestre que la célula se encuentre en estado patológico.

## INTRODUCCION

Las leguminosas son caracterizadas por su alto contenido de proteína, en particular el frijol que contiene alrededor de: 26% de proteína en peso seco, 1-2% de extracto etéreo (ácido oleico, ácido linoleico, y ácido linolénico), 7% de fibra cruda en peso seco y 62% de carbohidratos. En cuanto a minerales, contiene: Fósforo, Calcio, Hierro. Vitaminas como: Tiamina, Riboflavina y Vitamina K. En el caso del contenido de aminoácidos, es deficiente en azufrados, como la metionina, pero son ricos en lisina. (Bressani 1980)

La utilización biológica de las semillas de leguminosas, se encuentra limitada debido a la presencia de factores antinutricionales como los taninos que son compuestos pertenecientes a la familia de los polifenoles, los cuales poseen la característica de interaccionar con las proteínas y enzimas digestivas, disminuyendo así, el valor nutritivo del alimento ingerido, esto es porque impiden que se lleven a cabo las etapas de la digestión, por afectar la biodisponibilidad de los nutrimentos para que sean absorbidos y utilizados adecuadamente, (Carmona et al.1991). Aunado a esto, los taninos forman complejos con los iones de metales divalentes como es el fierro, lo que trae como consecuencia una baja disponibilidad biológica de estos metales (Bos 1988)

Los taninos tienen la habilidad de formar complejos con minerales esenciales, proteínas y carbohidratos, disminuyendo así el valor nutricional del alimento ingerido (Nacz 1997).

Algunos autores consideran que los taninos, no se destruyen por calor, es decir son termoestables (Liener 1980), sin embargo, existen muchos otros que afirman lo contrario (Kumar 1984; Bressanni 1980) esta diferencia puede deberse a las condiciones de experimentación a las que son sometidos las leguminosas para su cocimiento.

En cuanto al sorgo, es uno de los principales cereales producidos en el mundo, tiene mucha demanda para consumo animal, por ejemplo, para el ganado bovino. Contiene alrededor de un 10% proteína en base seca. Es deficiente en lisina, como todos los cereales.

El sorgo y el frijol, poseen pigmentos fenólicos, que son los taninos, que les proporcionan el color característico, dependiendo de la variedad.

En la actualidad, debido a la gran variedad de polifenoles que existen en los alimentos, su extracción y cuantificación es variable. De manera, que el método a utilizar debe cumplir los requerimientos para alcanzar una extracción de taninos de las semillas de un 95% a un 100%. Algunos autores han utilizado metanol al 80% en HCl al 1%, aún cuando la extracción es buena, los tiempos de extracción son largos, y los taninos son inestables en medios ácidos, aunado a esto, el método de cuantificación no siempre es el mismo, mientras que con Dimetilformamida al 75% el tiempo de extracción se reduce y los taninos son considerados estables en este disolvente y el método de determinación de taninos siempre es el mismo que se utiliza en conjunto con este disolvente.

La cuantificación de polifenoles en granos, es problemático, debido en parte, a la diversidad de métodos empleados y a la presencia de muchos factores que intervienen.

Desde el punto de vista biológico, los taninos provocan una reducción de la ingesta del alimento, (Kumar 1984) y además una reducción de la digestibilidad de la proteína en una dieta con alto contenido de taninos, que puede ser explicado por medio de la inhibición de las enzimas digestivas, debido en parte, a su parecido químico con el sustrato. (Bressani 1979).

Se han reportado que los niveles de taninos requeridos para rechazar el alimento en animales es de 20mg/g de materia seca (en plantas) (Kumar 1984). Además se han observado cambios degenerativos en el intestino, hígado, bazo y riñón. (Kumar 1984; Gupta et al.1977), y constipación fatal (Lohan et al.1979; Kumar. 1984) ambos casos, en estudios realizados con animales.

Se ha demostrado que no existen cambios ultraestructurales en mucosa intestinal, con una dieta de 500g de haba cocida /Kg de dieta a pollos (Rubio 1988). Existe poca información relacionada con los efectos de los taninos sobre la mucosa intestinal en modelos biológicos de animales ya que hasta el momento, no se han realizado estudios que demuestren algún cambio ultraestructural en mucosa intestinal de rata, ocasionado por los taninos propios del Frijol Negro Cocido (*Phaseolus vulgaris*), equivalente a una ración de frijol diaria consumidos por una persona adulta. Por tal motivo uno de los principales objetivos de este trabajo fue estudiar este efecto en ratas aprovechando que actualmente la microscopía electrónica es un método morfológico que juega un papel importante en el conocimiento de la ultraestructura celular y que ha permitido describir detalladamente los distintos organelos y estructuras que constituyen a las células, (González 1996), conocimientos que han sido fundamentales en el planteamiento de experimentos que investigan las modificaciones que sufren las estructuras celulares bajo condiciones experimentales ó patológicas, así como la función celular.



## OBJETIVOS

### A) Objetivos Generales.

- Comprobar si el método ISO 9648-1988, de determinación de taninos en sorgo, es aplicable para leguminosas.
- *Averiguar si por medio de observaciones de microscopía electrónica del epitelio intestinal de rata, es posible encontrar cambios morfológicos provocados por los taninos del frijol negro cocido.*

### B) Objetivos Específicos

- Obtener la extracción de taninos de las semillas de leguminosas lo más cercano a un 100%, con *Dimetilformamida al 75%*.
- Hacer comparativa la dosis de taninos administrada a las ratas, al consumo y preparación casero del frijol negro, por una persona adulta.
- Evaluar e interpretar la ultraestructura de la mucosa intestinal de duodeno de rata, después de los tratamientos efectuados, por vía oral con ácido tánico y taninos extraídos del frijol negro cocido, en comparación con las ratas control

# I. ANTECEDENTES

## 1.1 LEGUMINOSAS Y SU DIGESTIBILIDAD

Uno de los mayores problemas presentes en leguminosas, es la presencia de algunos factores antinutricionales, tales como son los taninos, que al unirse a las proteínas disminuyen su digestibilidad, es decir, interfieren en la biodisponibilidad de los nutrimentos para que sean absorbidos y digeridos. La digestibilidad de la proteína está relacionada con varios factores que incluyen:

1. La presencia de factores antinutricionales como inhibidores de tripsina y amilasa y compuestos hemaglutinantes, los cuales se destruyen por calor.
2. La presencia de taninos, de los cuales su función y unión a proteínas no es muy bien conocida. Unos autores sugieren que son termoestables, y otros aseguran que no lo son en su totalidad.

*Bressani et al. (1980)*, sugiere que el porcentaje de digestibilidad varía en una semilla cruda y en una cocida. Se realizó este análisis en frijol negro y frijol blanco, para comparar el efecto que pudiera tener el color de la testa, y obtuvo los siguientes resultados

**% de digestibilidad in vitro de proteína de dos variedades de frijol.**

	<b>CRUDO</b>	<b>COCIDO</b>
<b>FRIJOL NEGRO</b>	41.1% – 55%	68.1% - 80%
<b>FRIJOL BLANCO</b>	42.7% - 52%	74.9% - 91%

La diferencia entre las muestras crudas y cocidas es debido a la presencia de inhibidores de tripsina y compuestos hemaglutinantes. Lo anterior también demuestra que el frijol blanco, es más digerible que el frijol negro, lo que sugiere que los pigmentos de la testa son los responsables de las diferencias de la digestibilidad. Si la

testa contiene los fenoles ó taninos, estos bien pueden reaccionar con la proteína y disminuir su digestibilidad. También es importante considerar el tiempo de almacenamiento del grano, (*Benninger et.al. 1998*) sugiere que algunos flavonoides responsables del oscurecimiento de la testa del grano conforme aumenta el tiempo de almacenamiento, son los responsables, de que el tiempo de cocción aumente y la digestibilidad disminuya.

### 1.1.1 Taninos en Frijol Blanco y frijol Negro

El contenido de taninos en el Frijol varía según el color de la testa, la variedad, tipos de polifenoles que se encuentran en el grano, pero también varía dependiendo del método utilizado para su cuantificación, y del método de extracción. Uno de los mayores problemas, es la falta de un método cuantitativo estándar adecuado, existe mucha información bibliográfica acerca de las metodologías para determinar taninos, muchas de las cuales presentan interferencias en su determinación, aunado a la falta de un estándar de referencia adecuado para la gran diversidad de polifenoles en los alimentos.

Algunos autores han reportado que el contenido de taninos en frijol es el siguiente. para el frijol blanco va de un 0.34% a un 0.42% y para el frijol negro: 0.57% a un 1.15%; con el método Folin- Denis de un 0.5% - 1.55%; con el método ISO de un 0.01% - 0.78% y de un 0.06% - 1.31% con el método de Vainillina, (*Bos 1988*). Como se puede observar, existe mucha diferencia en la concentración dependiendo del método utilizado

Las concentraciones de taninos son más altas en frijol negro en comparación con el frijol blanco. *Chang (1994)* sugiere que entre más oscura sea la testa del grano, mayor es la concentración de taninos, por lo que su contenido en las semillas y plantas está relacionado en forma directamente proporcional con el color de la testa (*Hill et.al. 1998*).

## 1.2 TANINOS

El término tanino, se refiere originalmente a las sustancias que tienen la habilidad de curtir pieles, esto es debido a la propiedad general de los fenoles, de unirse y precipitar ciertas proteínas, en donde convierte a las fibras de colágeno, presentes en la piel, en estructuras impenetrables a ataques microbianos, haciéndola resistente a la degradación en condiciones extremas de humedad y temperatura, fundamentos del curtido de la piel. Son los causantes de la sensación astringente producida al ingerir fruta verde, vino tinto ó té, debido a la formación de enlaces cruzados entre las proteínas ó glicoproteínas de la saliva y los taninos, y como consecuencia de esto se produce una pérdida de lubricación en la boca (*Lidner, et al, 1995*).

Los taninos se encuentran en una amplia gama de plantas, algunas comestibles, frutas, sorgo, leguminosas (chícharos, habas, frijoles) y té (*Naczka, et. al, 1994*).

Así como disminuyen el valor nutricional del alimento ingerido debido en parte a la afinidad de los taninos por las proteínas, pueden otorgar beneficios a la industria y a la salud, aprovechando ésta y otras propiedades que poseen los fenoles.

En cuanto a los beneficios que otorga a la salud, se aprovecha su propiedad basada en la afinidad de los taninos por las proteínas, el consumo de algunas bebidas, tales como el vino tinto, y el té, han sido asociados con una disminución en la incidencia de problemas cardíacos y cáncer, la capacidad antioxidante de los taninos, es aprovechada en este caso, para neutralizar los radicales libres (*Prior et.al. 1998.*), (*Velioglu. et.al.1998*).

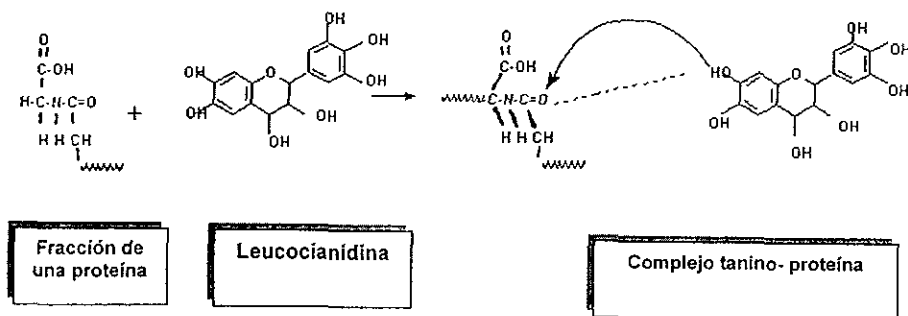
En cuanto a la industria, son utilizados para la producción de algunas bebidas, tales como la fabricación de vinos, empleados principalmente en el proceso de clarificación, fundamento que se basa en la misma propiedad de los taninos: su afinidad por las proteínas y su capacidad para precipitarlas.

Debido a su propiedad de astringencia pueden proporcionar una protección a las plantas directamente en contra de predadores como son: mohos, bacterias, insectos, pájaros, de ahí que en el campo agrícola, los consideren como pesticidas biológicos.

### 1.2.1 Composición química.

Químicamente los taninos son compuestos orgánicos, no nitrogenados, heterogéneos, (Porter 1989), que van desde monómeros hasta polímeros.

Son compuestos de alto peso molecular que van desde 500 – 3000 Daltons (Hagerman, et, al. 1998). Además contienen una gran cantidad de grupos hidroxilo, los cuales sugieren, que son los responsables de la interacción con las proteínas y otras moléculas, entre ellas se encuentran alcaloides, gnetina y otras proteínas, mediante un mecanismo que implica la formación de puentes de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carbonilo del enlace peptídico de las proteínas y los grupos hidroxilo de los polifenoles. Estos tipos de enlaces se forman en diferentes sitios de la superficie de la proteína.



Se diferencian de los demás compuestos fenólicos simples y de las flavonas, (los cuales no interfieren en la calidad nutricional del alimento), por su peso molecular alto, y por su gran cantidad de grupos hidroxilo (Griffits, 1986).

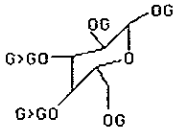
Son altamente solubles en agua.

### 1.2.2 Clasificación.

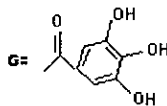
Los taninos se clasifican en 2 grupos:

**A) Taninos hidrolizables.** – Su estructura consiste en un centro de azúcar al cuál se unen moléculas de ácido gálico mediante enlaces éster, formados entre el grupo hidroxilo del carbohidrato y el grupo carbonilo del compuesto fenólico.

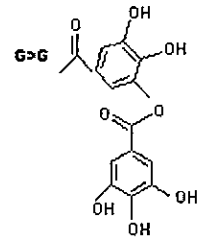
Son poliésteres que resultan fácilmente hidrolizados por ácidos ó enzimas para dar como producto de reacción azúcares ó alcoholes polihídricos y ácido fenol carboxílico.



**tanino hidrolizable  
(Polygalloyl  
glucosa)**



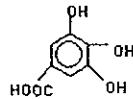
**Ácido gálico**



**Ácido gálico  
esterificado**

Se subdividen en:

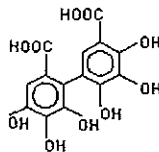
- ❖ **Galotaninos.** – da como producto de hidrólisis el ácido gálico como único compuesto fenólico, más el azúcar con el cual forman el glucósido.



**Ácido Gálico**

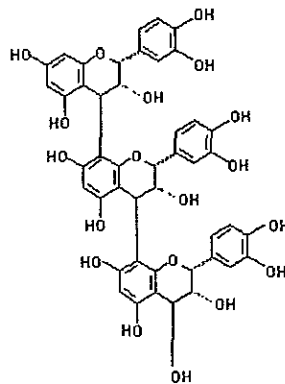
Su principal representante es el Ácido tánico, el cual es una mezcla de derivados de ácido gálico. Está compuesto por 21% ácido gálico, 7% ácido m-digálico, 3% pentagalol-glucosa, 1% ácido trigálico, y el resto en forma de glucósido como galotanino (*White 1958*).

- ❖ **Elagitaninos.** – da como producto de hidrólisis el ácido hexahidroxidifénico.



**Ácido Hexahidroxidifénico**

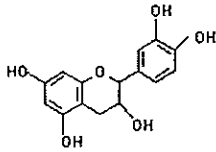
**B) Taninos condensados.** – Son flavonoides derivados de la proantocianidina. Polímeros de 2 ó más unidades flavonoides unidas por enlaces carbono-carbono en la posición 4 de una unidad con la posición 6 u 8 de otra adyacente. La estabilidad de estos enlaces es mucho mayor que los enlaces éster de los taninos hidrolizables, por lo que éstos tienen mayor impacto en la nutrición.



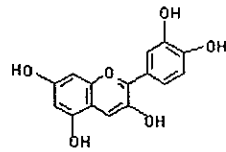
**TANINO CONDENSADO (Procianidina típica)**

Sufren una polimerización por la acción de ácidos fuertes y se basan en parte, en núcleos de flavan 3-ol ó catequinas y flavan 3,4 diol ó leucoantocianidinas. Dependiendo de su estructura química y grado de polimerización pueden ser o no solubles en solventes orgánicos (Trugo.et.al 1998).

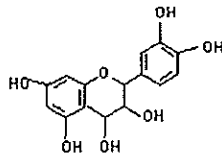




**Catequina**



**cianidina**



**leucocianidina**

La mayor parte del contenido de taninos en las testas de numerosas variedades de frijol están en la forma de taninos condensados, del tipo de proantocianidina (*Tanguy et al. 1977*). Pero ambos grupos están presentes y pueden interactuar con sustratos mediante la formación de puentes de hidrógeno.

### 1.3. DISOLVENTES Y MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE TANINOS

Con respecto a la medición de taninos, los autores han utilizado diversos disolventes para su extracción, aunque cada uno, propone un método diferente de cuantificación. Lo que se expone a continuación es una discusión de los dos disolventes más empleados, además de los métodos de cuantificación, para así poder justificar el porqué del disolvente empleado para la extracción y el método de cuantificación.

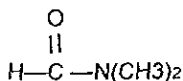
#### 1.3.1 EXTRACCIÓN DE TANINOS

Entre los disolventes que más destacan para su aplicación son los siguientes:

- ❖ Dimetilformamida al 75%
- ❖ Metanol al 80% en HCl al 1%

##### A) Dimetilformamida

La Dimetilformamida al 75% se utiliza para la determinación de taninos de acuerdo al método que se expone en la ISO 9648-1988 (International Standard Organization). Posee la siguiente estructura:

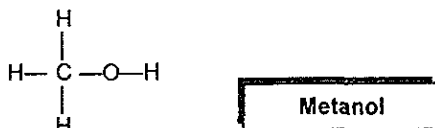


Dimetilformamida

Es un disolvente muy fuerte, muy polar, con una constante dieléctrica alta, aprótico, es decir no tiene grupos OH, ni hidrógenos no ácidos, y lo más importante es que la polaridad de este disolvente deja que éste y el compuesto orgánico, estén juntos en una mezcla de reacción homogénea. Extrae fenoles totales, es decir, taninos hidrolizables y condensados.

## B) Metanol al 80% en HCl al 1%

De acuerdo con (Makkar *et.al* 1993), los taninos se extraen usando solventes acuosos y orgánicos, principalmente metanol y acetona. Químicamente el metanol es un disolvente orgánico de bajo peso molecular, con la propiedad de disolver azúcares, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos de bajo peso molecular.



El metanol se ha usado de varias formas: como metanol puro y como metanol al 80% en HCl al 1%. Carmona *et.al* (1991), establece que con metanol al 100% no existe un incremento en los taninos extraídos conforme aumenta el tiempo, mientras que con metanol al 80% en HCl al 1% se obtienen mejores rendimientos en su extracción, en comparación con el mismo tiempo empleado para metanol al 100%, pero, su *desventaja consiste en que si se aumenta el tiempo de extracción* (tiempo promedio de 24h), puede haber destrucción de taninos, debido a la presencia de HCl, es por eso que se considera que los taninos no son muy estables por largos periodos de tiempo, en este tipo de soluciones.

Una consideración importante para una buena extracción, es que los extractos, deben estar recién preparados, para evitar cambios en los taninos debido a que se encuentran en soluciones viejas, en donde el cambio más evidente es la oxidación (Price *et.al* 1978).

Carmona *et.al* (1991) verificó la eficiencia de diferentes solventes empleados para la extracción de polifenoles presentes en frijol blanco, frijol negro, sorgo de alto y bajo contenido de taninos y los resultados que obtuvo son los siguientes

SOLVENTE a	POLIFENOLES (mg ácido tánico/g harina (b))			
	FRIJOL BLANCO	FRIJOL NEGRO	SORGO (bajo contenido de taninos)	SORGO (alto contenido de taninos)
Metanol al 80% en HCl al 1%	0.54 +/- 0.03	2.48 +/- 0.03	1.20 +/- 0.05	7.21 +/- 0.09
Metanol	0.28 +/- 0.04	1.31 +/- 0.03	0.72 +/- 0.03	4.40 +/- 0.09
Etanol al 60%	0.12 +/- 0.02	0.78 +/- 0.03	0.43 +/- 0.04	2.70 +/- 0.07
Agua	0.08 +/- 0.01	0.44 +/- 0.03	0.29 +/- 0.03	1.13 +/- 0.04

a) 1g de harina se extrae con 10ml del solvente por 24h a 25°C.

b) El contenido de polifenoles se determinó por medio del método de Azul de Prusia. (Price 1977).

Existe un incremento en la concentración, por medio de la extracción con metanol al 80% en HCl al 1%, en comparación con todos los demás disolventes, efecto evidente en las cuatro muestras analizadas

### 1.3.2. EFECTO DEL CONTENIDO DE AGUA JUNTO CON EL DISOLVENTE DE EXTRACCIÓN.

Naczk (1994) estudió el efecto que tiene el contenido de agua junto con el disolvente, en el porcentaje de recuperación de taninos, y es muy notorio que con el uso de disolventes puros, el porcentaje de recuperación es nulo, para algunos disolventes. Un 30% de agua es el más recomendable para obtener los mejores rendimientos.

**Efecto del contenido de agua junto con el disolvente en la recuperación de taninos (mg catequinas equivalentes/100g materia seca de semilla de canola.**

Contenido de agua (%v/v)	Metanol	N,N,dimetilformamida
0	35.1	0
10	87.3	242.2
20	190.0	331.4
30	241.8	321.3
50	234.9	—

Debido, a las limitaciones que implica el uso de metanol al 80% en HCl al 1% como son el tiempo de extracción, e inestabilidad de los taninos en el HCl, no resulta muy confiable el uso de este disolvente para fines prácticos a nuestras necesidades. Debido a esto, un 75% de Dimetilformamida es el más eficiente para una buena extracción

### 1.3.3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE TANINOS

Se han encontrado una gran diversidad de métodos de cuantificación de taninos, la mayoría de ellos no son específicos y no tienen la capacidad de distinguir entre los taninos y polifenoles de bajo peso molecular, los cuales no afectan la calidad nutricional de los alimentos (*Carmona et.al. 1991*).

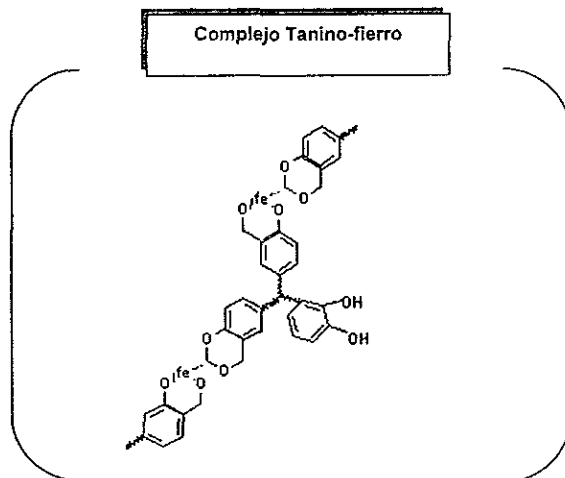
En este caso es importante tomar en cuenta que cada tipo de tanino responde de manera diferente para cada determinación, esto es por la gran diversidad que existe en su estructura química. Debido a esta variabilidad se hace difícil el asumir que con el uso de un método, se asegure que se está determinando el contenido total y absoluto de compuestos fenólicos. En lugar de esto los métodos deben emplearse para determinar el contenido de taninos de una manera cuantitativa ó cualitativa.

En general los métodos empleados para el análisis del contenido de taninos se basan en las reacciones de los fenoles, como son: precipitación de proteínas, reacciones con los grupos funcionales ó análisis por HPLC.

#### A) METODOS PARA FENOLES TOTALES.

- ❖ **Azul de prusia.** – método colorimétrico basado en los principios de oxidación-reducción en donde el fenol es oxidado y el reactivo es reducido, existe una reducción del ion férrico a ion ferroso por la presencia de taninos y otros polifenoles, seguido por la formación de un complejo colorido de ferrocianuro-ferroso conocido como Azul de Prusia. Su desventaja consiste en que no diferencia los taninos de otros polifenoles (*Price 1977; Makkar et.al 1987*), por ejemplo: grupos no fenólicos como el ácido ascórbico son fácilmente oxidados dando valores no reales. A pesar de su baja especificidad, es un método simple, económico y reproducible.
  
- ❖ **Folin Denis.** -- método colorimétrico basado en la reducción del ácido fosfotungstomolibdico por los taninos en solución alcalina, dando como producto de la reacción una solución colorida azul oscuro Su desventaja consiste en la formación de precipitados que interfieren en la determinación espectrofotométrica.
  
- ❖ **Complejos ion metal-fenol.** – método basado en la formación de un complejo colorido entre el ion metal y el grupo fenólico. Método útil para la determinación de cualquier grupo fenólico, y no se sabe mucho acerca de la interferencia de grupos no fenólicos. Es rápido y confiable.

El método ISO 9648:1988, que pertenece a esta clasificación se basa en la reducción del ion férrico debida a los polifenoles con la posterior formación de un complejo colorido en condiciones alcalinas, cuantificado espectrofotométricamente a  $\lambda=525\text{nm}$ .



## B) MÉTODOS DE PRECIPITACIÓN.

Muchos métodos de determinación se han desarrollado, basados fundamentalmente en la propiedad que tienen los taninos de precipitar proteínas. Por lo general estos métodos discriminan entre los taninos y los fenoles no taninos, pero no permite una determinación de los diferentes tipos de taninos.

La mayoría de estos métodos son muy sensibles a las condiciones de reacción, es decir, la cantidad de proteína precipitada, por una determinada cantidad de taninos, dependerá de varios factores tales como:

- pH (*Hagerman, 1978*).
- Presencia de un solvente orgánico (*Hagerman, 1987*).
- La fuerza iónica (*Martin, et.al. 1985*).
- Tiempo transcurrido para la precipitación (*Hagerman, 1987*).

Debido a que la interacción entre el tanino y la proteína es muy poco específica, cualquier cambio estructural en el tanino ó en la proteína, puede alterar la estequiometría y la solubilidad del complejo formado (*Hagerman 1987*).

### C) MÉTODOS CON GRUPOS FUNCIONALES.

Estos métodos dependen de la reactividad química específica de un grupo funcional característico de un tipo de tanino. Estos métodos son muy específicos, y proporcionan información cuantitativa y cualitativa de los taninos encontrados en una muestra. Su desventaja, es que requiere mucho tiempo, aparatos especializados, para la identificación de la estructura química de los taninos en estudio.

### D) MÉTODOS PARA TANINOS CONDENSADOS.

- ❖ Prueba de la vainillina. –método para la determinación de proantocianidinas. Aldehídos aromáticos como la vainillina, reaccionan con los fenoles meta-sustituídos para obtener una gran cantidad de productos conjugados coloridos. Sin embargo la interpretación de los resultados es difícil, debido a que la vainillina reacciona con flavonoles que no son taninos



Otro problema adicional es la sensibilidad de la reacción, ante la presencia de trazas de agua, que limitan la utilidad del método (*Price 1978*). Éste método debe usarse cuidadosamente para extractos de frijol crudo, debido a que los compuestos no tanínicos inhiben la formación del complejo vainillina-tanino, y da falsos negativos (*Carmona et.al.1991*).

- ❖ **Butanol HCl**. –método simple, específico para la determinación de proantocianidinas. Se basa en el desdoblamiento oxidativo del enlace interflavan, en soluciones alcohólicas, para obtener la antocianidina. Las condiciones de reacción deben de ser controladas cuidadosamente, por ejemplo, trazas de hierro catalizan la reacción, mientras que la presencia de agua, la inhiben (*Porter 1986*). La respuesta depende de la estructura del tanino. Este método resulta satisfactorio para la determinación de taninos condensados en presencia de taninos hidrolizables. Aunque los fenoles que no son taninos no interfieren en la determinación con este método, las antocianidinas y otros pigmentos, sí pueden hacerlo.

Se recomienda que además de los métodos anteriores, el estudio se complemente con el uso de la resonancia magnética nuclear (NMR), y la espectroscopía de masas, para el análisis de las proantocianidinas, pero aún así el espectro de los taninos condensados poliméricos es difícil de interpretar (*Porter.1989*). Para conocer el grado de polimerización de los flavonoles y su composición, se recomienda el uso del HPLC (*Williams,et.al.1993*).

## E) MÉTODOS PARA TANINOS HIDROLIZABLES.

- ❖ Ensayo con iodato. – se basa en la reacción del iodato de potasio con los esteroides del galato para dar un compuesto colorido. (Bate 1977). La química de la reacción es poco conocida. No se recomienda el uso de este método en muestras que contengan mezclas complejas de taninos, porque dan un color que no es característico para su medición.
  
- ❖ Ensayo con ácido nítrico. – permiten la estimación de galotaninos y elagitaninos en mezclas (Wilson 1990). La determinación del ácido fenólico se basa en la hidrólisis del tanino. La hidrólisis ácida debe ser llevada a cabo en ausencia de oxígeno, por ser el ácido gálico sensible éste. Es un método muy selectivo, permite la determinación de las formas esterificadas del ácido específico de interés, pero, desafortunadamente la hidrólisis de la muestra es difícil e inconveniente para una cantidad grande de muestras, además, los resultados no proporcionan información acerca del grado de esterificación ó de la estructura del tanino. El grado de esterificación puede ser conocido con el uso del HPLC en fase normal ó en fase reversa (Beasely, et.al.1977)

### 1.4 ¿TANINOS TERMOESTABLES Ó TERMOLÁBILES?

Según los estudios realizados, en cuanto a la remoción de taninos, se ha encontrado que el remojo, lavado y cocimiento con agua, remueve alrededor del 80% de los taninos en semillas (Kumar 1984.). Pero la materia seca pierde un 18 – 23%, el cual puede acarrear nutrimentos solubles en agua. Así mismo Price et.al. (1980), demostró que el calentamiento del sorgo con alto contenido de taninos en agua, no refleja cambios en su calidad nutricional, lo cual puede ser debido a la incapacidad de extracción en agua que poseen los taninos condensados.

*Bressanni* (1980) reportan una pérdida de taninos contenidos en el frijol (judía), debido a la solubilización de los compuestos fenólicos presentes en la testa en el agua de cocimiento (*Ologhobo et.al.1998*).

*Barroga .et. al (1985)* demuestran que un remojo en agua del garbanzo (*Vigna radiata*), reduce el contenido total de polifenoles de un 24 a un 50%, esto aunado a un cocimiento en agua por 30min llega a una reducción del 73%, además menciona que la mayoría de los polifenoles removidos corresponden a la parte de la testa del grano.

*Chang (1994)* sugiere que el calentamiento de las semillas del garbanzo en agua por 30 minutos, puede remover de un 38% a un 76% de los taninos presentes, dependiendo del cultivo y su madurez.

*Nehad (1990)* sugiere que un remojo de la semilla de haba y posteriormente un cocimiento disminuye el contenido de taninos en un 64.76% - 78.88%.

Pero así como existen algunos autores que han demostrado lo anterior, existen algunos otros que demuestran totalmente lo contrario. *Valverde et. al. (1994)* demostró que el remojo y cocimiento de las lentejas en diferentes soluciones (agua destilada, ácido cítrico y bicarbonato de sodio), específicamente en agua, aumenta el contenido de taninos, la explicación que se da a esto es que los taninos en la semilla cruda pueden estar formando complejos con proteínas ó carbohidratos, de manera que con el remojo y el cocimiento se rompen estos complejos, por lo que el contenido de taninos aumenta, mientras que la relación taninos/catequinas disminuye.

*Bate (1975)*, demostró que los taninos condensados como la procianidina no puede ser extraída con agua debido a que es insoluble.

Ha habido progresos significativos para remover los taninos de los alimentos, en los presentes años. Pero, al parecer en algunos aspectos para su aplicación en el campo económico, hace más difícil la tarea de desarrollarlas, en primer lugar, los reactivos resultan costosos para los agricultores, y en segundo lugar la pérdida de materia seca durante el proceso de remoción, no resultaría de interés económico para la industria.

## 1.5. EFECTO DE LOS TANINOS UTILIZADOS COMO PARTE DE UNA DIETA

Los taninos se combinan rápidamente formando complejos con las proteínas de la dieta, proteínas salivales, carbohidratos, iones metálicos di o trivalentes, enzimas digestivas (amilasas, proteasas, lipasas), por lo que pueden afectar el metabolismo digestivo, ocasionando diarrea ó constipación, pero, se cree que la adición de un complemento alimenticio, puede evitar las reacciones provocadas por la presencia de los taninos (*Kumar 1984*).

Según los estudios realizados los taninos como parte de una dieta provocan:

**1.5.1. Disminución en la ingesta del alimento.** – desde el punto de vista biológico, es mentira que los taninos posean la efectividad de ser repelentes de predadores, animales ó microbios, en todo caso, la propiedad relevante de astringencia que poseen los taninos (*Bate 1973, 1981*), hace que el tejido tenga mal sabor, porque precipita las proteínas salivales ó inmoviliza enzimas, que impiden la invasión del tejido por plagas. Este mal sabor causado por la astringencia, provoca una reducción en la ingesta del alimento, basado en estudios realizados, en donde se comparan los efectos en la cantidad ingerida de alimento de una dieta con alto contenido de taninos y una dieta con bajo contenido de taninos (*Kumar 1984; Donnelly 1954*).

**1.5.2 Efecto en la digestibilidad.** - la reducción en la digestibilidad de una dieta con un alto contenido en taninos, puede ser explicada por medio de los fundamentos básicos de inhibición de enzimas digestivas (*Bressanni 1979*). Los taninos se consideran inhibidores potentes de enzimas digestivas debido a su capacidad de unirse con las enzimas de las proteínas de una manera similar a la que se unen con el sustrato. El mecanismo exacto aún no se conoce, debido en parte a la complejidad en su estructura y a la gran variedad de taninos que existen. Pero ha habido diferentes propuestas para esto.

*Sotelo et.al. (1983)* propone que por medio de una administración intragástrica de frijol negro cocido a ratas, no se presentan cambios ultraestructurales en mucosa intestinal (duodeno) e incluso, cuando se administra una dosis de leche, después del tratamiento anterior, son visibles vacuolas que demuestran la absorción de la leche.

Los taninos residuales después de la cocción de 5 diferentes semillas soya, garbanzo, frijol lima y chícharo), no tienen ningún efecto en la digestibilidad de la proteína en jejunio e íleon, por lo que sugiere que otros factores son los responsables de la disminución en la digestibilidad, el único cambio evidente es un ligero hinchamiento de las mitocondrias, pero que no representa ningún cambio morfológico (*Ologhobo 1998*).

Así mismo, se ha encontrado que los taninos tienen una influencia importante en el metabolismo digestivo en general. Como ejemplo, podemos mencionar algunas:

**1.5.3. Inhibición en la hidrólisis enzimática de la celulosa** por medio de un extracto acuoso de hojas de *S. Lespedeza*, (*Kumar 1984, Cope et.al. 1971*) La reducción de la actividad de la celulasa, es proporcional a la concentración del inhibidor presente, en la cual, se encontró una fracción de taninos.

**1.5.4. Disminución en la digestibilidad de la proteína del cacahuete.** La proteína del cacahuete, no es disponible biológicamente, en el estómago de chivo por la adición de ácido tánico (*Kumar 1984; Tripathi 1978*).

**1.5.5. Dieta con frijol negro cocido.** En dietas administradas con frijol negro cocido, más un 2.5% y 3% de ácido tánico añadido, demostraron una marcada inhibición in vivo de la absorción intestinal para transportar galactosa y leucina. Los taninos se acomplejan con las proteínas de la mucosa intestinal lo que dificulta la absorción de los nutrimentos. El mecanismo exacto aún se desconoce (*Santidrián 1989*).

**1.5.6 Efecto en ratas.** Existe una inhibición del crecimiento en ratas, alimentadas con frijol negro cocido más una cantidad conocida añadida de ácido tánico y con frijol crudo, el mecanismo involucrado aún se desconoce, pero se proponen dos razones que dan origen a esto:

- ❖ La administración de ácido tánico a ratas en crecimiento causa una reducción del transporte intestinal de azúcares y aminoácidos (*Motilva et.al 1983*), este efecto implica una disponibilidad baja de los nutrimentos, que se refleja finalmente en una disminución en el crecimiento y peso.
- ❖ La administración de semillas crudas como parte de una dieta a animales y como fuente de proteína a ratas, refleja cambios como: una reducción de la síntesis de proteína del músculo (*Goena et.al 1984*); acompañado de un incremento en el tamaño del hígado y el catabolismo de la proteína del músculo (*Santidrian et.al 1986*). Tomando en cuenta que la musculatura representa una porción importante en el cuerpo, puede explicarse la pérdida de peso y crecimiento en ratas, causada por la ingesta de semillas crudas (que contienen además otros factores antinutricionales que pueden destruirse por calor)

Los taninos inhiben la acción de muchas enzimas, y una dieta rica en tanino interfiere en la digestión pancreática y produce una irritación del tracto digestivo (*Muller, 1990*).

## 1.6. EFECTOS BENÉFICOS DE LOS TANINOS.

También resulta de interés resaltar que en algunos casos los taninos ingeridos como parte de una dieta otorgan beneficios, aprovechando su propiedad de formar complejos con las proteínas, pueden protegerse de la degradación en el rumen, esto es, con la formación del complejo tanino- proteína, en el intestino delgado se digiere y se hace disponible para el animal. (Marquardt *et al.* 1988) (Hill *et al.* 1998), o pueden ser de utilidad en enfermedades relacionadas con altos niveles de proteína.

Debido a su gran cantidad de grupos hidroxilo, son considerados antioxidantes naturales, porque poseen la capacidad de interactuar con los radicales libres que pueden existir en el organismo, previniendo así enfermedades como el cáncer y la arteriosclerosis, efecto que pudiera ser mediado por la acción quelante del hierro, inhibiendo la formación de radicales libres en la etapa de iniciación de la oxidación, ó interrumpiendo la etapa de propagación (Haggermann *et al.* 1998).

## 1.7. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La microscopía electrónica es un método morfológico que juega un papel muy importante en el conocimiento de la ultraestructura celular (González 1996). El fundamento de la microscopía electrónica, es que se aplica un flujo de electrones a la muestra, la imagen se forma por la dispersión diferencial de electrones, a su vez, el microscopio electrónico por un sistema de visualización convierte la radiación invisible en radiación visible en una placa fotográfica.

La complejidad del microscopio electrónico se debe a que necesita una serie de aparatos y dispositivos auxiliares para su funcionamiento.

### 1.7.1. DESCRIPCIÓN

Consta principalmente de:

#### A. Columna principal

- ❖ **Sistema de iluminación.** - suministra el haz electrónico que va a pasar por todos los demás sistemas ópticos.
  - ◆ Cañón de electrones. – genera el flujo de electrones con la velocidad y dirección adecuada.
  - ◆ Condensador. – permite un enfoque adecuado del haz y una iluminación correcta.
  
- ❖ **Sistema de formación de imagen.** – forma una imagen ampliada del objeto. Consta de:
  - ◆ Lente objetivo. – forma la imagen intermedia de la parte del objeto irradiada por el haz de electrones.
  - ◆ Lente intermedia. – se obtienen variaciones en el aumento de la imagen.
  - ◆ Lente proyectora. – proyecta la imagen intermedia con mayor aumento sobre la pantalla
  
- ❖ **Sistema de registro y observación.** – la formación de la imagen se debe a la diferencia en el contraste, es decir, la imagen se forma por la dispersión diferencial de los electrones y debido a que las imágenes electrónicas no son visibles al ojo humano, el microscopio electrónico requiere un sistema de visualización que convierta la radiación electrónica invisible en radiación visible, lo cual se logra con una pantalla fluorescente, o por medio de una impresión en una placa fotográfica.



**B. Sistema de vacío** – como los electrones pueden reaccionar fácilmente con las moléculas del aire que los rodea, se deben extraer los gases contenidos en la columna del microscopio electrónico para evitar que se formen reacciones ionizantes y para prevenir la oxidación, para lo cual se ejerce una presión de  $10^{-3}$  mmHg para evitar estos problemas.

**C. Fuente de poder.** – requiere de una alta tensión de 20 – 125Kv.

**D. Sistema de manejo.** – el tipo y número de botones varía según el modelo del microscopio electrónico, pero en general deben de controlar lo siguiente:

- ❖ **Interruptor general.** – conecta el sistema de suministro de energía eléctrica.
- ❖ **Refrigeración** – controla válvulas, llaves y bombas que permiten la circulación de agua.
- ❖ **Vacío.** – ponen en marcha las bombas y válvulas de control.
- ❖ **Interruptor de alta tensión.** – conecta el alto voltaje al cañón de electrones
- ❖ **Filamento.** – ajusta la corriente para el calentamiento del cátodo.
- ❖ **Emisión.** – regula el potencial eléctrico del cilindro de Wenhet para regular la intensidad luminosa
- ❖ **Alimentación.** – sitúa en una línea el eje del cañón y de las lentes.
- ❖ **Condensador y objetivo.** – controlan la corriente en cada una de estas lentes.

La mesa ó gabinete contiene los botones de mando de control del foco, magnificación y brillantez de la imagen, medidores de la corriente y el vacío.

### 1.7.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Debido a que los electrones tienen una capacidad de penetración limitada, para poder observar las muestras biológicas con el microscopio electrónico, es necesario obtener cortes ultrafinos, con un grosor máximo de 100nm, para esto, se requiere de un microtomo y además de un procedimiento especial, que implica la fijación, inclusión, corte y contraste de la muestra. A continuación se describe cada uno de los pasos

A. **Fijación.** – El proceso de fijación es, uno de los más delicados, tanto por el hecho de elegir la sustancia fijadora más idónea para el estudio que se pretende realizar, como por la necesidad de reducir al máximo el intervalo de tiempo entre la muerte del individuo y la fijación de las células, ya que su función se centra en preservar las estructuras celulares, con una mínima alteración, de cuando estaba vivo. Inmoviliza las estructuras celulares. Previene los cambios provocados por manipulación, durante el procedimiento de deshidratación, corte e inclusión. Los fijadores químicos comúnmente empleados en la microscopía electrónica, deben ser de tipo aditivo, no coagulantes, porque reaccionan con los radicales de las moléculas orgánicas, proporcionándoles estabilidad química. Los fijadores químicos más usados son:

- ❖ **Glutaraldehído.** – preserva principalmente proteínas.
- ❖ **Tetraóxido de osmio.** – se asocia selectivamente con los lípidos, además de ser un buen contrastante en la preparación porque debido a su alto peso molecular es opaco a los electrones.

La elección del fijador, no depende solamente de la muestra que se va a fijar ó a procesar, también debe reunir otras características como:

- ❖ **Isotónico** con el tejido, para que se eviten choques osmóticos, que puedan provocar una deshidratación, hinchamiento y ruptura de la estructura celular.

- ❖ **Velocidad de penetración alta** para que se permita la fijación rápida de las estructuras celulares, por eso el tamaño de muestra facilita este efecto.
- ❖ **pH constante** durante todo el proceso de fijación, es por eso que se utilizan durante la fijación, soluciones amortiguadoras como fosfatos y cacodylatos por mencionar algunos.

Una buena fijación se logra al considerar otros factores como son:

- ❖ **Concentración del fijador**
- ❖ **Temperatura.** – se realiza entre 0 y  $-4^{\circ}\text{C}$ , porque a ésta temperatura la actividad citolítica es mínima. Se recomienda usar fijadores preenfriados, porque así la fijación se inicia inmediatamente después de que se coloca el tejido junto con el fijador.
- ❖ **Tiempo de fijación.** – se recomienda tiempos de 30 –60min, no tiempos muy largos, porque puede haber una extracción de compuestos orgánicos como proteínas, lípidos ó azúcares.

La inmersión es el método de fijación más común porque se introducen fragmentos de la muestra en el fijador, inmediatamente después de obtener la muestra para evitar degeneraciones antes de la fijación.

- B. Deshidratación.** – se realiza para la eliminación total del agua presente en el tejido, para que la resina que se usara en la inclusión pueda polimerizar sin ningún problema, de lo contrario, se obtendría una muestra con una resina diluida aguada, que no polimeriza bien, lo que repercute en la observación de la muestra.
- C. Inclusión.** – el propósito de la inclusión es manejar el tejido en un medio sólido Las resinas empleadas deben tener la cualidad de penetrar hasta lo más interno de las estructuras celulares. Los medios de inclusión deben dar lugar a una muestra dura y resistente, que no se altere por el bombardeo de los electrones Entre las que más se usan se encuentran:

❖ **Resinas epóxicas** .- Son los medios de inclusión empleados con mayor frecuencia, entre las más usadas se encuentran: Epon 812, Araldita, por mencionar algunas y además poseen ventajas sobre algunas otras, como son:

- ◆ Endurecen de manera uniforme.
- ◆ Enjutamiento total del 2%.
- ◆ Polimerización por medio de calor.
- ◆ No provocan daño por polimerización porque forman polímeros ramificados.
- ◆ Estables al bombardeo de electrones.
- ◆ Se puede regular la dureza del bloque, si se modifica la proporción de la mezcla.

Algunas desventajas del uso de este tipo de resinas son las siguientes.

- ◆ Producen artefactos al realizar los cortes.
- ◆ Es indispensable el uso de sales de metales pesados para lograr el contraste adecuado debido a la falta de contraste entre el epóxido y el tejido

❖ **Poliéster**. – se utilizan principalmente para incluir bacterias, protozoarios, tejidos animales y vegetales. El Vestopal es el más usado por poseer las siguientes características:

- ◆ Alta resolución de observación.
- ◆ Proporción de enjutamiento bajo.
- ◆ Alta estabilidad al bombardeo de electrones.
- ◆ Disminuye el daño por polimerización.

Su desventaja consiste en:

- ◆ Dificultad para obtener buenos cortes, porque es una resina muy dura.

❖ **Medios acrílicos.** – no se usan mucho porque producen artefactos durante el procesamiento. Entendiendo por artefacto, toda aquella alteración no propia del tejido, es decir, aquella que resulta de una mala manipulación durante el procesamiento de la muestra, como puede ser desde una mala fijación, corte, tinción, etc. Como desventajas podemos mencionar que son.

- ◆ Inestables frente al haz de electrones, lo que provoca un colapso de las membranas y la estructura celular.
- ◆ Enjutamiento del 20%, porque ramifica en cadenas lineales.

D. **Corte.** – el grosor adecuado es de 20nm- 100nm en el ultramicrotomo, se utilizan cuchillas de vidrio y de diamante, estas últimas son más duraderas, pero mucho más costosas, y la calidad es muy superior en comparación con las de vidrio. El sistema de avance del ultramicrotomo puede ser mecánico, el cual utiliza tornillos de rosca muy fina que al rotar desplaza el portaespecimen al filo de la cuchilla. El ultramicrotomo lleva una lupa binocular, que permite observar el proceso con mejor amplitud y la recolección de los cortes, así como identificar el grosor, porque dependiendo del grosor será el color del corte por la interferencia de la luz:

- ❖ Corte dorado. – grosor de 90-150nm.
- ❖ Corte gris. – grosor de 60-90nm.
- ❖ Corte incoloro ó plata brillante. - grosor menor de 60nm. (ideal para el microscopio electrónico de transmisión).

Los cortes obtenidos en el ultramicrotomo se recogen por flotación en el agua destilada, contenida en el pocito. Los primeros cortes que se obtienen son los semifinos ( mayor a 90nm) y los que se montan en el portaobjetos para ser teñidos con Azul de Toluidina y observarlos en el microscopio óptico, estos se usan como control para seleccionar la zona del espécimen a estudiar en el microscopio electrónico. Una vez elegida la zona se hacen los cortes ultrafinos ( menor a 90nm) y se colectan sobre una rejilla de cobre de 3mm de diámetro que sirve como soporte a las muestras.

E. **Contraste.** —el microscopio electrónico forma la imagen debido a la dispersión que sufren los electrones al interaccionar con los átomos de la muestra. Para contrastar mejor las muestras es necesario aumentar la densidad de las mismas y lograr un contraste de imagen, proceso mejor conocido como tinción, se utilizan sales de metales de peso atómico alto. Estas sustancias se depositan sobre las estructuras celulares, lo que aumenta su capacidad de dispersar los electrones, porque aumenta el contraste. Se usan sales de plomo, vanadio, uranio, plata.

- ❖ **Tinción positiva.** — el método mas empleado es el de doble contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. El ión uranilo aumenta el contraste de cromosomas, nucleolo y ribosomas, debido a que es más específico en la formación de enlaces químicos con estructuras que contienen ácidos nucleicos. El plomo es un poco más selectivo para las estructuras proteicas.
- ❖ **Tinción negativa** — para observar partículas aisladas, virus, y organelos celulares, porque permite observar detalles externos de la muestra de hasta 10 A° porque el colorante se deja secar sobre la muestra y se deposita sobre las rugosidades de la superficie de la muestra. Se usa Acetato de uranilo y ácido fosfotúngstico.

(González Morán 1996)

## II. METODOLOGÍA

El trabajo se divide en dos partes: la primera, corresponde a la medición del contenido de taninos, y la segunda parte corresponde a la observación del epitelio intestinal de ratas a las que se les administró taninos y extracto de taninos del frijol negro cocido.

### 2.1. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE TANINOS.

#### 2.1.1 Reactivos

- ❖ SOLUCIÓN DE DIMETILFORMAMIDA AL 75%. – Se miden en una probeta 75ml de dimetilformamida y se transfieren a un matraz aforado de 100ml limpio y seco. Diluir con agua desionizada, dejar enfriar y llevar a la marca del aforo.
- ❖ ÁCIDO TÁNICO. – se prepara una solución estándar de referencia de ácido tánico que contenga 0.2g/100ml. Se pesan 0.2g de ácido tánico, y aforar a 100ml con agua desionizada.
- ❖ CITRATO FÉRRICO DE AMONIO. – el contenido de hierro debe estar entre el 17%-20%. Se prepara una solución de 0.35g/100ml preparada 24 horas antes de su uso. Se pesan 0.35g de citrato férrico de amonio y aforar a 100ml con agua desionizada.
- ❖ AMONIACO. – se prepara una solución que contenga 0.8 g de  $\text{NH}_3$  /100ml (hidróxido de amonio). Es necesario realizar unos cálculos para la medición de amoniaco, que se encuentra en el hidróxido de amonio.

0.8 g  $\text{NH}_3$        $\longrightarrow$       g de hidróxido de amonio.

29g  $\text{NH}_3$        $\longrightarrow$       100g de hidróxido de amonio.



2.7586g hidróxido de amonio

Como está en solución, se despeja el volumen de la fórmula de densidad.

$$\text{Volumen} = \frac{\text{masa}}{\text{densidad}} \quad \Rightarrow \quad \text{Vol} = \frac{2.7586\text{g}}{0.8928\text{ml}} \quad \Rightarrow \quad \boxed{\text{Volumen} = 3.089\text{ml de hidróxido de amonio}}$$

Con una micropipeta medir 3.1ml de la solución de hidróxido de amonio y aforar a 100ml con agua desionizada

### 2.1.2. Equipo y material para extracción y determinación de taninos.

#### Equipo

- ❖ Molino y tamiz con malla de 0.5mm.
- ❖ Balanza analítica.
- ❖ Parrilla eléctrica con agitación.
- ❖ Centrífuga Clay Adams Dynac
- ❖ Baño regulador de temperatura (30°C).
- ❖ Espectrofotómetro. ( $\lambda=525\text{nm}$ ).
- ❖ Magnetos.

#### Material

- ❖ Cristalería de Laboratorio.
- ❖ Tubos para centrífuga.
- ❖ Agitador mecánico, para tubos de ensaye tipo Vórtex.
- ❖ Micropipetas de 1ml y 5ml.
- ❖ Frascos Ámbar.



### 2.1.3. Muestras

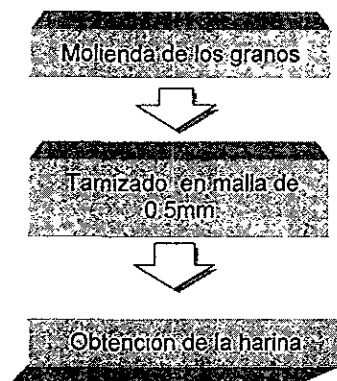
Para la estandarización del método de extracción y determinación de taninos, se utilizaron tres muestras, dos leguminosas y un cereal:

- Frijol blanco (*Phaseolus vulgaris*).
- Frijol negro (*Phaseolus vulgaris*).
- Sorgo (*Sorghum*).

Las muestras se consiguieron en el mercado (Central de Abastos).

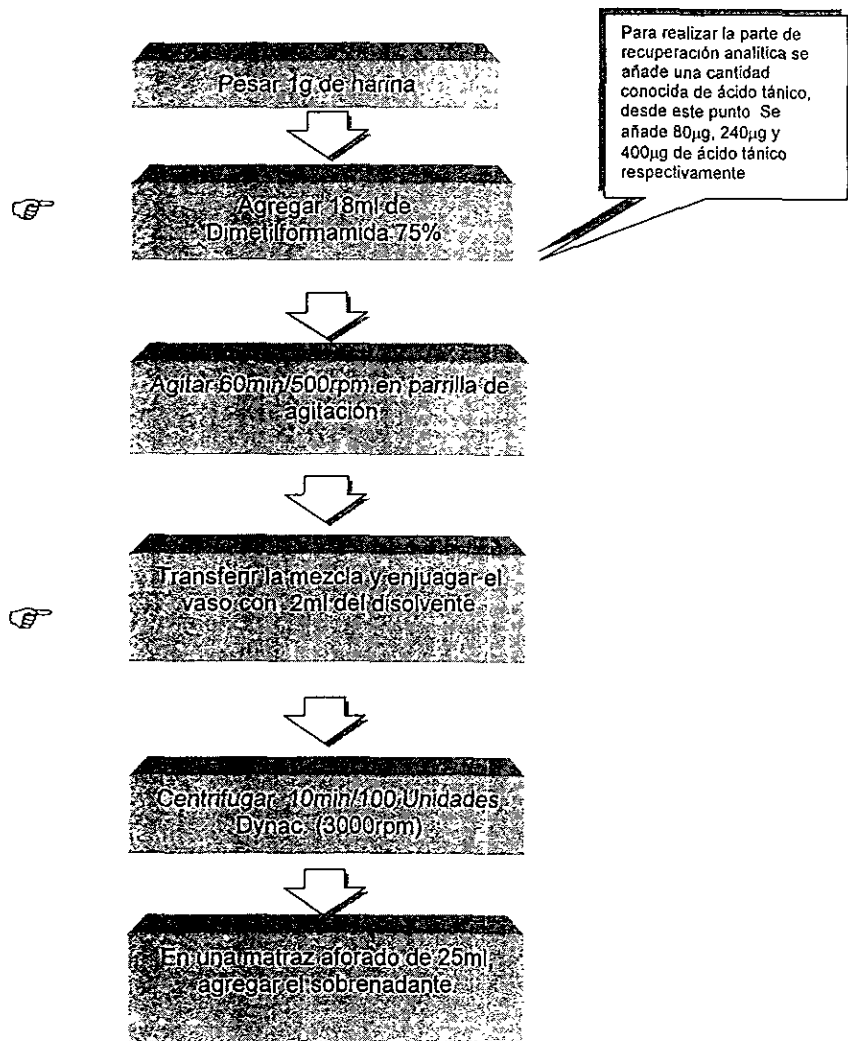
### 2.1.4. Acondicionamiento de la muestra

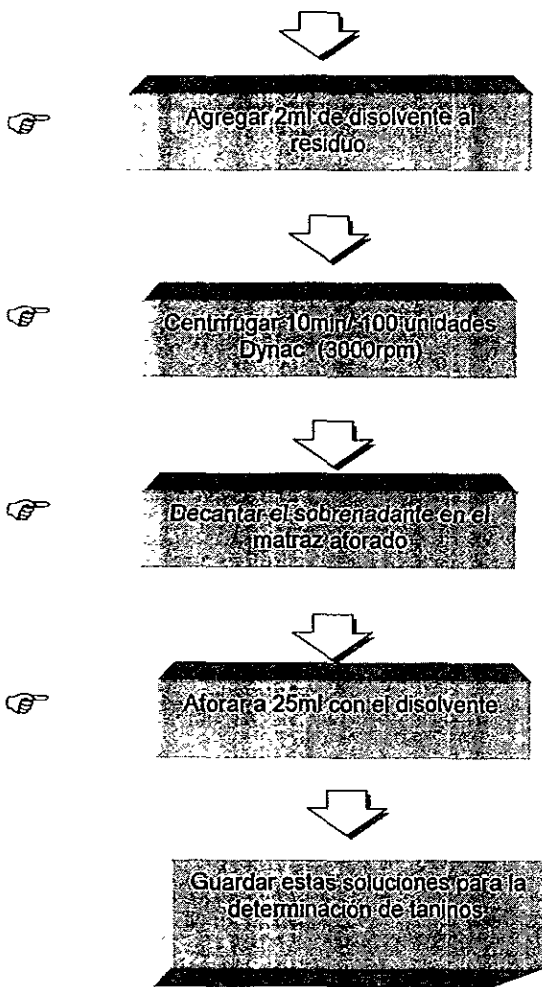
El acondicionamiento de la muestra se realiza para poder obtener la harina, que se utiliza para realizar la extracción de taninos.



### 2.1.5. Método de extracción de taninos.

El método que a continuación se describe, se utiliza para cada una de las muestras anteriores, una vez que ya han sido acondicionadas, para su posterior utilización. El método empleado ha sido ligeramente modificado del método original ISO 9648-1988.



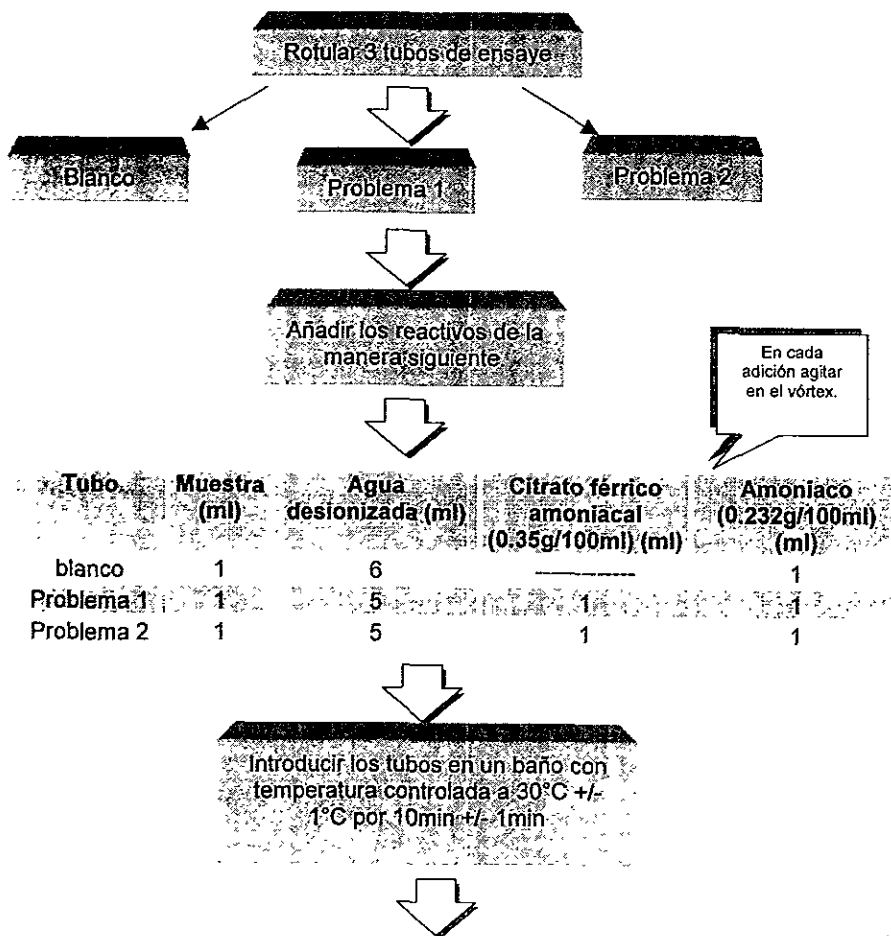


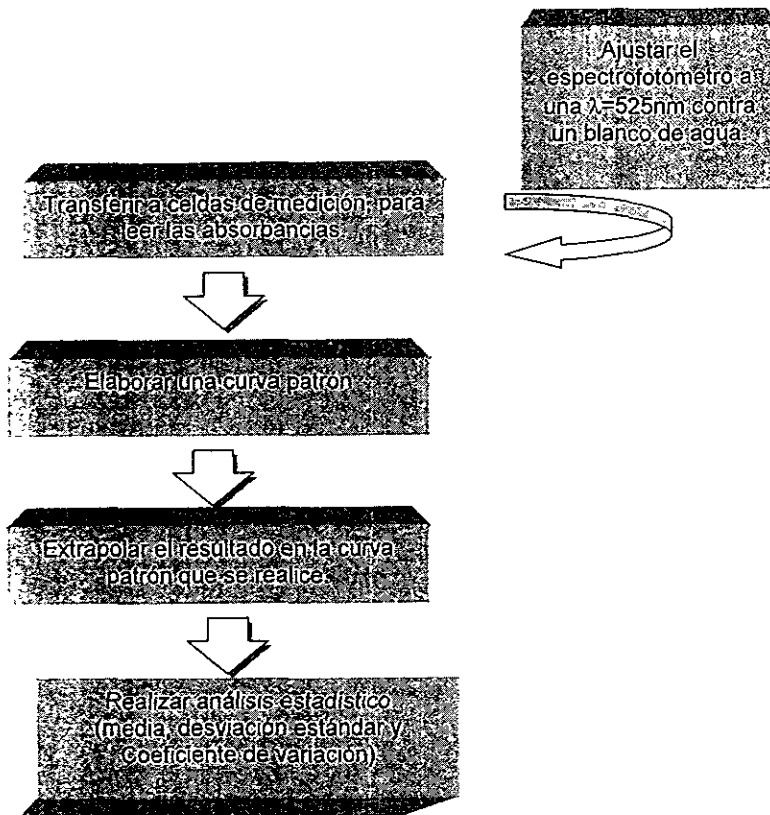
Modificaciones al método ISO-9648:1988.

## 2.1.6 METODO DE DETERMINACIÓN DE TANINOS

El método que se describe a continuación corresponde al Método de determinación del contenido de taninos en sorgo, con las respectivas modificaciones al método ISO 9648:1988.

### 2.1.6.1 Método de determinación de taninos en las muestras.

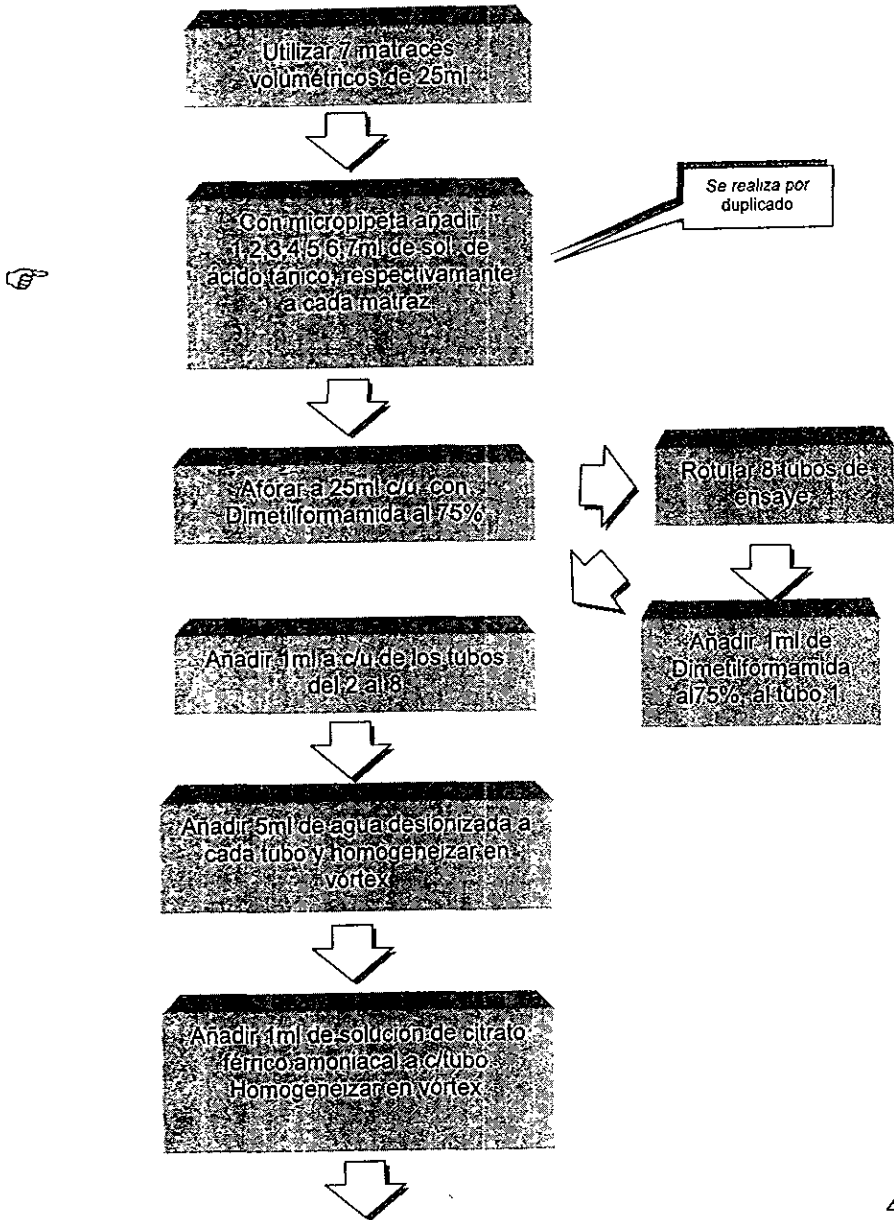




Debido al volumen de reactivo que se necesita para realizar la curva patrón y para realizar la extracción comparado con el volumen tan pequeño que se necesita para la determinación, se propone determinar la influencia que pudieran tener las siguientes variables como:

1. ¿Que tan estables son las soluciones preparadas para la curva patrón después de 5 días y después de 15 días?
2. ¿Qué influencia tiene sobre el contenido de ácido tánico el realizar el extracto con harina recién molida ó harina almacenada?
3. ¿Qué tan estables son los extractos de taninos de las muestras en refrigeración?

### 2.1.6.2 CURVA PATRÓN



Añadir 1ml de solución de Amonio a tubo, y homogeneizar en vortex.



Introducir los tubos en un baño con temperatura controlada a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 10min  $\pm 1$ min.



Transferir a celdas de medición para leer absorbancias.



Trazar una grafica de Absorbancia vs Concentración de ácido tánico ( $\mu\text{g}$  ácido tánico).



El rango de concentración obtenida va de  $80\mu\text{g}$  a  $560\mu\text{g}$  de ácido tánico.

Ajustar el espectrofotometro a una  $\lambda = 525\text{nm}$  contra un blanco de agua.



### 2.1.7 Determinación de taninos en agua de remojo de frijol negro





## 2.2 ENSAYO BIOLÓGICO

### 2.2.1 Reactivos.

- ❖ SOLUCIÓN SALINA 0.9%. – pesar 0.45g de Cloruro de sodio, y aforar a 50ml con agua desionizada.
- ❖ SOLUCIÓN DE ÁCIDO TÁNICO 100mg/ml. – pesar 0.15g de ácido tánico y diluir con 1 5ml de agua.
- ❖ ÈXTRACTO DE TANINOS DE FRIJOL NEGRO COCIDO.- de 5g y 10g.
- ❖ NITRÓGENO LIQUIDO.
- ❖ LECHE ENTERA PASTEURIZADA.

### 2.2.2 Equipo y material para el ensayo biológico.

#### Equipo

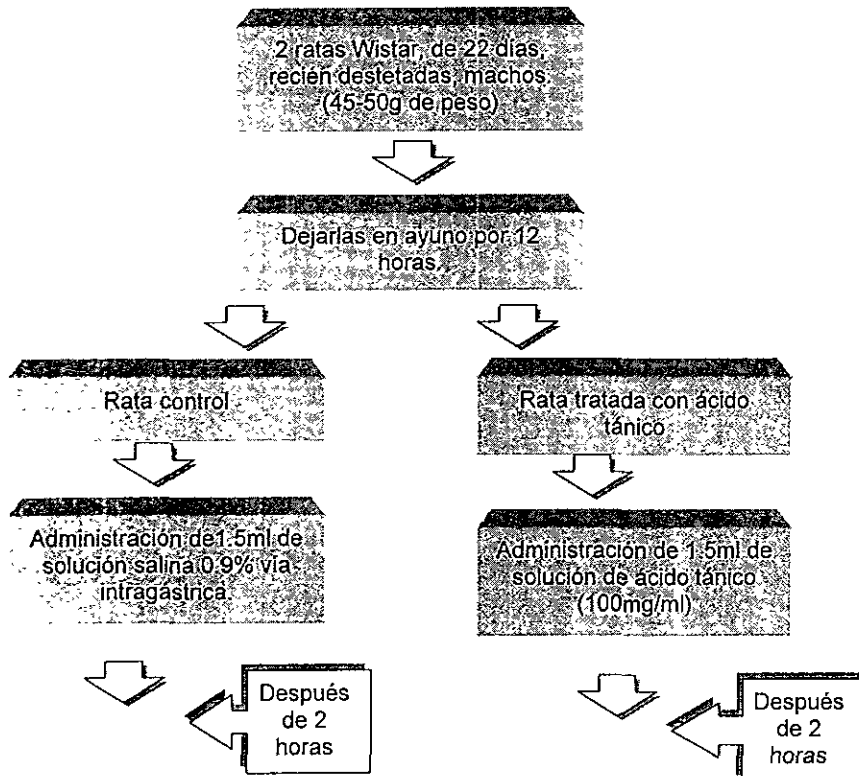
- ❖ Congelador de 0°C a -71°C (REVCO).
- ❖ Rotavapor.
- ❖ Liofilizadora.
- ❖ Ultracentrífuga.
- ❖ Sonda para ratón, para intubación intragástrica.
- ❖ Equipo y material de extracción de Taninos.

#### Animales de Laboratorio

- ❖ Ratas Wistar, 21-23 días, machos.

- ❖ Material
- ❖ Equipo de Disección.
- ❖ Jeringas de 5ml ó de 3ml.
- ❖ Tubos de Centrifuga.
- ❖ Cristalería de Laboratorio.
- ❖ Frascos Ámbar.

### 2.2.3 Ensayo biológico con ácido tánico.



Sacrificio de la rata por dislocación de columna

Sacrificio de la rata por dislocación de columna

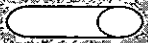


Localización del duodeno

El tiempo que transcurra a partir de que se sacrifica es muy importante y debe ser el menor posible, para evitar daños al tejido.



Sin enjuagar el tejido, realizar los cortes grandes, sumergirlos en el fijador.



Realizar un segundo corte, esta vez más cortos, sin maltratar tanto el tejido.

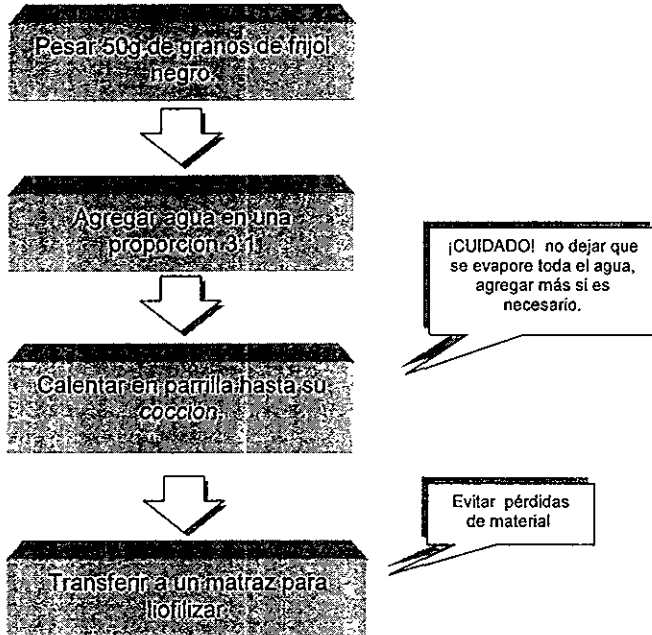


Se procede inmediatamente al procesamiento de muestras para microscopia electronica.

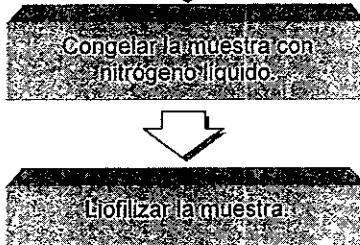
## 2.2.4. Preparación del extracto para el ensayo biológico.

Para la realización de esta parte, es necesario realizar la cocción, extracción, determinación de taninos, y posteriormente el ensayo biológico.

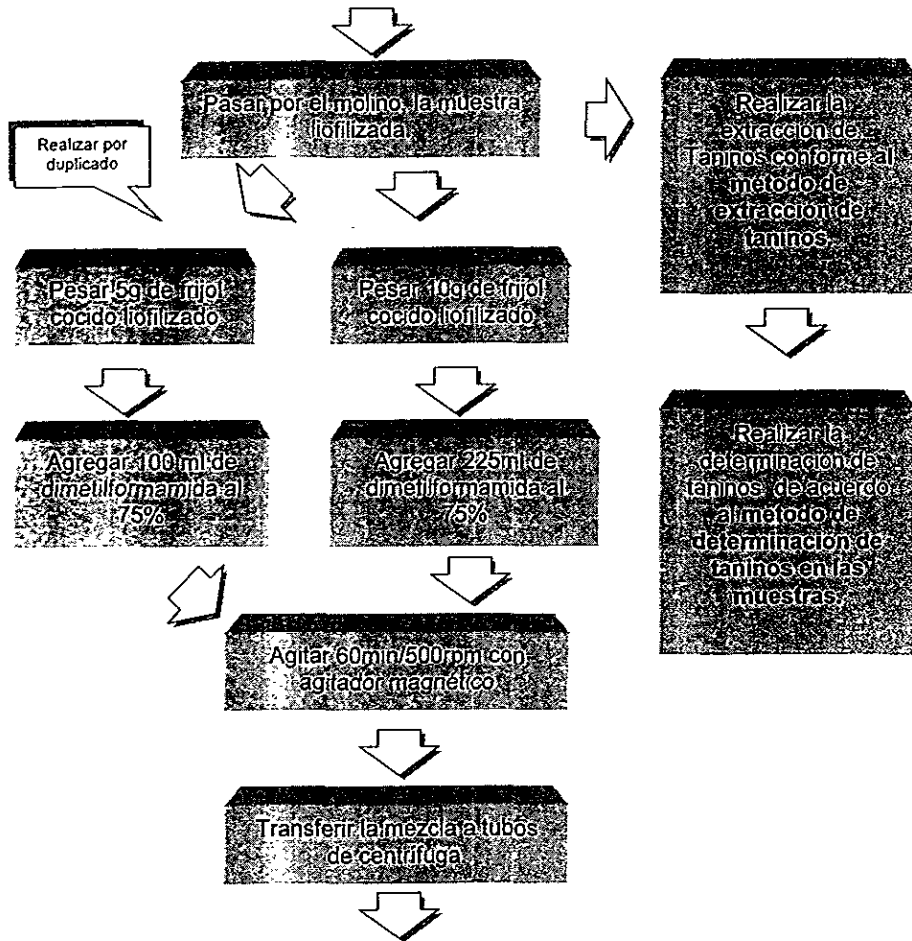
### 2.2.4.1 Cocción

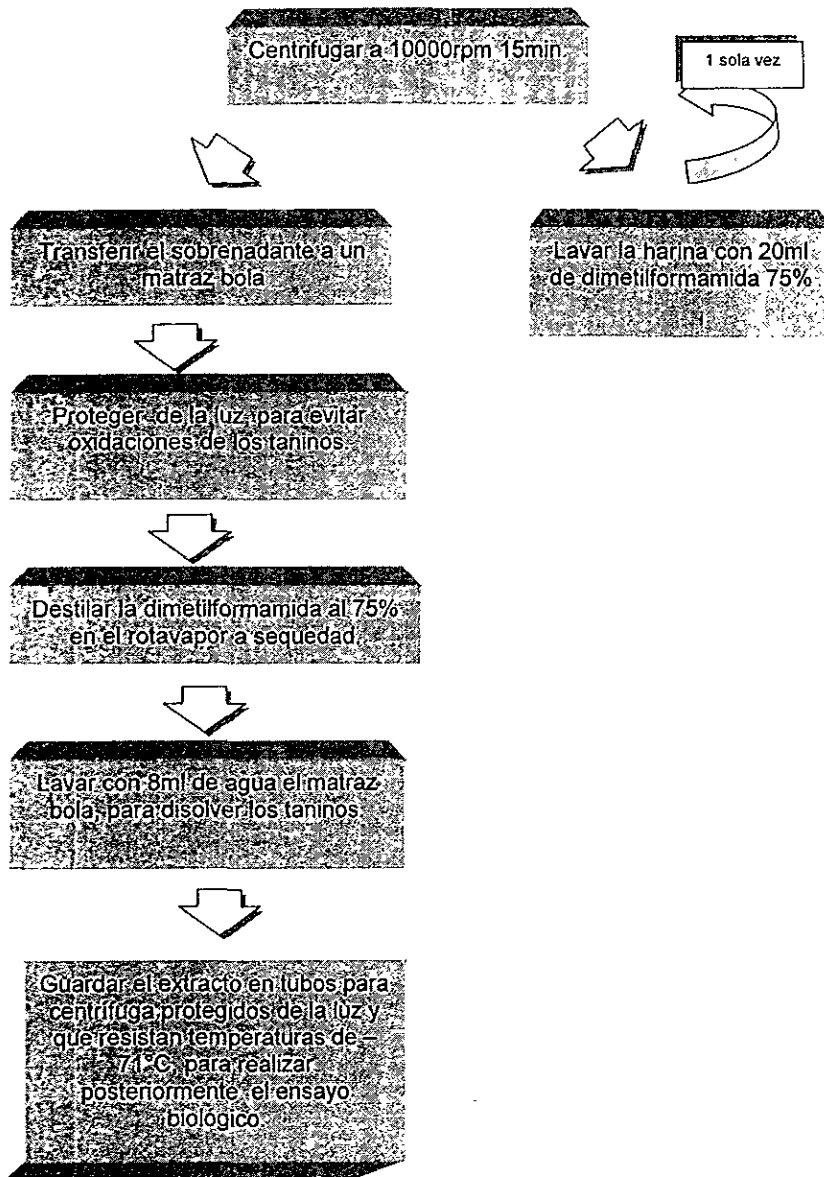


### 2.2.4.2 Liofilización

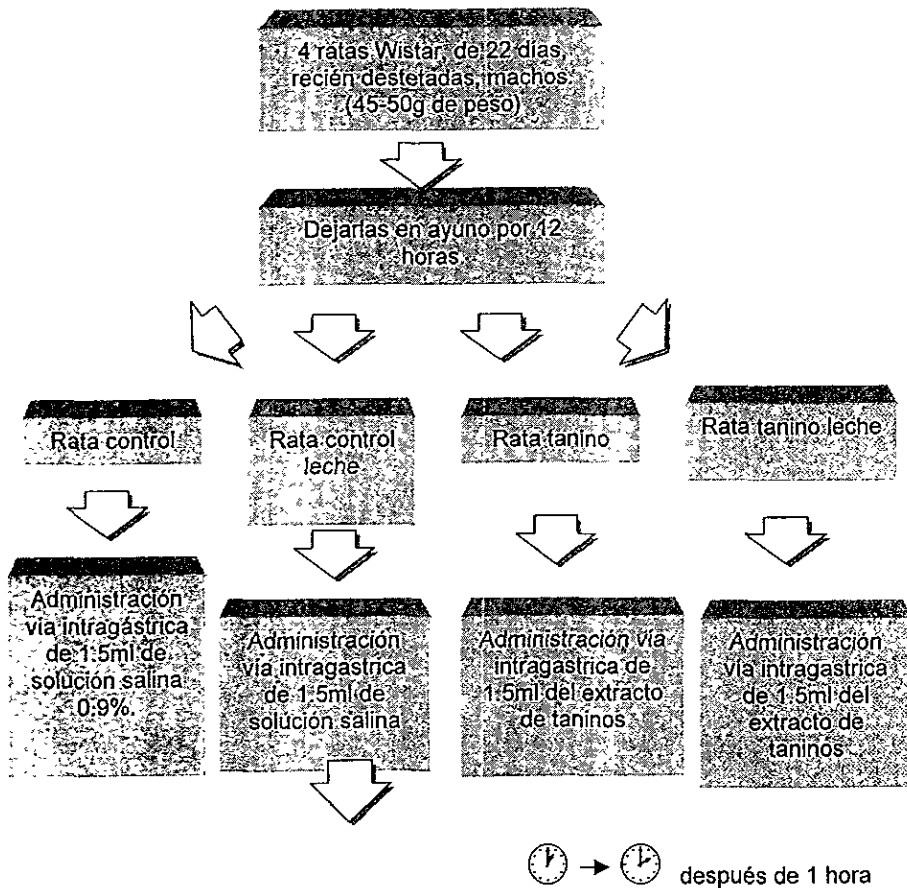


### 2.2.4.3. Obtención del extracto de taninos





## 2.2.5 Ensayo biológico con Taninos extraídos del Frijol Negro cocido.

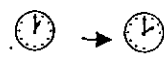


Administración  
via intragastrica  
de 1.5ml de  
solución salina  
0.9%

Administración  
via intragastrica  
de 1.5ml de  
solución salina

Administración  
via intragastrica  
de 1.5ml del  
extracto de  
taninos

Administración  
via intragastrica de  
1.5ml del extracto  
de taninos



después de 1 hora

Administración  
via intragastrica  
de 1.5ml de  
solución salina  
0.9%

Administración  
via intragastrica  
de 1.5ml de  
solución salina

Administración via  
intragastrica de  
1.5ml del extracto  
de taninos

Administración  
via intragastrica  
de 1.5ml del  
extracto de  
taninos



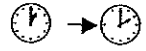
después de 1 hora

Administración  
via intragastrica  
de 1.5ml de  
solución salina  
0.9%

Administración  
via intragastrica  
de 1.5ml de  
solución salina  
0.9%

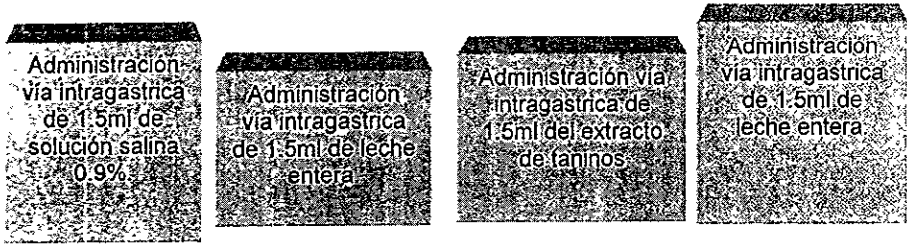
Administración via  
intragastrica de  
1.5ml del extracto  
de taninos

Administración  
via intragastrica  
de 1.5ml del  
extracto de  
taninos



después de 1 hora





después de 1 hora



Sacrificio de las ratas por dislocación de columna

El tiempo que transcurra a partir de que se sacrifica es muy importante y debe ser el menor posible, para evitar daños al tejido



Localización del duodeno



Sin enjuagar el tejido, realizar los cortes grandes, sumergirlos en el fijador



Realizar un segundo corte, esta vez mas cortos, sin maltratar tanto el tejido





Se procede inmediatamente al procesamiento de muestras para microscopía electrónica.

En el caso del tratamiento con el extracto de taninos de 5g de frijol negro, por cada 1.5ml equivale a una concentración de 0.1774 mg de ácido tánico.

En el caso del tratamiento con el extracto de taninos de 10g de frijol negro, por cada 1.5ml administrado, equivale a una concentración de 0.3364 mg de ácido tánico.

## 2.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

### 2.3.1 Reactivos

- ❖ BUFFER DE FOSFATO DE SODIO pH =7.4. – preparar 100ml de una mezcla de 77ml de fosfato de sodio dibásico 100mM con 23ml de fosfato de sodio monobásico 100mM.
- ❖ GLUTARALDEHÍDO AL 3% EN AMORTIGUADOR DE FOSFATO DE SODIO pH 7.4. preparar una solución de glutaraldehído al 3%, con un 97% de buffer de fosfatos a pH 7.4.
- ❖ TETRAÓXIDO DE OSMIO AL 2%. – preparar 100ml de una mezcla de 2ml de tetraóxido de osmio y 98ml de buffer de fosfatos pH 7.4.
- ❖ ETANOL 30%. – preparar 100ml. Mezclar 30ml de etanol absoluto con 70ml de agua desionizada.
- ❖ ETANOL 50%. – preparar 100ml. Mezclar 50ml de etanol absoluto con 50ml de agua desionizada.
- ❖ ETANOL 70%. – preparar 100ml. Mezclar 70ml de etanol absoluto con 30ml de agua desionizada.
- ❖ ETANOL 96%. – preparar 100ml. Mezclar 96ml de etanol absoluto con 4ml de agua desionizada.

- ❖ RESINA EPON (LUFT). – preparar 100ml. Mezclar 45ml de resina Epon 812, con 30ml de DDSA (Dodecenylsuccinic Anhydride), Anhídrido dodecenil succínico; 25ml de NMA (Nadic Methyl Anhydride), anhídrido metil nadico; y 1ml de BDMA (Bencil dimethyl Amine), Bencil dimetil amina.
- ❖ AZUL DE TOLUIDINA. – preparar la solución A que es Azul de Toluidina al 2% en agua desionizada, y mezclar con la solución B que es Borato de Sodio, en una proporción 1:1.
- ❖ ACETATO DE URANILO AL 2% EN AGUA DESTILADA.
- ❖ CITRATO DE PLOMO.
- ❖ LENTEJAS DE HIDROXIDO DE SODIO.

### **2.3.2. Equipo y Material para Procesamiento de muestras de Microscopía Electrónica de Transmisión.**

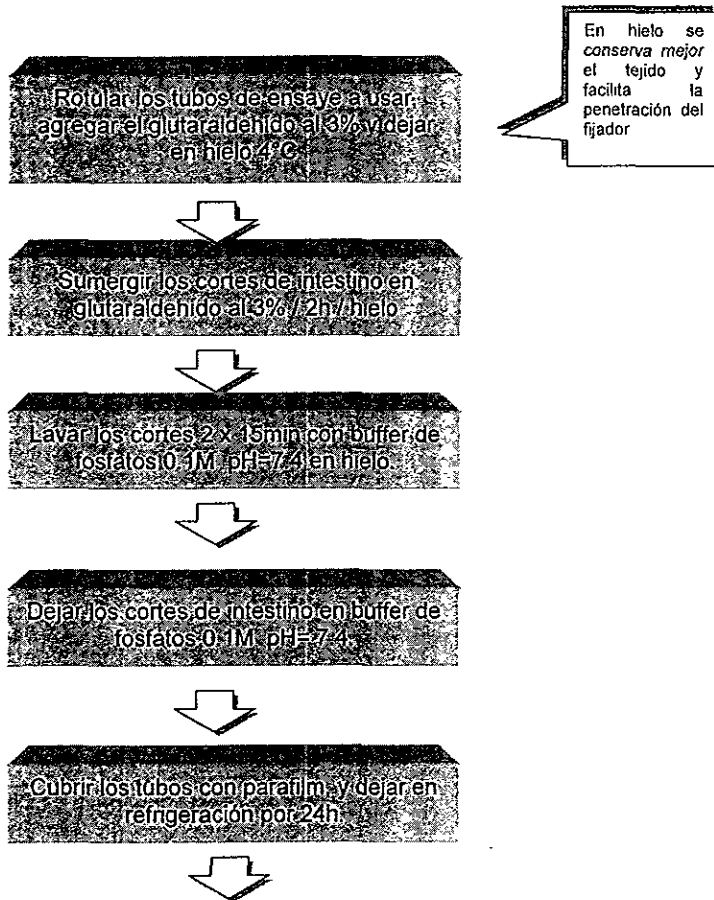
#### **Equipo**

- ❖ Desecador.
- ❖ Rotador de tubos.
- ❖ Estufa de polimerización.
- ❖ Ultramicrotomo. Ultracut Reichert Jung con navaja de diamante.
- ❖ Microscopio Optico.
- ❖ Microscopio electrónico de Transmisión (XEOL 1200CX II).
- ❖ Película para fotografía Kodak Electron Microscope 4489.
- ❖ Rejillas de cobre de 200mesh previamente lavados en DEXTRAN.
- ❖ Refrigerador.
- ❖ Sonicador.

**Material.**

- ❖ Cristalería de laboratorio.
- ❖ Revelador D-19.
- ❖ Parafilm.

**2.3.3. Procesamiento de Muestras para Microscopía Electrónica de Transmisión.**



Quitar el buffer de fosfatos



Agregar tetraóxido de osmio /2h en campana y en hielo (segundo fijador)

No exceder más de las dos horas



Lavar 2x15min con buffer de fosfatos 0.1M pH=7.4 en hielo



**DESHIDRATACION**



ALCOHOL	LAVADOS	CONDICIONES
Etanol 30%	2 x 15 min.	Hielo (4°C)
Etanol 50%	2 x 15 min.	Hielo (4°C)
Etanol 70%	2 x 15 min.	Hielo (4°C)
Etanol 96%	2 x 15 min.	Hielo (4°C)
Etanol 100%	2 x 15 min.	Hielo (4°C)
Etanol 100%	2 x 15 min.	Temp. Ambiente
Oxipropileno	2 x 15 min.	Temp. Ambiente

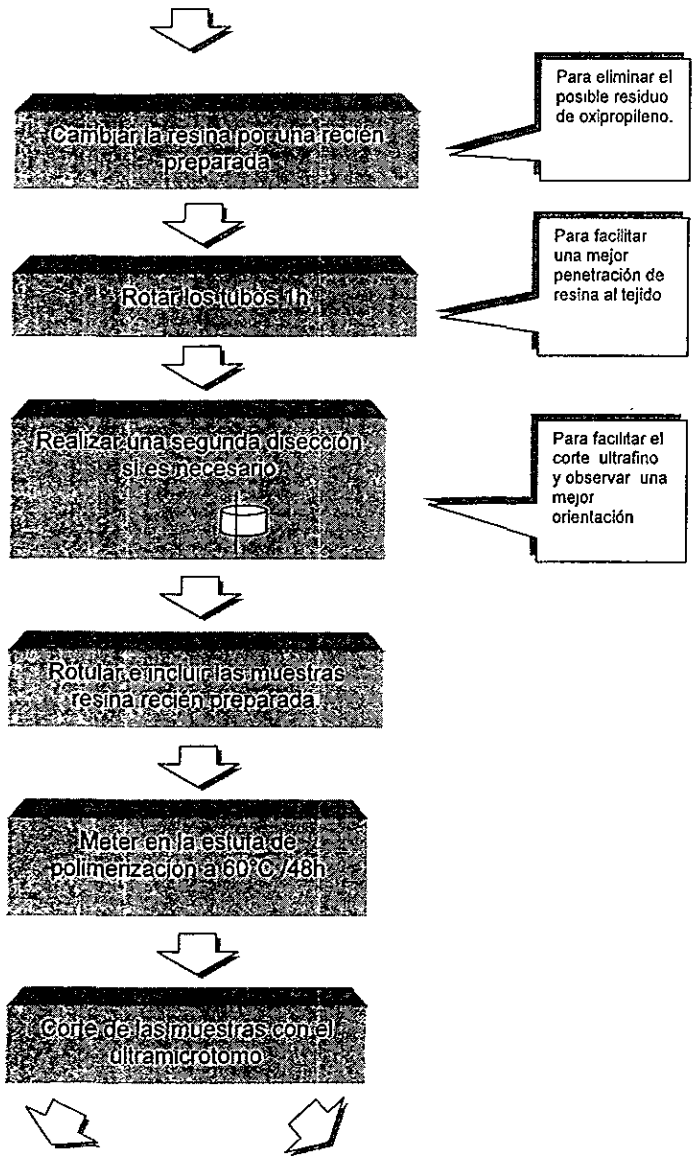


Sumergir los cortes de intestino en una mezcla de oxipropileno resina en proporción 1:1

24hr mínimo para evaporar la mayor parte de oxipropileno. 48hr máximo porque puede polimerizar la resina



Dejar los tubos en el desecador 48h máximo, 24h mínimo



## CORTES SEMIFINOS

Se colocan en portaobjetos los cortes semifinos, para observar en un microscopio óptico.



Tenir los cortes con azul de toluidina a 40°C aprox.



Observar en el microscopio óptico.

Proporciona información acerca de la orientación del corte, para realizar los cortes ultrafinos.

Interpretación de los resultados



Revelado



## CORTES FINOS

Se colocan en rejillas de cobre los cortes finos para su observación en el microscopio electrónico de transmisión.



Contrastar con acetato de uranio al 2% en agua / 30min. En un portaobjetos excavado.



Lavar con agua desionizada en exceso / 5min.



En un portaobjetos con lentes de Hidróxido de sodio, sumergir en una gota de citrato de plomo / 10min.



Lavar con agua desionizada en exceso / 5min.



Observar las muestras en el microscopio electrónico de transmisión. Tomar las fotografías correspondientes.



### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Curva patrón

Anteriormente se mencionaron las razones por las cuales, se decidió utilizar dimetilformamida al 75%, como disolvente de extracción y el método ISO-9648-1988 de cuantificación de taninos en sorgo, pero es importante señalar que se realizaron algunas modificaciones pequeñas al método oficial.

La metodología de la curva patrón expuesta se basa en lo estipulado en el método ISO 9648:1988, la única diferencia, es que se prepara una curva patrón que abarca un rango de concentración desde 80µg de ácido tánico, hasta 500µg de ácido tánico, mientras que el método oficial propone una concentración que va desde 100µg de ácido tánico hasta 400µg de ácido tánico. Lo anterior se basa en estudios previamente realizados, basados en el criterio de que entre mayor es el intervalo lineal, se incrementa la sensibilidad del método. El método ISO 9648:1988, utiliza un volumen final de 20ml de Dimetilformamida al 75%, mientras que la metodología expuesta propone un volumen final de 25ml.

En la **tabla 3.1** de resultados, se observan una serie de datos de absorbancia de diferentes curva patrón realizados diferentes días, para establecer la linealidad del método.

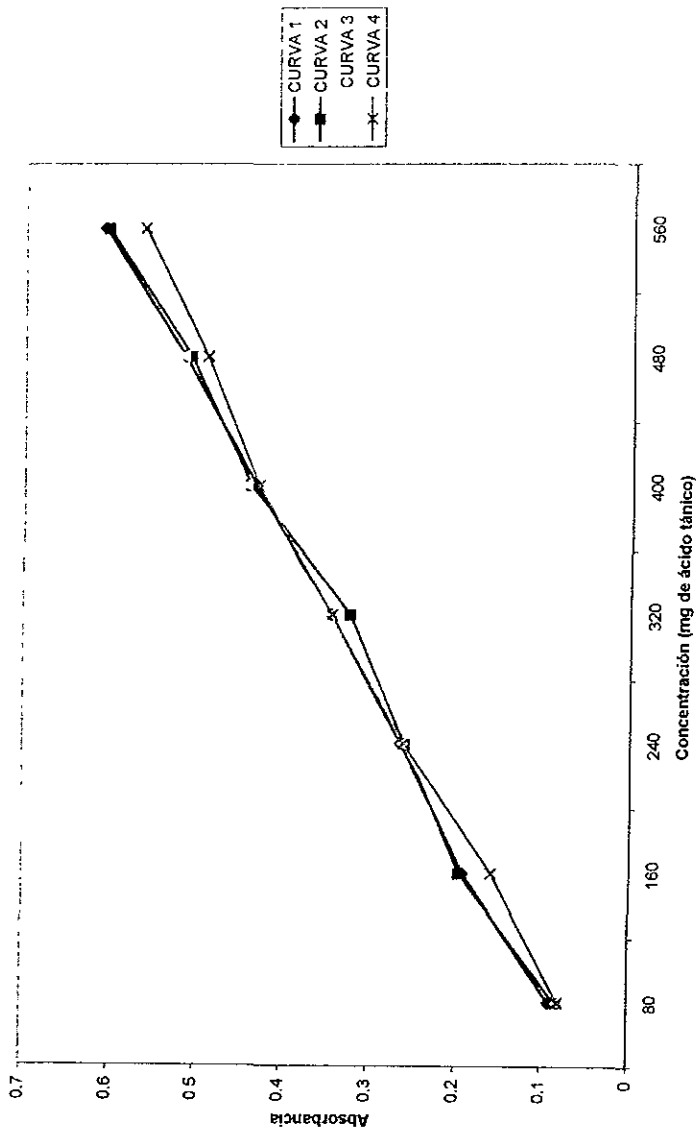
### 3.1 CURVA PATRÓN.

TABLA 3.1

	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	CURVA 4
Concentración ( $\mu\text{g}$ ácido tánico)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
80	0.091	0.084	0.081	0.080
160	0.193	0.197	0.177	0.160
240	0.264	0.260	0.262	0.261
320	0.345	0.323	0.345	0.344
400	0.433	0.439	0.444	0.430
480	0.516	0.509	0.518	0.490
560	0.609	0.605	0.626	0.563
Regresión Lineal				
A	$-6.57 \text{ e}^{-3}$	$7.28 \text{ e}^{-3}$	0.0117	$7.14 \text{ e}^{-3}$
M	$1.11 \text{ e}^{-3}$	$1.05 \text{ e}^{-3}$	$1.05 \text{ e}^{-3}$	$1.01 \text{ e}^{-3}$
R	0.9994	0.9971	0.9993	0.9976

Concentración ( $\mu\text{g}$ ácido tánico)	Absorbancia Promedio
80	0.084
160	0.181
240	0.261
320	0.339
400	0.436
480	0.508
560	0.600
Regresión Lineal	
A	$4.557 \text{ e}^{-3}$
M	$1.062 \text{ e}^{-3}$
R	0.9995

GRAFICO 3.1 CURVA PATRÓN



### 3.1.1 Determinación de Absorbancia en curva patrón después de un almacenamiento en refrigeración

Debido a la problemática que existe en cuanto al exceso de reactivo que se necesita para la preparación de las soluciones de la curva patrón con respecto a la cantidad mínima que se requiere para la determinación, se propuso guardar las soluciones en refrigeración durante 5,8,10 y 15 días dependiendo de cada curva.

Los siguientes cuadros de resultados (tablas 3.1.1 A,B,C), muestran los valores de absorbancia de 3 curvas patrón preparadas en días diferentes respectivamente. Más a la derecha de cada cuadro se muestran los valores de absorbancia de esos mismos extractos, pero, después de haber sido almacenados en refrigeración por un tiempo determinado.

En la tabla 3.1.1.A se muestran datos de curva patrón, después de haber sido almacenada en refrigeración por 5 y 15 días, en la tabla 3.1.1.B el periodo de almacenamiento es de 10 días y la tabla 3.1.1C corresponde al periodo de almacenamiento de 8 días, cada una se guarda en frascos ámbar debido a que los reactivos que se utilizan para la determinación requieren estar protegidos de la luz, por ser fácilmente oxidados por ella. Los datos expuestos no muestran cambios evidentes, es más podríamos decir que en los 3 casos de curva patrón, los coeficientes de correlación mejoran con el almacenamiento. Cabe señalar que no es de nuestro interés, el guardar soluciones por periodos tan largos de tiempo, porque no sería válido, ya que sabemos que una curva patrón debe ser preparada el mismo día de la experimentación, porque nos proporciona valores que se adecuan a las variables de experimentación, como es la temperatura, condiciones experimentales, etc. Nuestro propósito de haber realizado esto, es por cuestiones prácticas y de ahorro de reactivo, es decir, por las continuas extracciones que se realizan (diariamente), y por el exceso de disolvente que se necesita para preparar la curva patrón. Con estos resultados, podemos usar las soluciones almacenadas, realizando únicamente la determinación de absorbancia el día que se realice la extracción y por un periodo no más de 15 días.

TABLA 3.1.1.A.

Determinación de Absorbancia en curva patrón después de un almacenamiento en refrigeración

Curva patrón 1

	Medición el mismo día de su preparación	Medición después de 5 días en refrigeración	Medición después de 15 días en refrigeración
Conc (µg ác.tánico)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
80	0.084	0.087	0.067
160	0.197	0.183	0.154
240	0.260	0.268	0.240
320	0.323	0.346	0.335
400	0.439	0.447	0.427
480	0.509	0.531	0.499
560	0.605	0.62	0.594
<b>Regresión lineal</b>			
A	<b>7.28E-3</b>	<b>1.14E-3</b>	<b>-0.0202</b>
M	<b>1.056E-3</b>	<b>1.104E-3</b>	<b>1.097E-3</b>
R	<b>0.9971</b>	<b>0.9997</b>	<b>0.9996</b>

No nos desligamos del hecho que implica que la curva patrón se debe preparar el mismo día que se realiza el extracto, porque deben manejarse las mismas condiciones de experimentación

TABLA 3.1.1.B

Curva patrón 2

Conc ( $\mu\text{g}$ ác.tánico)	Medición el mismo día de su preparación	Medición después de 10 días en refrigeración
	Absorbancia	Absorbancia
80	0.086	0.063
160	0.152	0.138
240	0.246	0.225
320	0.361	0.308
400	0.402	0.412
480	0.447	0.487
560	0.492	0.568
<b>Regresión Lineal</b>		
A	0.0274	-0.0284
M	9.03E-4	1.0714E-3
R	0.9842	0.9993

TABLA 3.1.1.C

Curva patrón 3

Conc ( $\mu\text{g}$ ác.tánico)	Medición el mismo día de su preparación	Medición después de 8 días en refrigeración
	Absorbancia	Absorbancia
80	0.080	0.076
160	0.160	0.136
240	0.261	0.233
320	0.344	0.317
400	0.430	0.418
480	0.490	0.474
560	0.563	0.565
<b>Regresión Lineal</b>		
A	7.142e-3	-0.015
m	1.016e-3	1.039e-3
R	0.9976	0.9982

GRAFICO 3.1.1.A. CURVA PATRÓN EN ALMACENAMIENTO

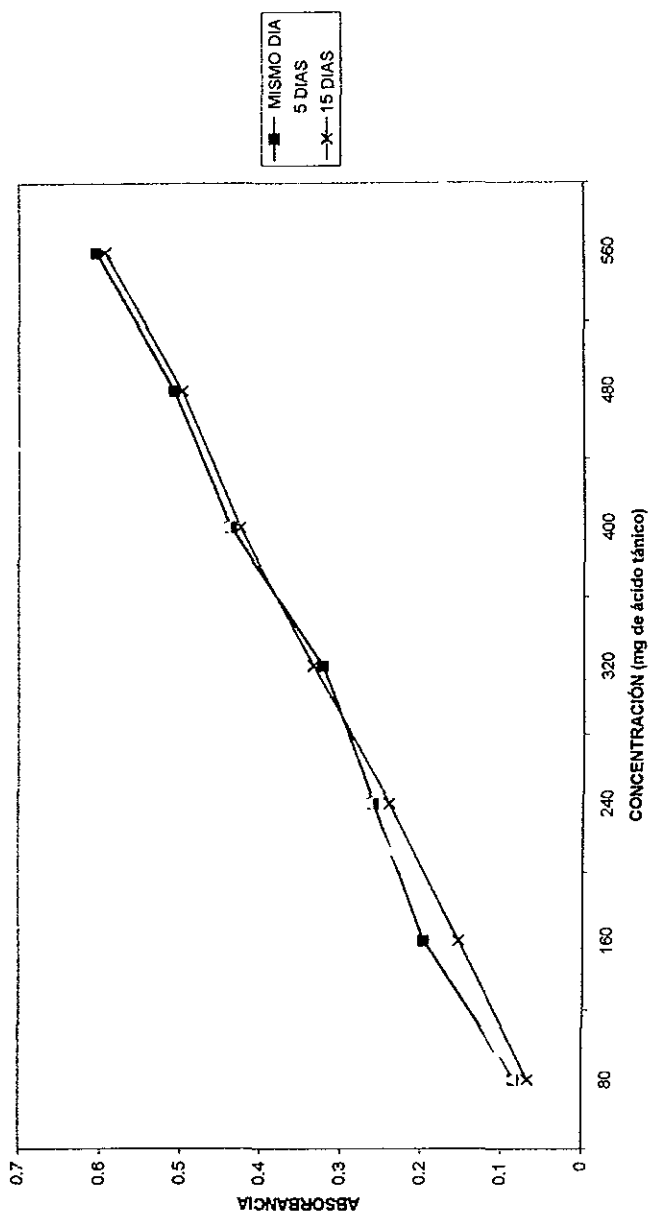


GRAFICO 3.1.1.B CURVA PATRÓN EN ALMACENAMIENTO

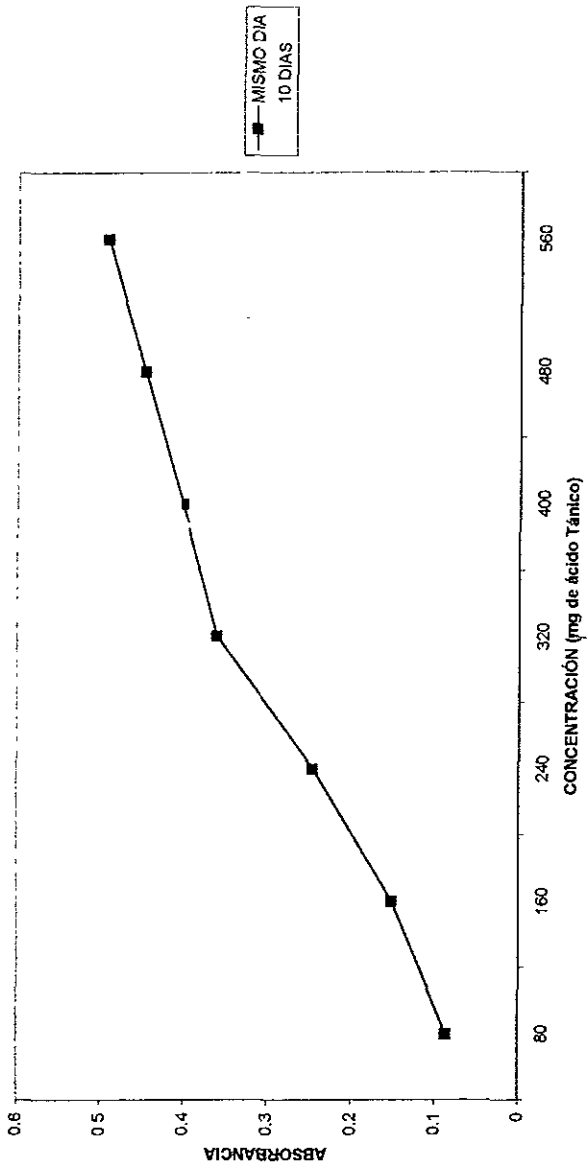
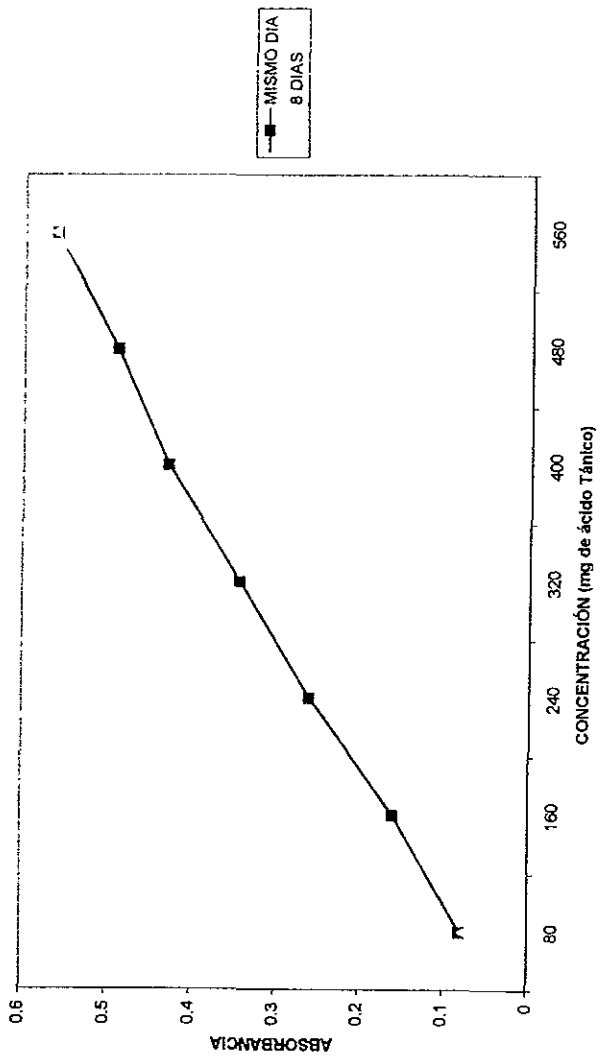




GRAFICO 3.1.1.C CURVA PATRÓN EN ALMACENAMIENTO



### 3.2 Frijol Blanco.

El método ISO-9648-1988, establece que la cantidad de Dimetilformamida al 75% que se necesita para la extracción es de 20ml, para posteriormente centrifugar y tomar una alícuota para la determinación. Pero de acuerdo a la metodología propuesta, que es básicamente el mismo método, se propuso enjuagar la harina y el vaso en el que se realizó la extracción con 2ml de Dimetilformamida al 75% y además centrifugar 2 veces la harina, ésta última con solo 2ml de disolvente, para posteriormente aforar a 25ml, para estandarizar los resultados de acuerdo al mismo volumen de la curva patrón. Con esto se obtienen mejores resultados, ya que en la harina pueden quedar residuos de taninos, así como en el vaso donde se realizó la extracción por lo que pudiera haber pérdidas.

Es importante conocer la precisión del método que nos indica la dispersión de las mediciones alrededor de un valor medio. Para esto se prepararon 8 extractos diferentes con harina recién obtenida, para su posterior determinación del contenido de taninos.

En cuanto a los datos obtenidos de concentración de taninos en frijol blanco, el coeficiente de variación da un valor de 5.39%, que nos indica que la determinación es reproducible. **Tabla 3.2.1.**

La concentración promedio fué de 119.57 +/- 6.45  $\mu\text{g}$  de ácido tánico.

Así mismo es importante considerar, si la cantidad que se extrae, es el valor real, para esto se realizó la recuperación analítica con harina recién obtenida y además con harina almacenada por 15 y 20 días, (**Tabla 3.2.2.**), en este caso con 3 concentraciones diferentes conocidas de ácido tánico añadido, para ambas harinas los porcentajes de recuperación, son altos con un rango que va de 97.31%- 99.45%.

Esto quiere decir que los datos de concentración de taninos obtenidos como resultado de la extracción, son realmente los que se están extrayendo y por consecuencia determinando con el método. No existe diferencia entre la harina recién obtenida y la harina almacenada hasta 20 días, en cuanto al porcentaje de recuperación.

Resulta de interés el conocer qué efecto pudiera tener sobre los resultados obtenidos de concentración, realizar la extracción de taninos con una harina recién obtenida, en comparación con una realizada de harina almacenada durante 5, 15 y 30 días. Los datos de absorbancia y concentración que se exponen en la **tabla 3.2.3**, muestran una diferencia en cuanto a los datos de concentración, esto es, conforme aumenta el tiempo de almacenamiento, en un lugar seco y protegido de la luz los datos de concentración tienden a sobreestimarse después de transcurridos 30 días en almacenamiento. La razón por la cual se sobreestima el valor, puede ser debido a que una vez que el grano se muele, además de que aumenta la superficie de contacto, pueden liberarse enzimas, ó bien, provocar un aceleramiento en el proceso de oxidación de los polifenoles.

Lo anterior se realiza para comprobar si es necesario realizar la molienda del grano cada vez que se va a realizar una determinación.

Se recomienda hacer la determinación de taninos con harina recién obtenida siempre y cuando la harina se almacene en un lugar seco y protegido de la luz, y por periodos no más de 15 días, para obtener resultados confiables.

También estos extractos se almacenaron por periodos de 5 y 15 días, esto es para *saber si en determinada situación no se pudiera realizar la determinación el mismo día de la extracción*. Los datos de la **tabla 3.2.4.A** y la **tabla 3.2.4.B** muestran que al paso del tiempo, se tiende a sobreestimar el contenido de ácido tánico en la muestra, esto es más evidente con harina almacenada, y es que, el compuesto en cuestión al estar en solución es mucho más inestable que si se encuentra en materia seca, como sería en la harina ó mejor aún en el grano, por lo tanto, si se recomienda que se realice la determinación el mismo día que se realiza la extracción.

### 3.2 DETERMINACIÓN DE TANINOS EN EXTRACTOS DE FRIJOL BLANCO EN DIMETILFORMAMIDA AL 75%

TABLA 3.2.1

Extractos preparados de forma independiente

EXTRACTO	ABSORBANCIA PROMEDIO
1	0.125
2	0.128
3	0.134
4	0.132
5	0.129
6	0.122
7	0.140
8	0.120
Promedio	0.128
Conc. (µg ac. tánico/g de muestra)	119.57
Desviación estándar	6.453
Coefficiente de variación (%)	5.39

**TABLA 3.2.2**

**Porcentajes de recuperación de taninos en Frijol Blanco**

CONC. (µg ac. tánico añadido)	HARINA RECIÉN OBTENIDA	HARINA ALMACENADA DURANTE 15 DÍAS	HARINA ALMACENADA DURANTE 20 DÍAS
	% recuperación	% recuperación	% recuperación
80	98.16%	97.69%	98.16%
240	97.58%	98.16%	97.48%
400	99.45%	97.31%	99.78%

**TABLA 3.2.3.**

**Concentración de extractos con harina recién obtenida y harina almacenada por periodos de 5, 15 y 30 días**

EXTRACTO	Abs. prom. EXTRACTO 1 N=2	Abs. Prom. EXTRACTO 2 N=2	ABS. PROM.	CONC. (µg ácido tánico/ g de muestra)
Harina recién obtenida	0.124	0.129	0.126	112.39
Harina recién obtenida	0.147	0.141	0.144	111.62
Harina almacenada después de 5 días	0.157	0.145	0.151	135.683
Harina almacenada después de 15 días	0.147	0.155	0.151	135.68
Harina almacenada después de 30 días	0.2015	0.199	0.2	189.88

## Estabilidad del extracto de Frijol Blanco

TABLA 3.2.4.A

### *Harina recién obtenida*

EXTRACTO	ABS.PROM	CONC. ( $\mu\text{g}$ ac. tánico/g de muestra)
Extracto preparado con harina recién obtenida	0.126	112.39
Extracto en refrigeración durante 5 días	0.142	127.534
Extracto en refrigeración durante 15 días	0.168	152.15

TABLA 3.2.4.B

### *Harina almacenada*

EXTRACTO	ABS PROM	CONC. ( $\mu\text{g}$ ac. tánico/g de muestra)
Extracto recién preparado con harina almacenada	0.151	135.683
Extracto en refrigeración durante 15 días	0.171	154.99

### 3.3. Sorgo

Con la misma metodología se realizó lo mismo para el caso del sorgo. La **tabla 3.3.1** muestra que el coeficiente de variación es de 5%, se considera dentro del límite. La concentración promedio es de 142.68 +/- 7.18 µg de ácido tánico/ g de muestra. Los porcentajes de recuperación que se muestran en la **tabla 3.3.2** indican que la cantidad extraída es la que se está determinando, no existe diferencia entre los porcentajes de recuperación entre la harina recién obtenida y la harina almacenada por 15 y 20 días. El rango obtenido para los tres casos es casi idéntico y va de 97.41%- 99.50%.

En cuanto a la comparación de datos de concentración entre harina recién obtenida y harina almacenada por 5 y 30 días, se muestra en la **tabla 3.3.3** en donde se incrementa ligeramente el valor de concentración obtenido, transcurridos los días, pero se mantiene dentro del rango de concentración promedio. El incremento no es tan evidente, como en el caso del frijol blanco. Pero aún y así se recomienda que se utilice la harina almacenada por periodos no más de 1 mes, transcurrido este tiempo, es recomendable realizar nuevamente la molienda del grano. Es posible que esta diferencia en comparación con el frijol blanco sea debido a la composición química de los granos y es que el frijol posee mayor cantidad de almidón y proteínas en comparación con el sorgo.

Los resultados de concentración de los extractos almacenados en refrigeración después de 5 y 15 días, con harina recién obtenida, no resultan ser tan confiables, y sucede lo mismo que en el caso del frijol blanco, los datos de concentración tal como se muestra en las **tablas 3.3.4.A** y **3.3.4.B**, se incrementan conforme aumenta el periodo de almacenamiento de los extractos en solución, el valor de concentración del extracto en refrigeración durante 5 días, se incrementa, pero se mantiene dentro del rango de concentración promedio, pero en el caso del extracto en refrigeración durante 15 días, el incremento es mucho mayor. Sucede el mismo efecto con harina almacenada.

### 3.3 DETERMINACIÓN DE TANINOS EN EXTRACTOS DE SORGO EN DIMETILFORMAMIDA AL 75%.

TABLA 3.3.1

Extractos preparados de forma independiente

EXTRACTO	ABSORBANCIA PROMEDIO
1	0.149
2	0.142
3	0.147
4	0.149
5	0.151
6	0.165
7	0.158
8	0.157
promedio	<b>0.152</b>
Conc (µg ac. tánico/g de muestra)	<b>142.68</b>
Desviación estándar	<b>7.18</b>
Coefficiente de variación (%)	<b>5</b>

TABLA 3.3.2

Recuperación analítica.

CONC. (µg ac. tánico añadido)	HARINA RECÍEN OBTENIDA	HARINA ALMACENADA POR 15 DÍAS	HARINA ALMACENADA POR 20 DÍAS
	%recuperación	%recuperación	%recuperación
80	98.54	97.58	99.50
240	99.04	98.68	97.41
400	97.68	98.73	98.97



**TABLA 3.3.3**

**Datos de concentración de extractos obtenidos con harina recién obtenida y harina almacenada por periodos de 5 y 30 días**

<b>EXTRACTO</b>	<b>Abs. Prom. EXTRACTO 1 N=2</b>	<b>Abs. Prom. EXTRACTO 2 N=2</b>	<b>ABS PROM</b>	<b>CONC. (µg ac. tánico/ g de muestra)</b>
Harina recién obtenida	0.144	0.145	0.144	<b>129.43</b>
Harina recién obtenida	0.147	0.136	0.14	<b>130.7</b>
Harina almacenada después de 5 días	0.160	0.158	0.159	<b>140.423</b>
Harina almacenada después de 30 días	0.161	0.168	0.164	<b>147.45</b>

**TABLA 3.3.4.A**

**Estabilidad del extracto de sorgo**

**Harina recién obtenida**

<b>EXTRACTO</b>	<b>ABS PROM</b>	<b>CONC (µg de ácido tánico/ g de muestra)</b>
Extracto preparado con harina recién obtenida	0.144	<b>129.43</b>
Extracto en refrigeración durante 5 días	0.162	<b>145.64</b>
Extracto en refrigeración durante 15 días	0.168	<b>171.58</b>

TABLA 3.3.4.B

Harina almacenada

Extracto	Abs.prom	Conc (µg ác.tánico/ g de muestra)
Extracto preparado con harina almacenada	0.164	147.45
Extracto en refrigeración durante 10 días	0.197	179.61

### 3.4 Frijol Negro Crudo .

Para el frijol negro, se obtiene un coeficiente de variación de 1.0359% y 0.9653%, por lo tanto el error experimental se considera mínimo. La concentración promedio obtenida es de 246.7902 +/- 2.3809 µg de ácido tánico, tal como se muestra en la **tabla 3.4.1**. Los porcentajes de recuperación con ambas harinas son casi de un 100%, (Ver **tabla 3.4.2**). Lo que quiere decir que realmente la concentración determinada es la cantidad de ácido tánico extraída.

En los datos de concentración de extractos con harina recién obtenida y harina almacenada por periodos de 5, 15 y 30 días que se muestran en la **tabla 3.4.3**, si existe diferencia entre los datos de concentración obtenidos con harina recién molida y con harina almacenada por 5 y 15 días, pero transcurridos los 30 días de almacenamiento, el incremento es aún más notable, Aún así y sin hacer el análisis estadístico se ve que todos son diferentes significativamente, por lo tanto se recomienda hacer la determinación con harina recién obtenida.

Los datos de concentración de los extractos ya preparados y almacenados en refrigeración tienen el mismo efecto, ya sea con harina recién obtenida ó con harina almacenada, si el periodo de almacenamiento fue de 5, a 15 días, los valores se sobreestiman, por lo que no resulta nada confiable el almacenar en refrigeración extractos ya preparados. Se recomienda que la determinación del contenido de ácido tánico se realice el mismo día que se realiza la extracción. (Ver **tabla 3.4.4.A y 3.4.4.B.**)

### 3.4 DETERMINACIÓN DE TANINOS EN EXTRACTOS DE FRIJOL NEGRO CRUDO EN DIMETILFORMAMIDA AL 75%

TABLA 3.4.1.

Extractos preparados de forma independiente

EXTRACTO	EXTRACTO 1	EXTRACTO 2
	CONCENTRACIÓN PROMEDIO ( $\mu\text{g}$ ÁCIDO TÁNICO/g DE MUESTRA)	CONCENTRACIÓN PROMEDIO ( $\mu\text{g}$ ÁCIDO TÁNICO/g DE MUESTRA)
1	243.2550	250.3959
2	246.8380	244.1264
3	245.0465	245.0220
4	246.8380	249.5002
5	245.9422	247.7089
6	252.2124	245.9177
7	245.0465	246.8133
8	247.7337	248.6046
9	249.5252	243.2307
10	245.0465	245.0220
Promedio Concentración ( $\mu\text{g}$ ácido tánico/g de muestra)	<b>246.7902</b>	<b>243.6341</b>
Desviación estándar	<b>2.5566</b>	<b>2.3809</b>
Coefficiente de variación (%)	<b>1.0359</b>	<b>0.9653</b>

TABLA 3.4.2

Recuperación analítica.

Conc. ( $\mu\text{g}$ tánico añadido)	HARINA RECIÉN OBTENIDA	HARINA ALMACENADA DURANTE 15 DÍAS	HARINA ALMACENADA DURANTE 30 DÍAS
	%recuperación	%recuperación	%recuperación
80	101.9527	101.9791	96.6672
240	96.9189	100.8871	98.89
400	97.80	101.2615	99.74

TABLA 3.4.3.

Datos de concentración de extractos obtenidos con harina recién obtenida y harina almacenada

EXTRACTO	Abs. EXTRACTO1 N=2	Abs. prom EXTRACTO 2 N=2	ABS PROM	CONC. (µg ac. tánico/g de muestra)
Harina recién obtenida	0.265	0.26	0.262	241.14
Harina recién obtenida	0.2467	0.245	0.245	225.136
Harina almacenada durante 5 días	0.236	0.219	0.227	209.06
Harina almacenada durante 15 días	0.272	0.285	0.278	250.67
Harina almacenada durante 30 días	0.284	0.282	0.283	271.25

Datos de concentración de extractos de Frijol Negro crudo recién preparados y almacenados en refrigeración .

TABLA 3.4.4.A.

*Harina recién obtenida*

EXTRACTO	ABS PROM	CONCENTRACIÓN (µg AC. TÁNICO/G DE MUESTRA)
Extracto preparado con harina recién obtenida	0.262	241.14
Extracto en refrigeración durante 5 días	0.294	265.157
Extracto en refrigeración durante 15 días	0.325	300.79

**TABLA 3.4.4.B.**

*Harina almacenada*

EXTRACTO	ABS PROM	Concentración (µg ac.tánico/g de muestra)
Extracto preparado con harina almacenada	0.278	250.67
Extracto en refrigeración durante 10 días	0.309	285.64

### 3.5. Frijol Negro Cocido

Para los datos de concentración obtenidos de frijol negro cocido, es notoria la disminución del contenido de ácido tánico, la concentración promedio es de 154.4758 +/- 2.4580µg de ácido tánico (Ver tabla 3.5.1). Se corrobora con los porcentajes de recuperación obtenidos con un rango de 96.14% - 100.65% que se muestran en la **tabla 3.5.2**.

Esta prueba se realizó las veces necesarias para corroborar lo anterior, se tuvo mucha precaución desde el momento de la cocción de los mismos, en que no se obtuvieran pérdidas de material, es decir las condiciones experimentales se realizaron con extremo cuidado. La explicación que damos a esto, porque es sabido por muchos autores que los taninos son termoestables, es que el tratamiento térmico que se le dé, bajo ciertas condiciones, es el factor clave de que haya esta disminución. Puede ser que la muestra tratada térmicamente en autoclave, condiciones en seco, la destrucción de taninos suceda o no suceda; mientras que en solución, tal cual se realiza el cocimiento de los frijoles en casa, la destrucción si se lleva a cabo, no en un 100%, pero si un porcentaje del 34% en este caso. Lo que se sugiere es que como hay una hidratación, existe una solubilización de nutrimentos del frijol como enzimas e incluso de los taninos que son altamente solubles, y al estar en solución puede ser que pierdan su propiedad de ser termoestables, y que provoque como consecuencia la destrucción de los polifenoles. De acuerdo a la bibliografía revisada anteriormente, la mayoría de los autores, exponen que un tratamiento térmico, aplicado a los frijoles en solución (agua), puede remover un porcentaje que va desde un 38% a un 74%, dependiendo de si existe un remojo previo a la cocción del grano, lavados, etc.

**3.5.DETERMINACIÓN DE TANINOS EN EXTRACTOS DE FRIJOL NEGRO COCIDO EXTRAÍDOS CON DIMETILFORMAMIDA AL 75%**

TABLA 3.5.1.

Datos de concentración ( $\mu\text{g}$  ácido tánico/g de muestra) de frijol cocido.

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN PROMEDIO ( $\mu\text{g}$ ÁCIDO TÁNICO)	CONCENTRACIÓN PROMEDIO ( $\mu\text{g}$ ÁCIDO TÁNICO)
1	154.2078	157.0608
2	154.2078	174.9552
3	155.1014	158.8499
4	153.3142	157.0608
5	155.9950	158.8499
6	154.2078	157.9533
7	152.4206	158.8499
8	153.3142	157.9553
9	151.5270	157.0608
10	160.4629	154.3771
Promedio Concentración ( $\mu\text{g}$ ácido tánico/g de muestra)	154.4758	159.2672
Desviación estándar	2.4580	5.6651
Coefficiente de variación	1.5912	3.55

TABLA 3.5.2.

Porcentaje de recuperación

CONC. ( $\mu\text{g}$ de ácido tánico añadido)	EXTRACTO 1	EXTRACTO 2	EXTRACTO 3
80	96.6835	100.65	99.65
240	98.6595	99.09	96.14
400	98.6763	97.47	96.74



### 3.6. Taninos en agua de remojo.

También es importante destacar la cultura de las amas de casa, en cuanto al método de cocimiento de los frijoles en casa, y la mayoría somete a los frijoles a un remojo un día antes de su cocimiento, esto lo hacen porque se dice que con este remojo el tiempo de cocción disminuye, hecho que si es razonable debido a que existe una hidratación, por lo que la transferencia de calor al interior del grano se hace mucho más rápido y fácil; Además se cree que el remojo ayuda a eliminar el efecto de las flatulencias al consumir este alimento, entre otras razones que posiblemente no resulten ser muy ciertas; posteriormente esta agua es desechada porque adquiere un color muy oscuro, en el caso del frijol negro, ésta se hace desagradable a la vista porque aparenta ser agua sucia y se desecha. Pero uno se preguntaría en esa agua de remojo por el color que adquiere y debido a que los taninos han sido asociados a las propiedades del color y aunado a esto su alta solubilidad en agua ¿ podrían acarrearse taninos en el agua de remojo?. Y los resultados obtenidos nos confirman que si existen taninos presentes en el agua de remojo con un promedio de concentración de  $5.0480 \pm 0.0518 \mu\text{g}$  de ácido tánico/g de muestra que corresponde al 2% de lo que se obtiene de la semilla cruda. Según los datos expuestos en la **tabla 3.6.1**, y los estudios realizados por Singh, Arora; 1978; Panda et.al. 1979, quienes sugieren que con el remojo, lavado y cocimiento en agua se remueve alrededor de un 80% de taninos en semillas. Nuestro propósito se aleja mucho de tratar de remover los taninos de la leguminosa, por el contrario lo que queremos estudiar es el efecto de ellos en la mucosa intestinal, pero no se le puede administrar a la rata la semilla cruda, porque interferirían otras sustancias tóxicas que no nos interesa analizar en este proyecto y que se destruyen con el tratamiento térmico, pero si es importante determinar la cantidad administrada como semilla cocida. Es muy notorio que la concentración disminuye en comparación con la semilla cruda, aclarando que esta disminución es debido al tratamiento térmico bajo las condiciones experimentales en las que se realizó, únicamente. No se atribuye a pérdidas, ni lavados, ni remojos.

**3.6 DETERMINACIÓN DE TANINOS EN AGUA DE REMOJO DE FRIJOL NEGRO CRUDO.**

TABLA 3.6.1.

DETERMINACIÓN	CONCENTRACIÓN EN 100ml (µg de ácido tánico)	CONCENTRACIÓN EN 25ml y 1g de muestra (µg de ácido tánico)
1	196.8147	4.9203
2	202.1928	5.0548
3	201.2965	5.0324
4	202.1928	5.0548
5	201.2965	5.0324
6	203.0892	5.0772
7	201.2965	5.0324
8	203.0892	5.0772
9	203.9855	5.0996
10	203.9855	5.0996
MEDIA	201.9239	5.0480
DESVIACION ESTANDAR	2.0721	0.05181
COEFICIENTE DE VARIACIÓN	1.0262	1.0263

### 3.7 ENSAYO BIOLÓGICO

La técnica de disección y de procesamiento de muestras para microscopía electrónica, fue modificada y acondicionada a las condiciones experimentales de acuerdo al tejido con el que se trabaja que en este caso es parte del intestino delgado (duodeno). De manera que fue necesario realizar varias veces la técnica para ir ajustando las condiciones del proceso, así como la disección, para poder obtener la técnica descrita en la parte de la metodología.

#### 3.7.1 ENSAYO BIOLÓGICO CON ÁCIDO TÁNICO.

En cuanto a los resultados obtenidos con el tratamiento biológico, primero analizaremos las muestras de duodeno tratados con ácido tánico, esto se realizó para obtener información relevante acerca del efecto que pudiera causar y en qué parte de la célula es donde tiene se tuvo mayor efecto. La dosis administrada se consideró tóxica.

Las fotografías se presentan con ambos tratamientos, control y tratado con el mismo aumento, así como la proyección de la misma zona para poder realizar la comparación.

La Figura 3.7.1.A. corresponde al corte de duodeno control, la región localizada es parte de la vellosidad. Las microvellosidades del epitelio intestinal mantienen su membrana y su integridad del borde en cepillo, se encuentran ordenadas y uniformes. Se aprecia el velo terminal claramente, por lo que se imparte rigidez a la microvellosidad, lo que contribuye a mantener su ordenamiento paralelo por los filamentos de actina. Se aprecian los nexos entre células. El retículo endoplasmático rugoso (RER) se observa con una gran cantidad de ribosomas y una gran cantidad de mitocondrias con apariencia normal, en donde se aprecia su doble membrana y las crestas. También se aprecia alguno que otro aparato de golgi con apariencia normal.

La descripción de una célula en perfecto estado y que corresponde a la misma descripción para cada una de las muestras control que se presentan en este trabajo.

Por el contrario la Figura 3.7.1.B corresponde al corte de duodeno tratado con ácido tánico (100mg/ml de ácido tánico), la región localizada es parte de la vellosidad. Las microvellosidades del epitelio intestinal se encuentran muy destruidas, se pierde toda integridad, uniformidad y ordenamiento, sin embargo los nexos entre células no se han perdido. Por debajo de las microvellosidades se observan varios cuerpos de inclusión que parecen ser el ácido tánico administrado, pero solo se aprecian en la parte superior de la célula, cerca de las microvellosidades. Se aprecia el RER con sus ribosomas, aunque estos en comparación con la cantidad que se encuentra en el control es mucho menor y mucho más dispersos, algunas mitocondrias se encuentran hinchadas, y en algunas otras se ha destruido la membrana interna, observándose vacías. Sin embargo no se puede decir que el daño es irreversible, puesto que la célula aún y con los cambios que sufre, no se observa un cambio que haya provocado la muerte de la célula sin posibilidad de regeneración, como sería el caso de un edema por ejemplo, en el cual la entrada del agua a la célula, provoca la destrucción de toda la integridad celular irreversiblemente.

En las Figuras 3.7.1.C y 3.7.1.D que corresponden a la misma región pero con menor aumento, se aprecian algunos núcleos, que si bien no es el organelo de mayor importancia, es uno de los que nos proporcionan información importante acerca del estado en el que se encuentra la célula, puesto que en caso de que exista muerte celular es uno de los primeros organelos en destruirse. En ambos casos control y tratado, los núcleos presentan apariencia normal, con sus nucleólos, la cromatina en forma de eucromatina y heterocromatina. Sin embargo en la Figura 3.7.1.D a pesar de que se observan las microvellosidades casi destruidas, y la presencia de estas partículas en el borde superior, a diferencia de la Figura 3.7.1.B, las mitocondrias no se ven tan dañadas, lo que sugiere que no es un efecto uniforme, ni total.

En la Figura 3.7.1.F, se destaca la pérdida de la microvellosidad, en esa región, de hecho existe una destrucción celular en esa zona, el borde en cepillo se ha destruido totalmente. Mientras que la muestra control (Figura 3.7.1.E) representa todo lo contrario.

La dosis letal ( $LD_{100}$ ) de ácido tánico administrado vía oral a ratas es de 6g/Kg.

Dar una explicación fisiológica determinante y universal resultaría muy peligroso es por eso que la interpretación se limita a los resultados obtenidos. En general, el efecto que se encuentra es a nivel microvellosidad, es decir en el borde en cepillo, por lo que la célula es posible que pierda su función de secreción y absorción, porque se ha perdido la membrana, no existe permeabilidad ni selectividad a lo que entra y sale de la célula. Esto es, como en el borde en cepillo se encuentran muchas enzimas (disacaridasa, peptidasas) y proteínas no enzimáticas que funcionan como receptoras y también proteínas transportadoras de glucosa, aminoácidos libres, sodio ó quizás ácidos grasos, que pueden verse afectados, la explicación que se da a esto es que los taninos poseen la propiedad de unirse a las proteínas, y lo hacen con las proteínas de la membrana, que junto con la dosis administrada, causa una destrucción de las microvellosidades.

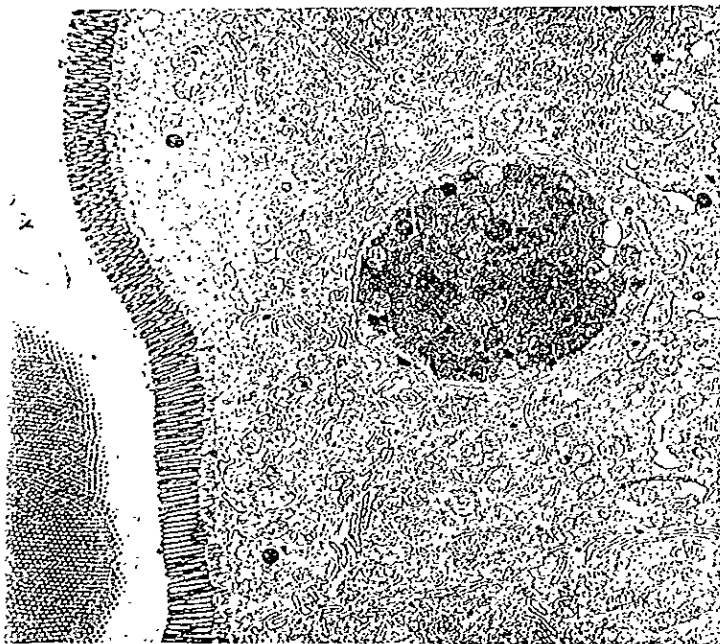
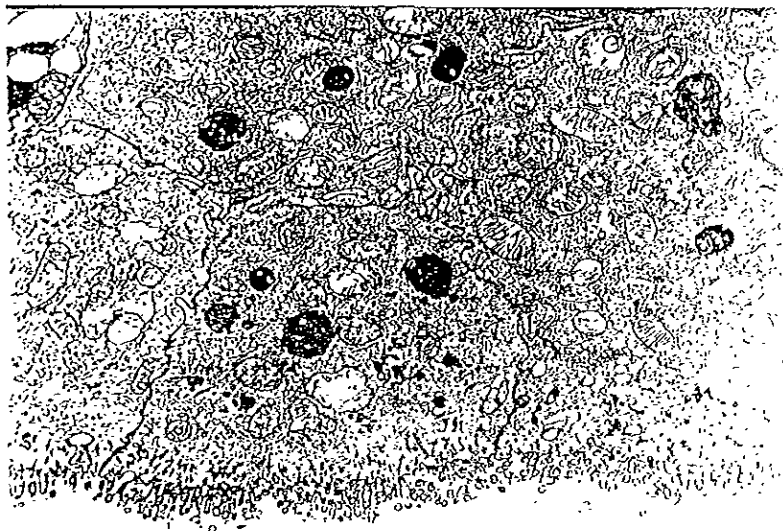


Fig.  
3.7.1.A.

Fig. (3.7.1.A.) Muestra Control. Región de la vellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (3000x).

Fig. (3.7.1.B.) Muestra tratada con ácido tánico. Región de la vellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (6000x).



Fig,  
3.7.1.B.



Fig.  
3.7.1.C.

Fig. (3.7.1.C.) Muestra Control. Región de la Vellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (3000x).

Fig. (3.7.1.D.) Muestra tratada con acido tánico. Región de la vellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (3000x).



Fig.  
3.7.1.D.

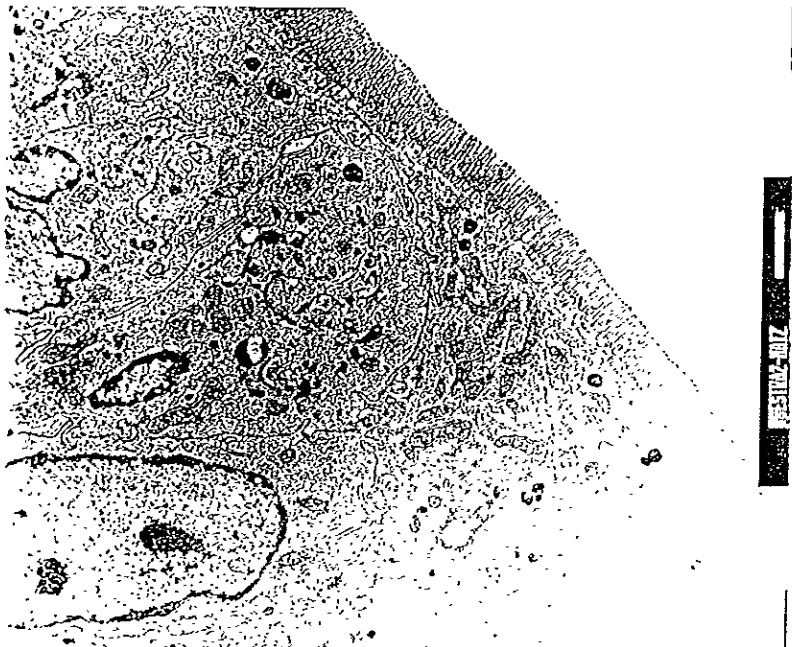


Fig.  
3.7.1.E.

Fig. (3.7.1.E.) Muestra Control. Región de la vellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (4000x).

Fig. (3.7.1.F.) Muestra Tratada con ácido tánico. Región de la vellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (4000x).

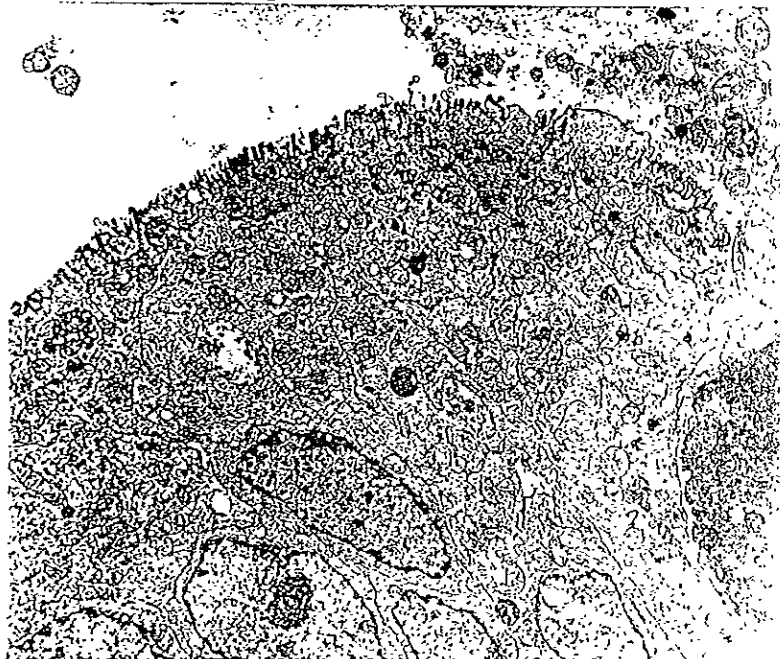


Fig.  
3.7.1.F.



### 3.7.2 ENSAYO BIOLÓGICO CON TANINOS EXTRAIDOS DE FRIJOL NEGRO COCIDO

En los resultados obtenidos con los tratamientos efectuados con el extracto de frijol cocido. La dosis total administrada en los 5g de frijol cocido es de 0.8872mg de ácido tánico. Esta dosis comparada con la tratada con ácido tánico es mucho menor. El propósito en este experimento fue observar si es que existe algún efecto con los taninos propios del frijol con las cantidades que normalmente se ingieren. La dosis diaria admisible (DDA) de ácido tánico es de 500mg /Kg de peso corporal / día.

En la Figura 3.7.2.A que corresponde a la muestra control, de la región de la vellosidad, las microvellosidades tienen apariencia normal, se mantiene su integridad, uniformidad en borde en cepillo, el RER con sus ribosomas, en gran cantidad, al igual que las mitocondrias presentan apariencia normal, se mantiene su doble membrana y las crestas, el velo terminal es muy notorio.

Mientras que en la muestra tratada con el extracto de taninos del frijol que corresponde a la Figura 3.7.2.B se pueden observar las microvellosidades en estado normal, muy parecidos al control, excepto en el tamaño, en este caso parecen estar ligeramente más largas que el control, pero esta diferencia se atribuye a la orientación del corte, pero la morfología del borde en cepillo es muy parecido al control, la diferencia más destacada ocurre en las mitocondrias, que se aprecian ligeramente hinchadas, en comparación con el control, este fenómeno se observa mejor en la Figura 3.7.2.D, en donde incluso algunas han perdido sus crestas o están próximas a perderlas, pero hay que aclarar que no es un efecto uniforme, ya que existen mitocondrias que conservan su estructura normal. El RER, ribosomas, aparato de Golgi, mantienen su apariencia normal.

La microvellosidad se observa con mayor aumento en las Figuras 3.7.2.E y 3.7.2.F, la única diferencia que se alcanza a observar es el largo de las microvellosidades, que como ya se mencionó anteriormente, puede ser debido a la orientación del corte, por el contrario, la estructura se mantiene normal, no se observa destrucción de microvellosidad.

En la zona de la vellosidad, orientada hacia la base de la cripta, se observan una gran cantidad de núcleos (Figuras 3.7.2.G y 3.7.2.H), de apariencia normal, con su cromatina (eucromatina y heterocromatina) distribuidos de manera regular y sus nucleolos. En la Figura 3.7.2.H, que es la tratada con el extracto de taninos, se observa nuevamente el efecto en las mitocondrias, ligeramente inflamadas, algunas empezando a destruirse y a perder las crestas.

En este mismo tratamiento, pero con la dosis de leche, en el tratado (Figura 3.7.2.I) no se observa una integridad celular, la vellosidad se ve difusa y sin forma, a excepción de las mitocondrias, que parece ser que mejoran su estructura a diferencia de las anteriores, pero parecería que hubo una entrada de material que hace que se pierda la uniformidad celular.

En las Figuras 3.7.2.K y 3.7.2.L se observa lo mismo pero a mayor aumento. Nótese que las microvellosidades presentan apariencia normal. Al igual que los núcleos que se presentan en las Figuras 3.7.2.M y 3.7.2.N.

Como es bien sabido en las mitocondrias se genera ATP, por medio del ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa, es por eso que las células que gastan mucha energía, poseen gran cantidad de mitocondrias, y se localizan en la parte donde se necesita más energía (ejemplo: células intestinales), además, contienen gránulos, que son sitios de unión para cationes divalentes, en su matriz, por lo que también regulan la concentración de iones del citosol (Tresguerres 1992). Es por eso que es un organelo de suma importancia a nivel energético, si se toma en cuenta que la rata ha estado en ayuno por 12 horas, y posteriormente le es administrado el extracto de taninos, con el que no se alcanzan a cubrir sus necesidades energéticas, por ser el único alimento ingerido. Con esto, es posible decir que este efecto no resulta directamente relacionado con la dosis de taninos administrada, por el contrario es posible, que con una dieta, en la cual se cubran sus necesidades fisiológicas, junto con el extracto de taninos, este efecto desapareciera. No podemos decir que existe un efecto como el

que se observa en el caso del tratamiento con ácido tánico, ni que existen cambios morfológicos en las mitocondrias, es posible que si existe un efecto sobre ellas, este solo sea temporal, y que si se dejara de dar el tratamiento, el efecto sea reversible.

La explicación fisiológica a esa falta de uniformidad celular, se asemeja a la posibilidad de que los taninos, hayan interactuado con las proteínas receptoras, por lo que hay un bloqueo de sitios de reconocimiento del sustrato, de manera que cuando se administra la dosis de leche, la membrana pierde su selectividad, y es por eso que entra el material sin ser reconocido y seleccionado, por lo que en la fotografía no se observa ninguna uniformidad celular. El cambio de apariencia en las mitocondrias, después de la dosis de leche, puede ser debido a lo anteriormente explicado, al existir un alimento, con nutrimentos energéticos, como es la grasa de la leche, después de que la rata ha estado en ayuno, la mitocondria, tiene apariencia normal a diferencia de la muestra en donde no se administró la dosis de leche.

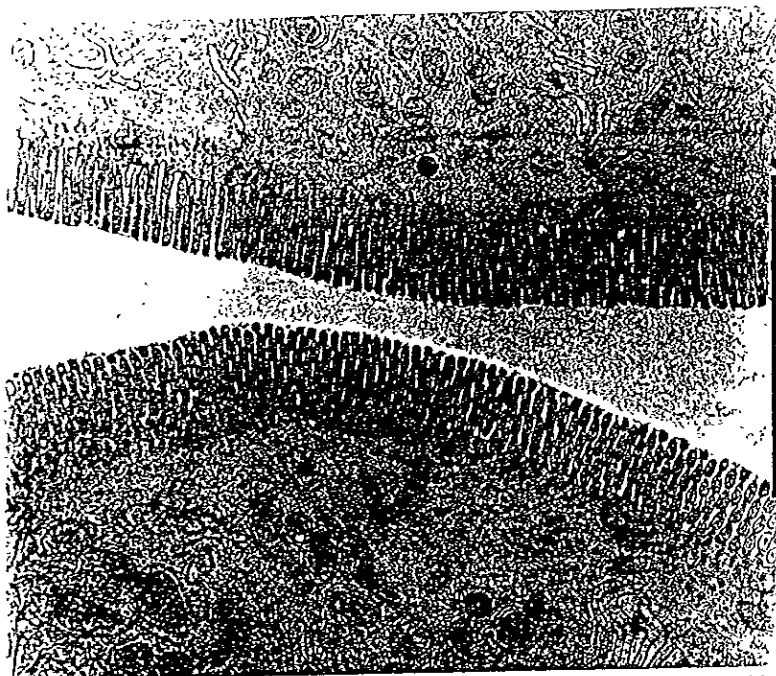


Fig.  
3.7.2.A.

Fig. (3.7.2.A.) Muestra Control. Región de la vellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (8000x)

Fig. (3.7.2.B.) Muestra tratada con taninos extraídos de 5g de Frijol negro cocido. Región de la vellosidad del intestino delgado. Aumento (8000x)

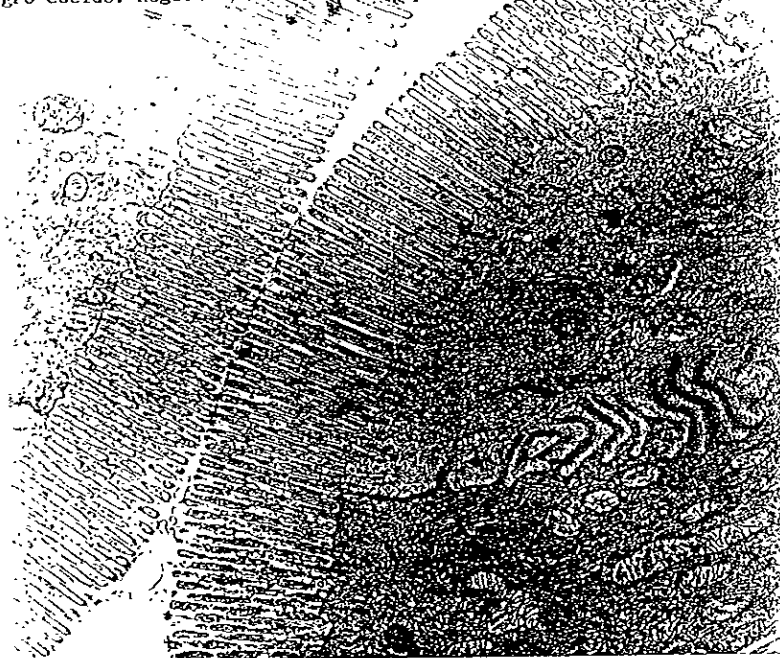


Fig.  
3.7.2.B.

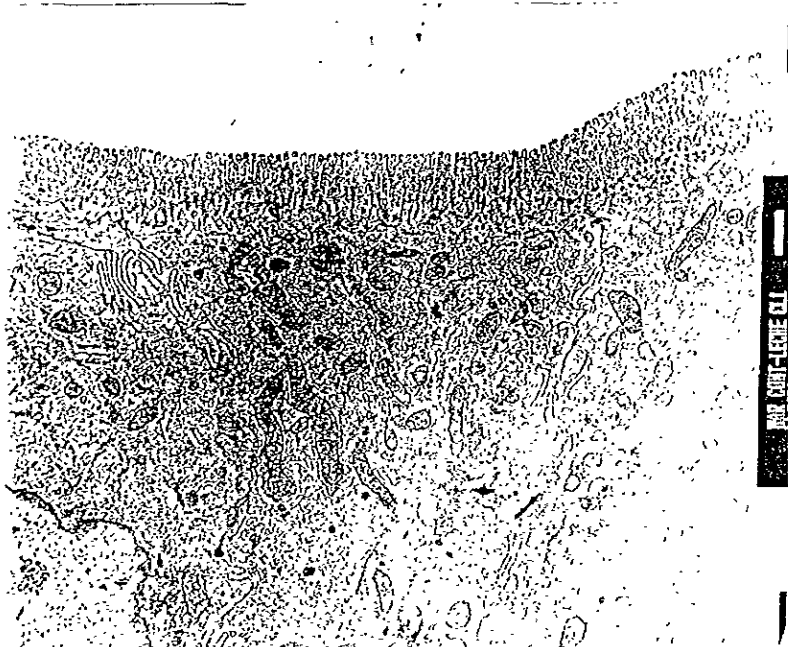


Fig.  
3.7.2.C.

Fig. (3.7.2.C.) Muestra Control. Región de la microvellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (5000x).

Fig. (3.7.2.D.) Muestra tratada con taninos extraídos de Sg de frijol negro cocido. Región de la microvellosidad del intestino delgado. (5000x)

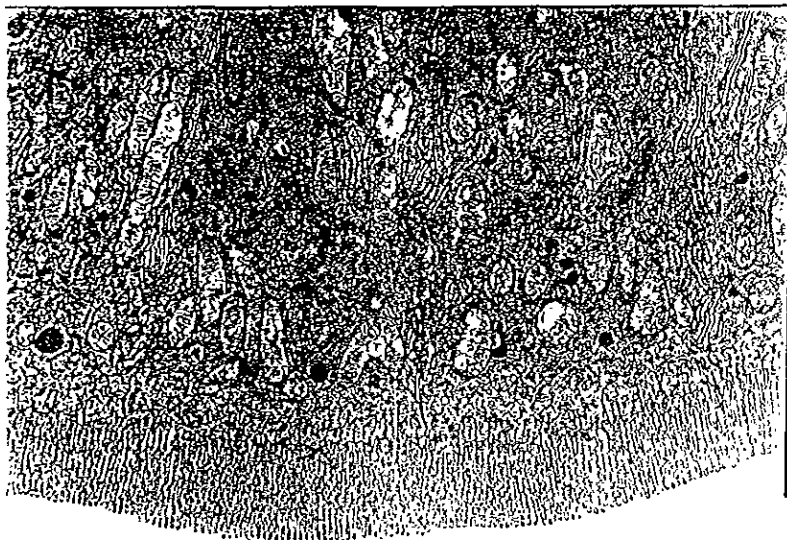


Fig.  
3.7.2.D.

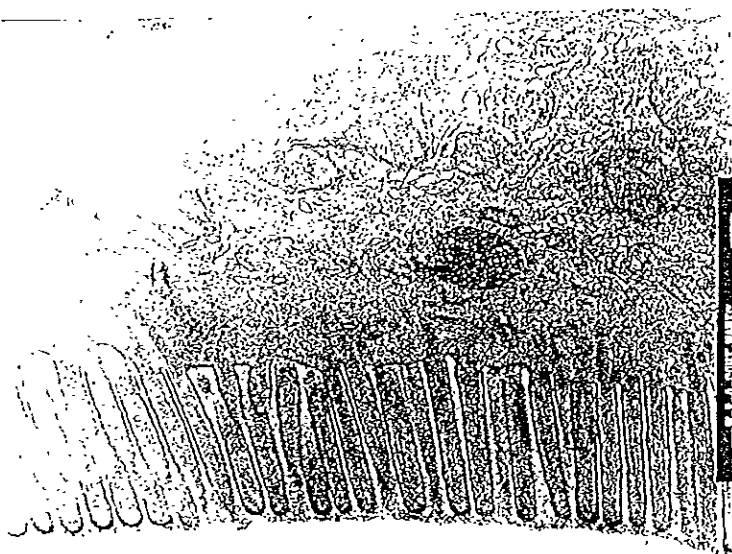


Fig.  
3.7.2.E.

Fig. (3.7.2.E.) Muestra Control. Región de la microvellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (20000x).  
Fig. (3.7.2.F.) Muestra tratada con taninos extraídos de 5g de frijol negro cocido. Región de la microvellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (20000x).

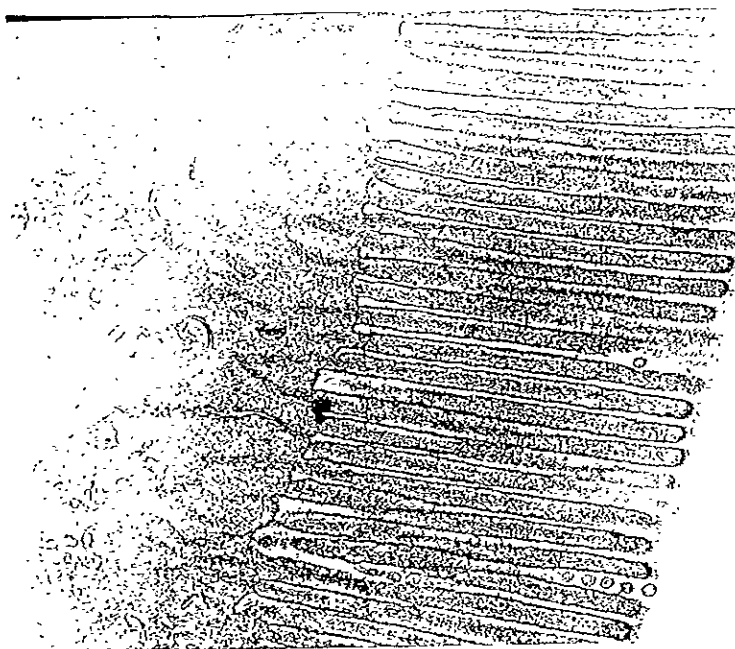


Fig.  
3.7.2.F.

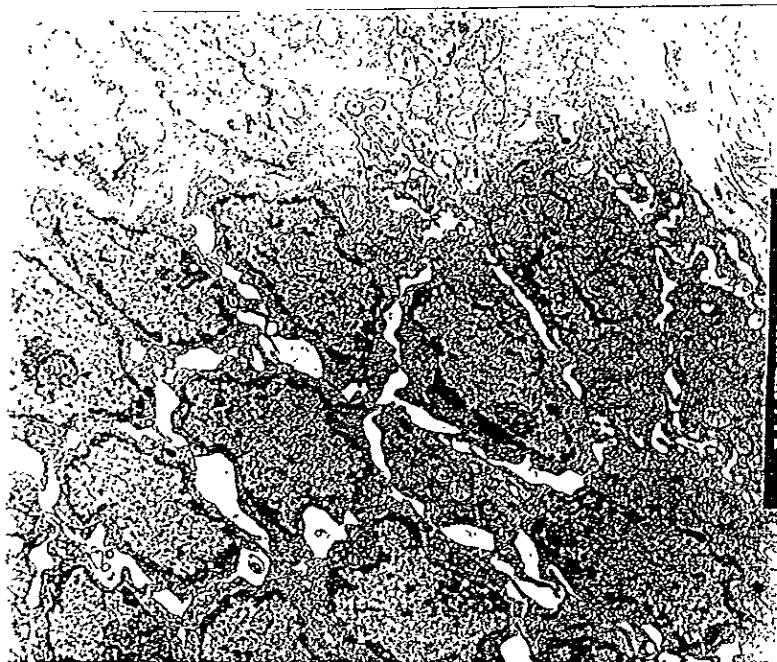


Fig.  
3.7.2.G.

Fig. (3.7.2.G.) Muestra Control. Región de la base de la vellosidad del intestino delgado (duodeno), núcleos. Aumento (5000x).

Fig. (3.7.2.H.) Muestra tratada con taninos extraídos de 5g de frijol negro cocido. Región de la base de la vellosidad del duodeno. Aumento (5000x).



Fig.  
3.7.2.H.

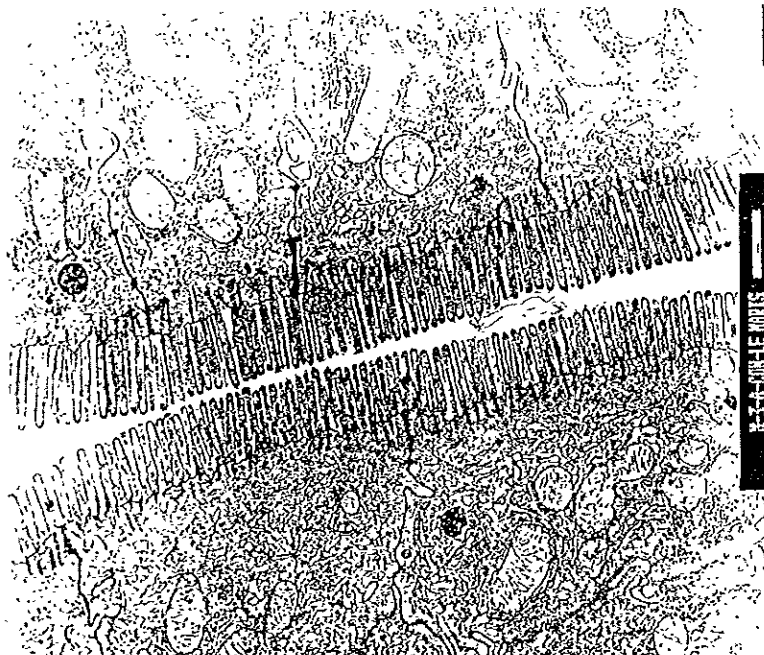


Fig.  
3.7.2.I.

Fig. (3.7.2.I.) Muestra Control-Leche. Región de la microvellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (8000x).  
Fig. (3.7.2.J.) Muestra tratada con taninos extraídos de 5g de frijol negro cocido + Leche. Región de la microvellosidad del duodeno. (8000x).

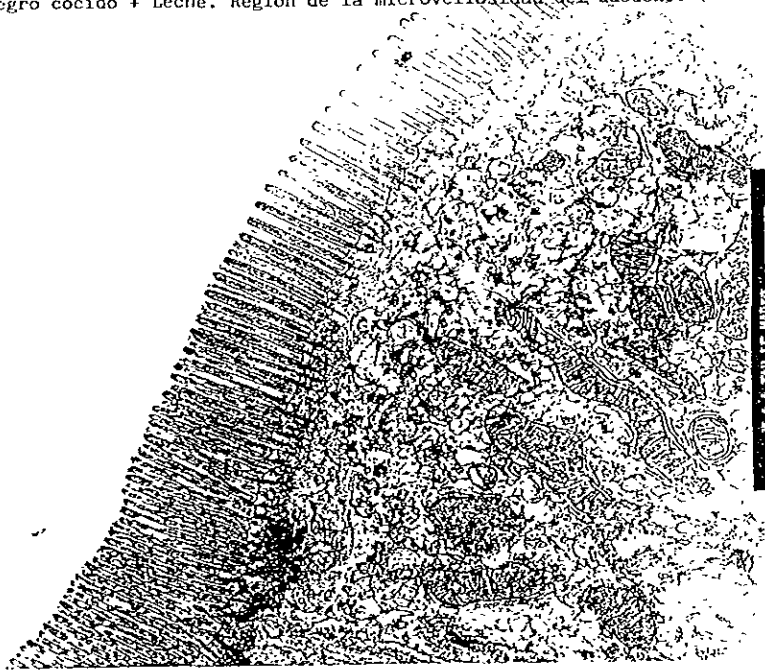


Fig.  
3.7.2.J.



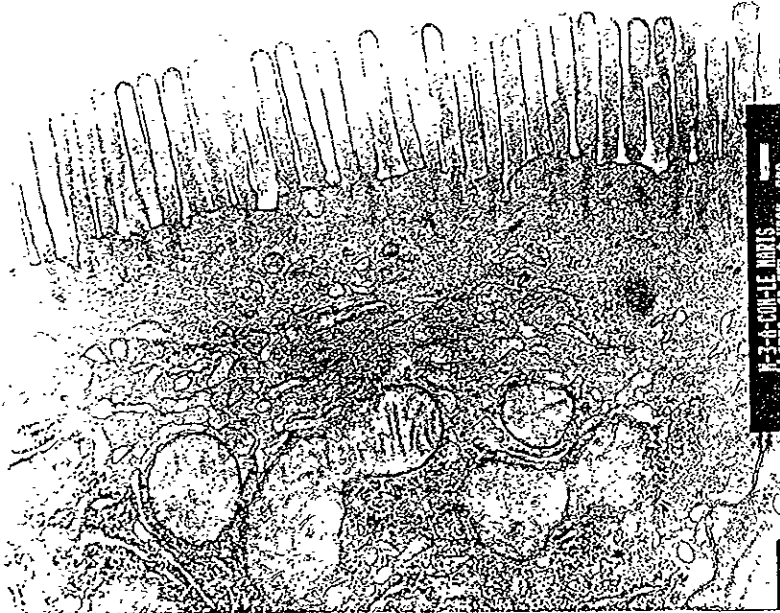


Fig.  
3.7.2.K.

Fig. (3.7.2.K.) Muestra Control- Leche. Región de la microvellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (20000x).

Fig (3.7.2.L.) Muestra tratada con taninos extraídos de 5g de frijol negro cocido + Leche. Región de la microvellosidad del duodeno. Aumento (20000x)

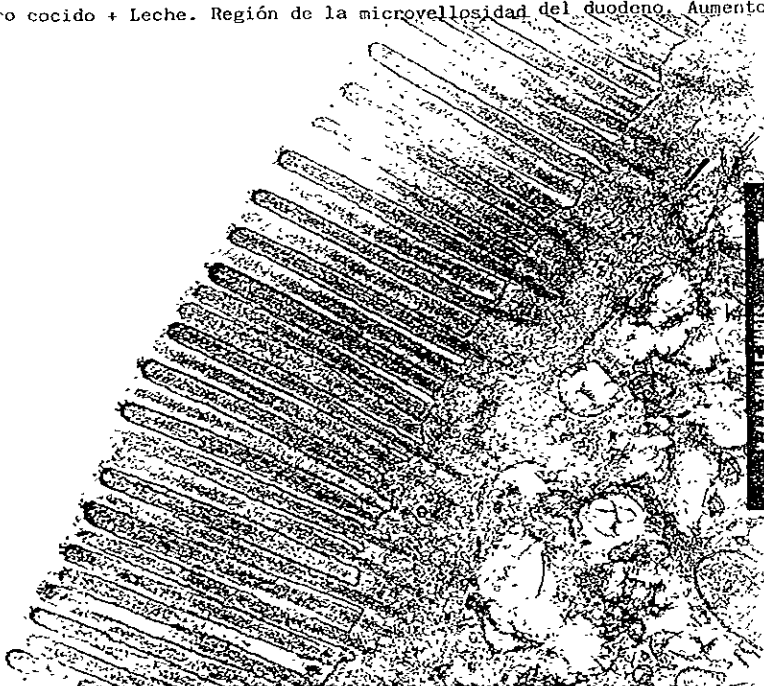


Fig.  
3.7.2.L.

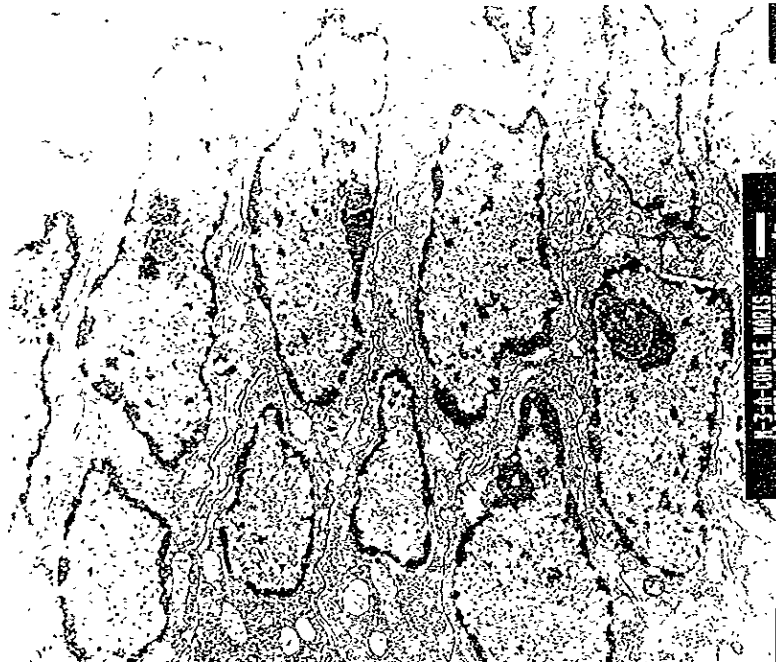


Fig.  
3.7.2.M.

Fig. (3.7.2.M.) Muestra Control-Leche. Región de la base de la vellosidad del duodeno, núcleos. Aumento (5000x).

Fig. (3.7.2.N.) Muestra tratada con taninos extraídos de 5g de frijol negro cocido + Leche. Región de la base de la vellosidad, núcleos. Aumento (5000x).



Fig.  
3.7.2.N.

### 3.7.3. ENSAYO BIOLÓGICO DE TANINOS EXTRAIDOS DE 10g FRIJOL NEGRO COCIDO

Se realizó el segundo ensayo biológico, pero ahora con un extracto de taninos de 10g de frijol negro, que sigue siendo pequeña la dosis en comparación con la administrada con ácido tánico. La dosis en este caso es de 1.6820mg de ácido tánico. Las muestras no presentan diferencias con el tratamiento anterior, excepto por las mismas aclaraciones.

Las Figuras 3.7.3.A y 3.7.3.B que corresponden a la muestra control y tratada respectivamente, muestran la región de la microvellosidad en donde no se observa ningún cambio morfológico que nos indique daños a la célula, a excepción de las mitocondrias que aumentan ligeramente de tamaño, información difícil de determinar, puesto que el resto de los demás organelos no muestran cambio en su morfología, por el contrario mantienen su integridad celular. Muestra de ello es la Figura 3.7.3.D en el que se muestra la región de la vellosidad y en donde se aprecian los núcleos con su morfología normal.

Con el tratamiento con leche, que corresponden a las Figuras 3.7.3.E y 3.7.3.F, se aprecia el mismo efecto que sucede con el tratamiento anterior, es decir las mitocondrias presentan morfología normal, en comparación con el tratamiento sin la dosis de leche, puede ser que la membrana pierde su selectividad, ya que hay ciertas partes en la célula en donde no hay uniformidad, la célula se ve difusa y sin ordenamiento, al igual que en las Figuras 3.7.3.H y 3.7.3.I, en donde se observa lo mismo. Según fuente importante, este fenómeno es artefacto de fijación, hecho que descartamos, porque este efecto sucede únicamente con los tratamientos del extracto de taninos y en donde se aplicó una última dosis de leche, además de que se realizó por duplicado, con 2 ratas diferentes, y se observa el mismo efecto.

Pero, no es válido, argumentar que la teoría aquí propuesta es universal y general, la explicación propuesta se limita a las condiciones experimentales en la cual se desarrolló la parte experimental, de ahí que se llega a la determinación de que la morfología en general se encuentra en estado normal.

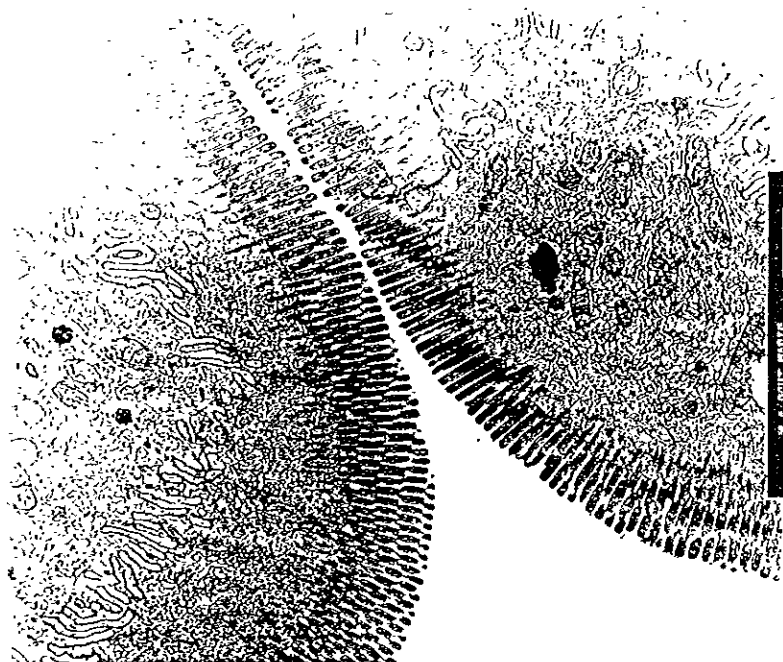


Fig.  
3.7.3.A.

Fig. (3.7.3.A.) Muestra Control. Región de la microvellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (8000x).

Fig. (3.7.3.B.) Muestra tratada con taninos extraídos de 10g de frijol negro cocido. Región de la microvellosidad del duodeno. Aumento (8000x).

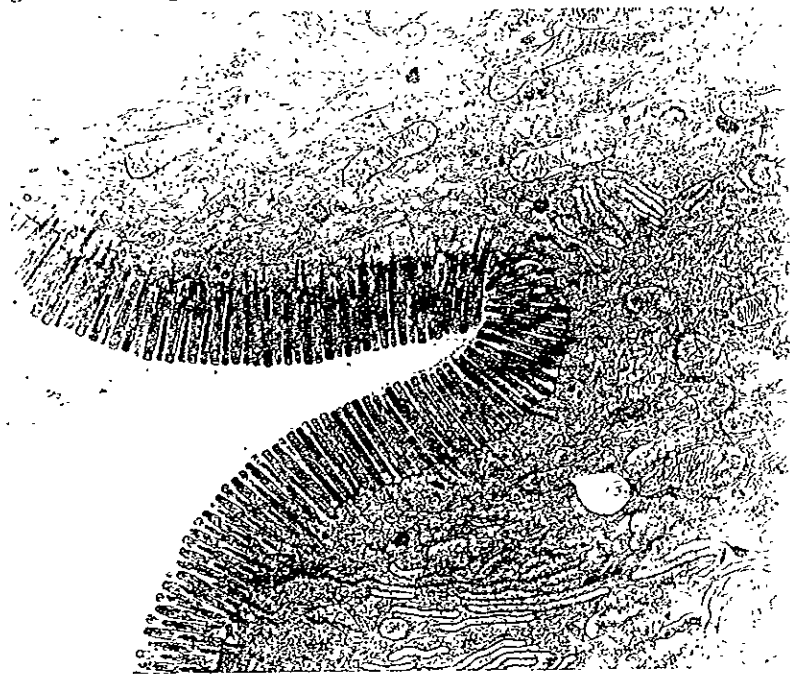


Fig.  
3.7.3.B.

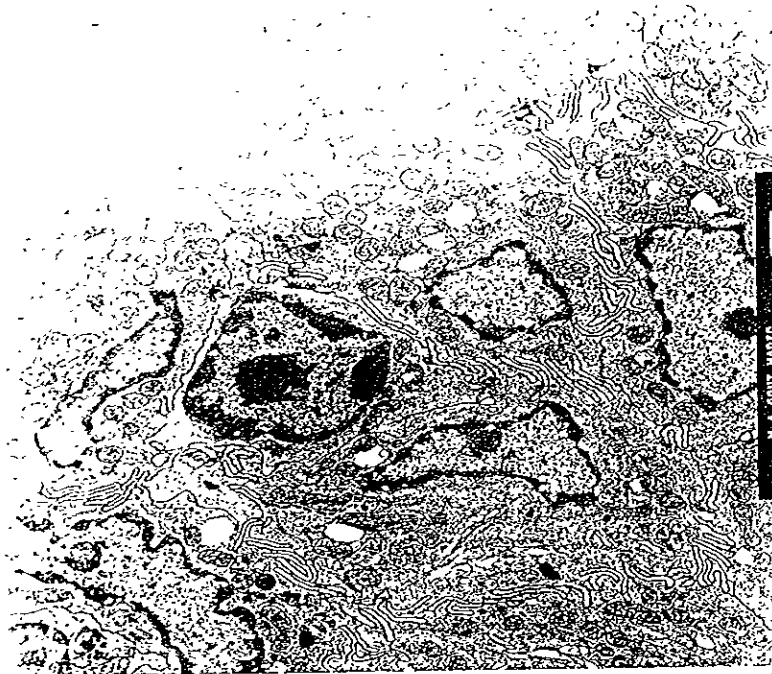


Fig.  
3.7.3.C.

Fig. (3.7.3.C.) Muestra Control. Región de la base de la vellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (5000x).

Fig. (3.7.3.D.) Muestra tratada con taninos extraídos de 10g de frijol negro cocido. Región de la base de la vellosidad (duodeno). Aumento (5000x)

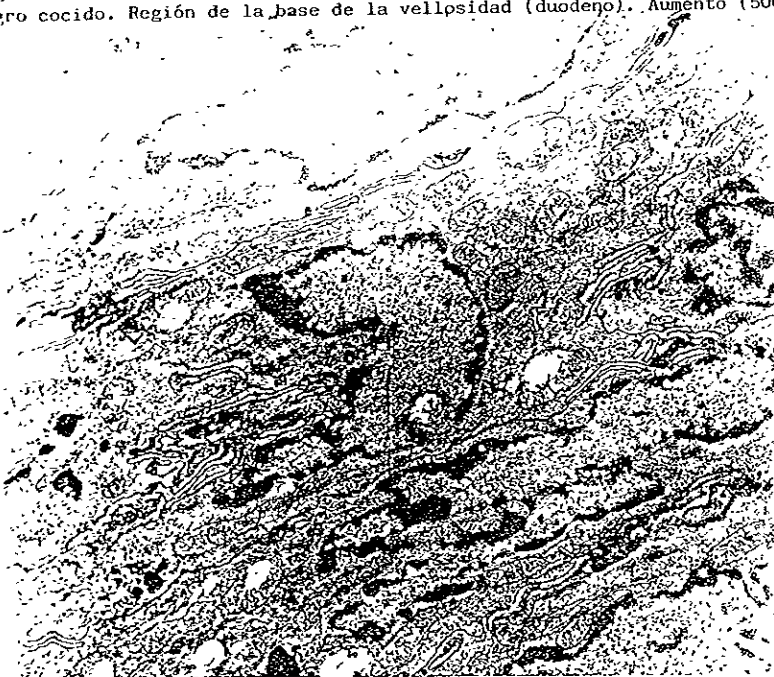


Fig.  
3.7.3.D.

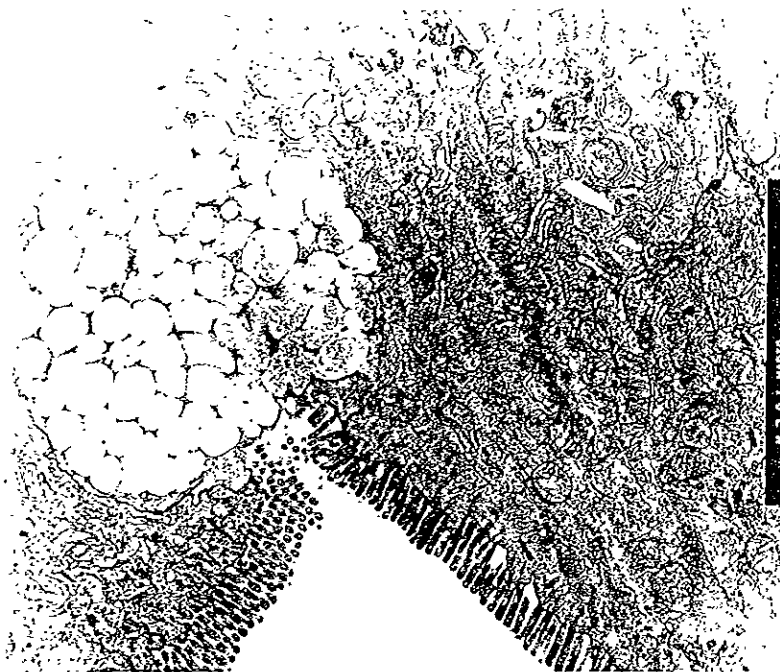


Fig.  
3.7.3.E.

Fig. (3.7.3.E.) Muestra Control- Leche. Región de la microvellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (8000x).

Fig. (3.7.3.F.) Muestra tratada con taninos extraídos de 10g de frijol negro cocido + Leche. Región de la microvellosidad del duodeno. (8000x).

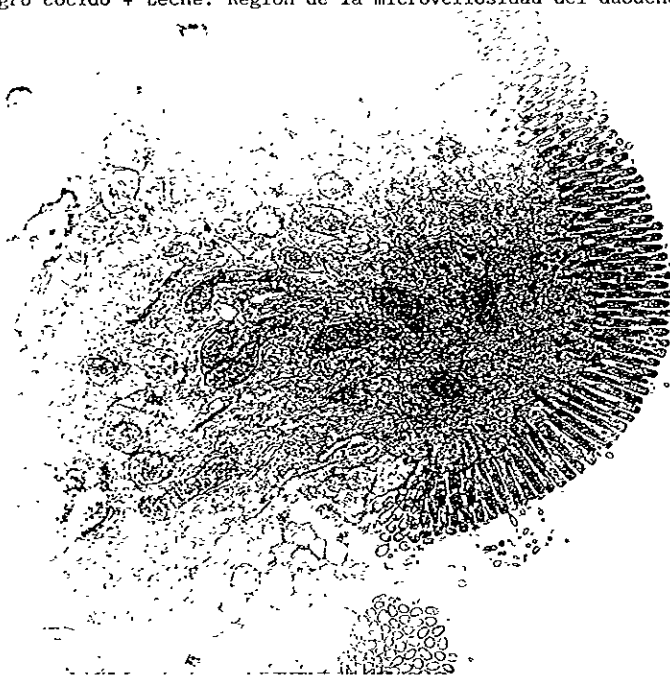


Fig.  
3.7.3.F.

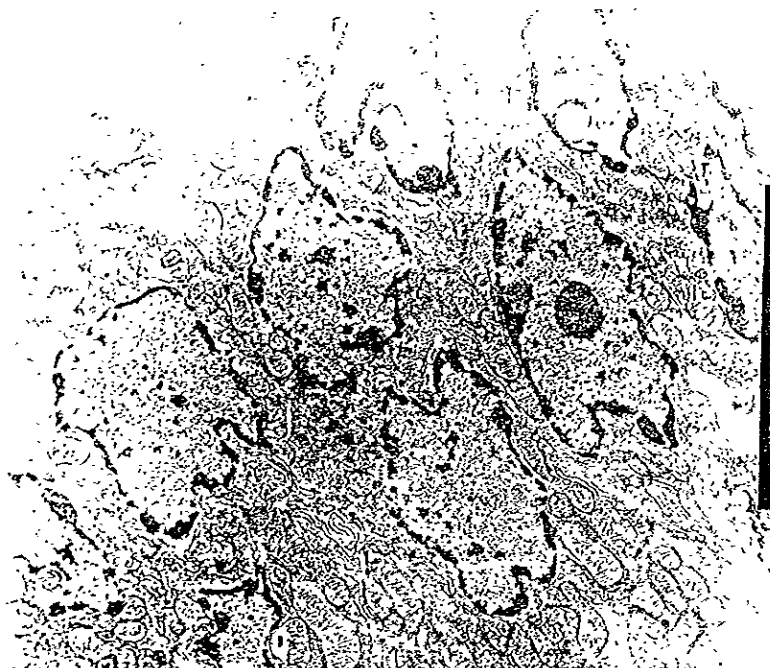


Fig.  
3.7.3.G.



Fig. (3.7.3.G.) Muestra Control- Leche. Región de la base de la vellosidad del intestino delgado (duodeno). Aumento (5000x).

Fig. (3.7.3.H.) Muestra tratada con taninos extraídos de 10g de frijol negro cocido + Leche. Región de la base de la vellosidad. Aumento (5000x).

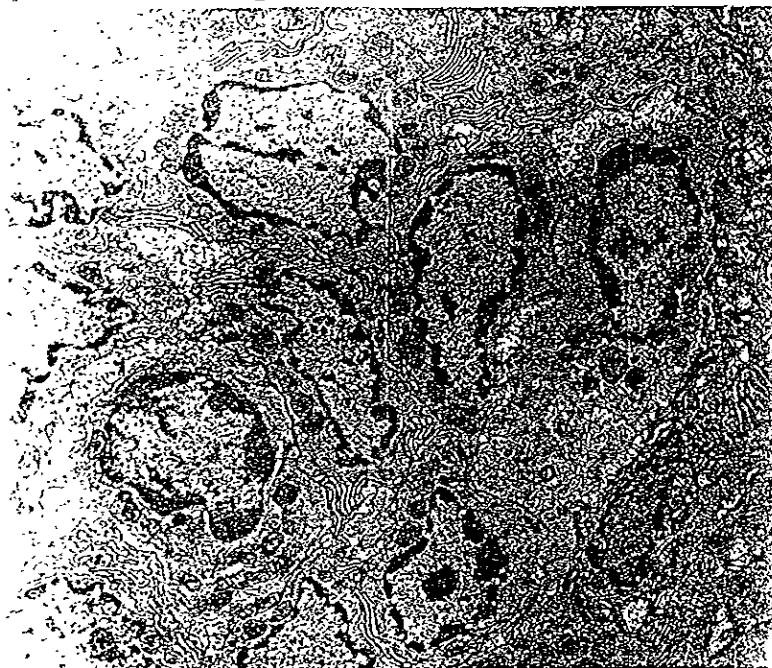


Fig.  
3.7.3.H.

#### IV. CONCLUSIONES

- ❖ El disolvente Dimetilformamida al 75%, empleado para la extracción de taninos en las muestras estudiadas, otorga porcentajes de recuperación altos. En este caso es el más eficiente en conjunto con el método ISO 9648:1988.
- ❖ El método ISO-9648-1988 de determinación de taninos en sorgo, con las correcciones mencionadas, se aplica para las semillas de leguminosas (frijol blanco y frijol negro), con resultados confiables.
- ❖ Para el frijol blanco, frijol negro y sorgo es conveniente realizar la molienda del grano cada vez que se realiza la determinación.
- ❖ Los extractos ya preparados con el disolvente de extracción, no pueden ser almacenados, debido a la inestabilidad de los polifenoles, que se presenta después del almacenamiento, dando resultados sobreestimados.
- ❖ Los datos de concentración de frijol negro crudo en comparación con los del frijol negro cocido, disminuyen en un 34% de un 100% que se encuentra en la semilla cruda, bajo las condiciones experimentales que aquí se exponen, es decir, cocimiento en agua, sin remojo y sin lavados.
- ❖ En el agua de remojo, se encontraron taninos presentes, por lo que sí existe una solubilización de ellos en agua. Y es muy probable que si se desecha ésta agua de remojo, se elimine un porcentaje del 2% de taninos.



- ❖ El efecto que se observa a nivel ultraestructural en el ensayo biológico con ácido tánico, a nivel de microvellosidad, presenta destrucción del borde en cepillo con presencia de cuerpos de inclusión que parece ser el ácido tánico que se administró en muy altas concentraciones y también se observa una ligera hinchazón de las mitocondrias, donde algunas han perdido su membrana interna y las crestas. *La pérdida del borde en cepillo, a nivel fisiológico puede provocar la pérdida de la función de enzimas importantes que se encuentran localizadas a este nivel, como son las disacaridasas, peptidasas proteínas no enzimáticas como son las receptoras y transportadoras, lo que trae como consecuencia una pérdida de absorción, secreción y selectividad de membrana.*
  
- ❖ No se presentan cambios relevantes a nivel ultraestructural en el ensayo biológico efectuado con los extractos de taninos de frijol negro. La microvellosidad a diferencia del tratamiento con ácido tánico, no presenta ninguna alteración, por el contrario se mantiene su uniformidad y estructura. Los demás organelos presentan morfología normal. Las mitocondrias presentan un ligero aumento de su tamaño normal, algunas se observan vacías, debido en parte al efecto visual que provoca el hinchamiento, pero no presentan destrucción total, y no sucede en todas las mitocondrias. Por lo que no se puede argumentar que existe un efecto tóxico a nivel de mucosa intestinal.

## V. BIBLIOGRAFIA

1. Barroga Ch., Laurena A.C., Mendoza E. M. **Polyphenols in Mung Bean (*Vigna radiata*): Determination and Removal**; J. Agric. Food Chem. 33, 1006-1009, (1985).
2. Bate-Smith. E.C. **Haemanalysis of Tannins. The Concept of Relative Astrigency**. Phytochemistry. 12, 907-912, (1973).
3. Bate-Smith. E.C. **Astringent Tannins of Acer Species**. Phytochemistry. 16, 1421-1426, (1977).
4. Bate-Smith. E.C. **Astringent Tannins of the Leaves of Geranium Species**. Phytochemistry. 20, 211-216, (1981).
5. Bate-Smith. E.C. **Phytochemistry of Proanthocyanidins**. Phytochemistry. 14, 1107- 1113, (1975).
6. Beasley T.H., Ziegler H.W., Bell A.D. **Determination and Characterization of Gallotannin by High Performance Liquid Chromatography**. Analytical Chemistry. 49, 238-243, (1977).
7. Benninger C.W. and Hosfield G.L. **Flavonol Glycosides from the Seed Coat of a New Manteca Type Dry Bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**. J. Agric. Food. Chem. 46. 2906-2910. (1998).
8. Beumer H., Vooijs A.J., Jurgens A. And Maanen V.J.F.C. **Effects of Chemical Treatments, Pelleting or Extrusion on the Elimination of Antinutritional Factors in *Phaseolus vulgaris* beans**. 3<sup>rd</sup> Int. Workshop on Antinutritional Factors in Legume seeds and rapessed. 391-397. (1998).
9. Borges G., Benshimol L. and Carmona A. **Interaction of Bean Tannins with *Phaseolus vulgaris* Proteins**. 3<sup>rd</sup> Int. Workshop on Antinutritional Factors in Legume seeds and rapessed. 301- 305. (1998).
10. Bos. K.D. and Jetten J. **Determination of Tannins in Faba Beans**. 1<sup>st</sup> Int. Workshop on Antinutritional Factors in Legume Seeds. 168-171. (1988).
11. Bressanni R. and Elias L.G. **Nutritional Value of Legume Crops from Humans and Animals**. Advances in Legumes and Science. 1, 135-155, (1980).

12. Bressanni R. and Elias L.G. **Proceedings of the Symposium on Polyphenols in Cereals and Legumes.** Advances in Legumes and Science. 61-81, (1979)
13. Carmona A , Seidl D.S. and Jafflé W.G. **Comparison of Extraction Methods and Assay Procedures of the Determination of the Apparent Tannin Content of Common Beans.** J. Sci. Food. Agric. 56, 291-301, (1991).
14. Chang M.J., Collins J.L., Bailey J.W. and Coffey D.L. **Cowpeas Tannins Related to Cultivar, Maturity, Dehulling and Heating.** J. of Food Science. 59. 5. 1035-1037. (1994).
- 15 Goena M., Santidrián S., Cuevillas F. and Larralde J. **Rate of Muscle Protein Synthesis in Field Bean (Vicia faba) Fed Growing Rats.** Rev. Esp. Fisiology. 40. 123-124. (1984).
16. González M. M.G. **Técnicas en Biología Celular.** México. Primera edición. AGT editores. S.A. 23-64, 157-176. (1996).
17. Griffiths D.W. **The Inhibition of Digestive Enzymes by Polyphenolic Compounds.** In **Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods.** Friedman M. Ed. Plenum Press. New York. 509-516. (1986).
18. Haggerman A.E. **Choosing Apropriate Methods and Standards for Assaying Tannins.** J. Chem.Ecology. 15. 1795-1810. (1998).
19. Haggerman A.E. and Buttler L.G. **Protein Precipitation Method for the Quantitative Determination of Tannins.** J. Agric. Food Chem. 26, 809-812, (1978).
20. Haggerman A.E., Reidl K.M., Jones J.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W. and Riechel T.L. **High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants.** J. Agric. Food Chem. 46. 1887-1892. (1998).
21. Haggermann A.E., Zhao Y. and Johnson S. **Methods for Determination of Condensed and Hydrolizable Tannins.** **Antinutrients and Phytochemicals in Food.** American Chemical Society. 12, 209-221, (1997).
22. Hill G. D., Tamminga S. **The Effects of Antinutritional Factors in Legume Seed and Rapeseed on Ruminant Nutrition.** 3<sup>rd</sup> Int. Workshop on Antinutritional Factors in Legume seeds and rapeseed. 157-166. (1998).
23. ISO 9648:1988; **Determination of Tannin Content in Sorghum;** First edition, 1988-12-15.

24. Kumar R. and Singh M. **Tannins: Their Adverse Role in Ruminant Nutrition.** J. Agric. Food. Chem. 32, 3, 447-453, (1984).
25. Lidner E. **Toxicología de Alimentos.** Editorial Acribia. 2ª edición. Zaragoza España. 176-190. (1995).
26. Liener I.E **Toxic Constituents of Plant Foodstuffs.** Academic Press, New York; 254- 270. (1980).
27. Makkar H.P.S. and Becker K. **Vainillin-HCl Method for Condensed Tannins: Effect of Organic Solvents used for Extraction of Tannins.** J. Chemical Ecology. 19, 4, 613-62, (1993).
28. Marquardt R. R. **Dietary Effects of Tannins, Vicine and Convicine.** 1<sup>st</sup> International Workshop of Antinutritional Factors in Legume Seeds. 141-155 (1988).
29. Miyamoto K., Murayama T., Yoshida T., Hatano T. and Okuda T. **Anticarcinogenic Activities of Polyphenols in Food and Herbs;; Antinutrients and Phytochemicals in Food.** American Chemical Society. Chapter 14, 245-259, (1997).
30. Motilva M. J. Martinez J. A. Ilundain A. Larralde J. **Effect of Extracts from Bean (Phaseolus vulgaris) and Field Bean (Vicia Faba) on Intestinal D-Glucose Transport in Rat in Vivo;** J. Sci. Food Agric. 34. 239-246. (1983).
31. Naczk M. and Shahidi F. **Nutritional Implications of Canola Condensed Tannins.** American Chemical Society. 186-208, (1997).
32. Naczk M. and Nichols T. **Condensed Tannins in Canola Hulls.** J. Agric. Food. Chem. 42. 2196-2200. (1994).
33. Nehad M.A. **Effects of Presoaking on Faba Bean Enzyme Inhibitors and Polyphenols after Cooking.** J. Agric. Food Chem. 38. 1479-1482. (1990).
34. Ologhobo A. D., Idowu J.I., Iyaniwura E.O. and Sadiq A A. **The Effect of Residual Tannins and Phytic Acid in Cooked Legumes on Apparent Protein Digestibility in the Intestinal Tract of Broiler Chicks.** 3<sup>rd</sup> Int. Workshop on Antinutritional Factors in Legume seeds and rapessed; 441-444. (1998).

35. Pope H.O., Pattern J. R., Lawrence A. L. **The Effect of Raw Soya Bean on in Vitro Active and Passive Accumulation by Rat Small Intestine.** *Britt J Nutrition.* 33. 117-125. (1975).
- 36 Porter L.J. **In Methods in Plant Biochemistry. Plant Phenolics;** Harborne, J.B. Ed. Academic Press NY, NY. 389-419, (1989).
- 37 Porter L.J., Hrstich L N , and Chan B C. **The Conversion of Procyanidins and Prodelphinidins to Cyanidin and Delphinidin.** *Phytochemistry.* 25, 223-230, (1986)
38. Price M.L. and Buttler L.G **Rapid Visual Estimation and Spectrophotometric Determination of Tannin Content of Sorghum Grain** *J. Agric. Food. Chem.* 25, 1268-1273, (1977).
- 39 Price M.L., Scoyoc V.S and Buttler L.G. **A Critical Evaluation of the Vainillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain.** *J. Agric Food Chem* 26, 1214-1218, (1978).
- 40 Prior R L. Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner N , Ehlenfeldt M., Kaldt W., Krewer G and Mainland C.M. **Antioxidant Capacity as Influenced by Total Phenolic and Antocyanin Content, Maturity, and Variety of Vaccinium Species.** *J. Agric. Food Chemistry.* 46 2686-2693. (1998).
- 41 Rubio L. A. Brenes A. **Effects of Raw and Autoclaved faba beans (*Vicia faba* L.) and Faba Bean Fractions on the Intestinal Physiology and Histological Structure in Chicks** <sup>1<sup>st</sup></sup> International Workshop of Antinutritional Factors in Legume Seeds. 164-167 (1988).
- 42 Santidrián S. **Intestinal Absorption of D-glucose, D-galactose and L-leucine in Male Growing Rats Fed a Raw Field Bean (*Vicia faba* L) diet.** *J. Anim Sci.* 53 414- 419 (1981)
- 43 Santidrián S. Marzo F. **Effect of Feeding Acid and Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*) on the intestinal Absorption of D-Galactose and L- leucine in Chickens;** *J. Sci Food Agric.* 435-442. (1989)
- 44 Santidrián S., Marzo F. and Larralde J. **Liver Hydrolitic Activity in Growing Male Rats Fed a Raw Kidney Bean (*Phaseolus vulgaris*) Diet.** *Nutrition reports international* 116 821-829. (1986)
- 45 Sotelo A., , González L.A., González G.T. Velasco.E. and Feria V.A **Ultrastructural Changes of Epithelial Intestinal Cells Induced by the Ingestion of Raw *Phaseolus acutifolius*.** *Nutrition Reports International;* 27 2 Febrero 329- 337 (1983).

- 46 Tanguy M., Guillaume J., Kossa A. **Condensed Tannins in Horse Bean Seeds Chemical Structure and Apparent Effects on Poultry**; *J. Sci. Food Agric.* 28. 757-765. (1977).
47. Trugo. L.C., Von Baer. D. **Analytical Methods for the Analysis of Antinutritional Factors in Legume Seeds.** 3<sup>rd</sup> Int Workshop on Antinutritional Factors in Legume seeds and rapessed. 11-29 (1998).
48. Velioglu Y.S., Mazza G., Gao L. and Oomah B.D. **Antioxidant Activity and Total Phenolics In Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products.** *J. Agric. Food. Chem* 46. 4113-4117. (1998).
49. Vidal V. C , Frias J., Estrella I., Gorospe M.J., Ruiz R. and Bacon J. **Effect of Precessing on some Antinutritional Factors of Lentils.** *J. Agric. Food Chem.* 42 2291-2295 (1994)
- 50 Wilson T.C. and Haggerman A.E. **Quantitative Determination of Ellagic Acid.** *J. Agric. Food. Chem.* 38, 1678-1683, (1990).
- 51 Williams V.M., Porter L.J. and Hemmingway R.W. **Molecular Weight Profiles of Proanthocyanidin Polymers.** *Phytochemistry.* 22, 569-572, (1983).