

PAPEL DE LOS POLIFENOLES EN EL BAJO VALOR NUTRITIVO DE LA *Vicia faba*

M. R. Villanueva¹, J. A. Martínez² y J. Larralde³

Departamento de Fisiología y Nutrición
Universidad de Navarra
Pamplona, España

RESUMEN

La inclusión de harina de habas (*Vicia faba*) en la dieta de animales de experimentación produce un retardo en el crecimiento, semejante al inducido por la adición de 0.20% de ácido tánico en dietas control de caseína. Tanto los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de semillas de habas como los taninos extraídos de las mismas, reducen la absorción intestinal de glucosa. Asimismo, la presencia de ácido tánico al 0.05, 0.1 y 0.20% en las soluciones de glucosa, disminuye proporcionalmente la absorción de ésta por el intestino. Los resultados en cuestión parecen sugerir que los polifenoles afectan, al menos parcialmente, el valor nutritivo de la leguminosa (*Vicia faba*), si bien otros componentes de las mismas también podrían estar involucrados.

INTRODUCCION

Las leguminosas constituyen una importante fuente de proteínas, tanto en la alimentación humana como animal (1, 2). No obstante, la presencia de determinadas sustancias consideradas antinutricionales, por ejemplo, lectinas, hemaglutininas, inhibidores de proteasas, polifenoles, etc. (3, 4) y su bajo contenido en aminoácidos azufrados (4), reducen su valor nutritivo cuando se emplean en estado crudo. Entre los fenómenos adversos observados existe una reducción en el crecimiento (5), alteraciones en la actividad de diferentes enzimas (6, 7), disminución de la retención nitrogenada (8), y otros (9). En este contexto, también se ha puesto de manifiesto que la absorción intestinal de glucosa, galactosa y leucina se

Manuscrito modificado recibido: 6-1-87.

1 Adjunto de Bromatología, Universidad de Navarra, Pamplona, España.

2 Adjunto de Fisiología y Nutrición de la misma Universidad, y Colaborador del CSIC.

3 Catedrático de Fisiología, Universidad de Navarra y Director de la Sección de Nutrición Animal del CSIC.

encuentra reducida en aquellos animales alimentados con *Vicia faba* como fuente de proteína (10). En un intento por contribuir a la identificación de las sustancias antinutricionales implicadas en alteraciones del proceso de absorción, se llevó a cabo una serie de experimentos en los que se estudió la influencia de extractos obtenidos de *Vicia faba*, de polifenoles aislados de la misma, y del ácido tánico sobre el transporte intestinal de glucosa. Se determinó, asimismo, el efecto del agregado de ácido tánico a una dieta de caseína sobre el crecimiento corporal.

MATERIAL Y METODOS

Animales y Dietas

Tres lotes de ocho ratas hembra de la raza Wistar, con pesos comprendidos entre 91 y 99 g, se alojaron en jaulas metabólicas, bajo condiciones ambientales adecuadas. A cada uno de los lotes —en régimen de ingesta controlada— se les proporcionó durante siete semanas, las dietas siguientes: lote 1 (dieta de caseína 18.80/o), lote 2 (dieta de *Vicia faba* 18.60/o de proteína) y lote 3 (dieta de caseína 18.80/o + 0.20/o ácido tánico Merck^R). La composición porcentual de las dietas ya ha sido descrita previamente (5). Las semillas de *Vicia faba* fueron molidas para preparar las dietas, incluyendo los tegumentos, ya que es en esta fracción donde se encuentran los polifenoles. Los animales se pesaron diariamente, y tuvieron libre acceso al agua de bebida. El índice de transformación (I. T.) fue calculado como la relación entre la ingesta (g) y el incremento de peso (g) a lo largo de las siete semanas de experimentación (Tabla 1).

TABLA 1

VARIACIONES DE PESO, INGESTA DIARIA E INDICE DE TRANSFORMACION EN RATAS ALIMENTADAS DURANTE SIETE SEMANAS CON LAS DIETAS RESEÑADAS

	Caseína 18.80/o	<i>Vicia faba</i> 18.60/o	Caseína 18.80/o + Acido tánico 0.20/o
Peso inicial (g)	94.5 ± 2.3	96.0 ± 3.1	95.2 ± 2.5
Peso final (g)	198.3 ± 4.3	166.1 ± 3.9**	169.0 ± 5.1**
Ganancia diaria (g/día)	2.20 ± 0.22	1.53 ± 0.30**	1.58 ± 0.36**
Ingesta diaria (g/día)	11.7 ± 0.8	11.6 ± 1.1	11.8 ± 1.6
Indice de transformación (I.T.)	5.40 ± 0.61	8.13 ± 0.93**	7.75 ± 0.71**

Medias ± DE (n = 8). Grado de significación de las diferencias respecto al control:
* P < 0.05; ** P < 0.01.

Técnica de Absorción

Se emplearon ratas hembra (120 a 160) de la raza Wistar. El estudio de la influencia de los diferentes productos sobre la absorción intestinal se llevó a cabo mediante la técnica de absorciones sucesivas *in vivo* (11). En síntesis, los animales se anestesian con uretano 12.5% (1 ml/100 g) y se sitúan en una cámara de temperatura controlada (35-37°C). A continuación se les practica una laparatomía, procediéndose a canular una zona de entrada y otra de salida en el yeyuno, separadas por 15-20 cm. Posteriormente se cierra la cavidad abdominal con un clip y se conecta la cánula de entrada a una bomba de perfusión por donde se introducen las soluciones a estudiar. En nuestro caso, glucosa 2mM en presencia de extractos de *Vicia faba*, taninos aislados de la misma leguminosa o de ácido tánico 0.05, 0.1 y 0.2%. Se realizaron cuatro absorciones sucesivas en cada animal en las que la primera y tercera sirven como control de las otras dos. La absorción de glucosa se determina mediante ¹⁴C-glucosa, y las lecturas se llevan a cabo con un contador de radiactividad LKB. Los resultados, diferencia entre la cantidad de azúcar inicial y la cantidad de azúcar recogida en intestino tras el período destinado a absorción, se expresa en $\mu\text{mol}/\text{cm}$ de intestino, y referido al tiempo de contacto (10 min).

Preparación de Extractos y Aislamiento de Taninos

Los extractos de la leguminosa objeto de estudio (*Vicia faba*) se prepararon a partir de 140 g de semillas completas previamente molidas, y se sometieron a maceración con 300 ml de etanol agua (50:50) con agitación continua. Después de 24 horas, los extractos se filtran, y se procede a una concentración con un rotavapor a 50°C. Finalmente se centrifuga a 1,500 rpm, durante 30 min, llevándose a un volumen final de 100 ml con agua destilada.

El aislamiento de los taninos se realizó siguiendo el método de Marquardt *et al.*, (12) en el que la separación final y purificación se verifica mediante una columna de Sephadex LH-20 de 2.6 x 30 cm que se eluye con acetona:agua (50:50). Se obtienen aproximadamente 0.5 g de taninos por 250 g de semillas, localizándose sobre todo en el tegumento de las mismas.

Estudio Estadístico

Para evaluar las diferencias estadísticas entre grupos se empleó el test de Duncan.

RESULTADOS

Curva de Crecimiento

Los datos obtenidos indican que la dieta elaborada con *Vicia faba* provoca una reducción de 17.1% de crecimiento a las siete semanas en

relación al control de caseína. En cambio, aquellas ratas suplementadas con ácido tánico (0.2%) sufren un retardo del 15.6%. Consecuentemente, los índices de transformación son inferiores en los animales alimentados con la dieta control de caseína.

Efecto de los Extractos de Vicia faba en la Absorción Intestinal de Glucosa

Los valores del transporte de glucosa a través del yeyuno de la rata en presencia o ausencia de extractos se exponen en la Figura 1. En la realización de este estudio, se sometieron a ensayo tres concentraciones diferentes de extracto: 25%, 50% y 100%, con un contenido de tanino equivalente a 0.29, 0.58 y 1.16 g/100 ml. La solución de D-glucosa empleada fue 2 mM y los períodos de absorción de 10 min en siete absorciones sucesivas (Figura 1). La presencia de extracto inhibió en forma parcialmente reversible la absorción de glucosa en relación a la concentración de extractos presente. La reducción observada en el transporte de glucosa fue de 29.2, 39.8 y 50.1% para las concentraciones de 25, 50 y 100% de extracto, respectivamente.

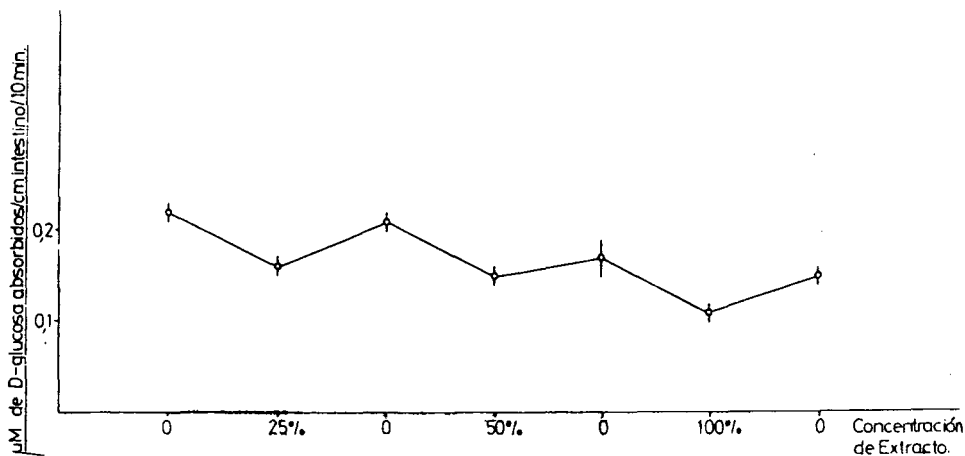


FIGURA 1

Representación gráfica de los valores absolutos de absorción intestinal *in vivo* de D-glucosa 2 mM en presencia de extractos de *Vicia faba* L. en concentraciones del 25%, 50% y 100%

Efecto de la Presencia de Taninos Aislados Procedentes de Vicia faba sobre la Absorción Intestinal de Glucosa

Los taninos extraídos de las semillas de *Vicia faba* según el método previamente descrito, fueron disueltos (0.1 g/100 ml) en una solución de D-glucosa 2 mM, y se introdujeron en el asa intestinal en la segunda y cuarta absorciones, siendo la primera y tercera de D-glucosa únicamente. Los resultados se ilustran gráficamente en la Figura 2, donde se observa que la presencia de taninos en la solución de glucosa induce una inhibición de 22.30/o en el segundo período de absorción, y de 280/o en el cuarto.

También pudo apreciarse cómo la capacidad absorptiva del intestino delgado no se recupera totalmente tras la exposición inicial a los taninos; así, la absorción del azúcar en el tercer período fue 16.00/o inferior a la observada en el primer período.

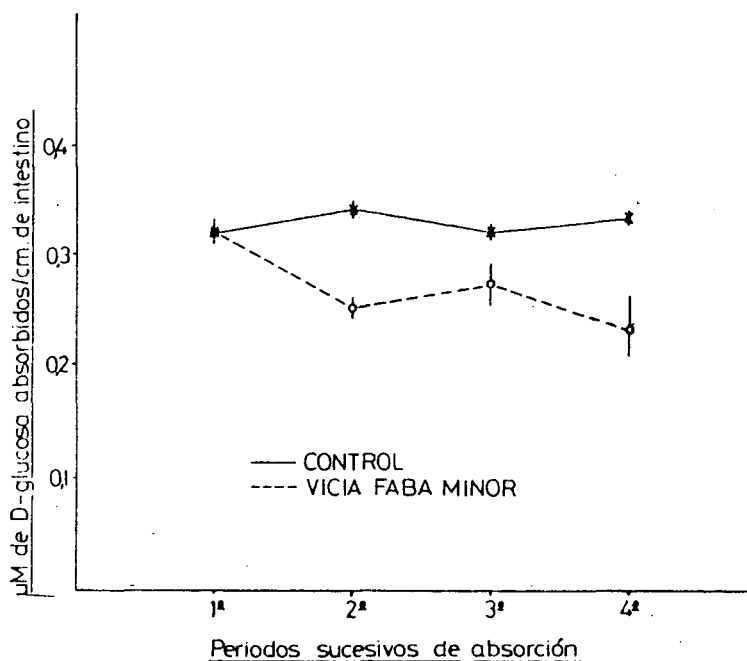


FIGURA 2

Representación gráfica de los valores absolutos de absorción intestinal *in vivo* de D-glucosa 2 mM en presencia de extractos purificado de *Vicia faba* L. a la concentración de 0.10/o

Efecto de la Presencia de Acido Tánico en la Absorción Intestinal de Glucosa

La presencia de ácido tánico a tres concentraciones diferentes (0.05, 0.1 y 0.2%) reduce el transporte de glucosa a través del intestino delgado de la rata. Se realizaron cuatro absorciones sucesivas de 10 minutos cada una, en un mismo animal. La primera y tercera con soluciones de glucosa 2 mM, mientras que la segunda y cuarta —además de la glucosa (2 mM)— se adicionó ácido tánico a las concentraciones indicadas.

Los resultados revelan (Figura 3), que en la segunda absorción con una concentración de 0.05% de ácido tánico, se produjo una inhibición de 14.0% en la absorción de glucosa; de 33.2% para la concentración de 0.1% y de 45.1% para la concentración de 0.2%. Estas inhibiciones se mantenían en parte en la tercera absorción para las concentraciones 0.1% y 0.2% de ácido tánico; sin embargo, con el ácido tánico al

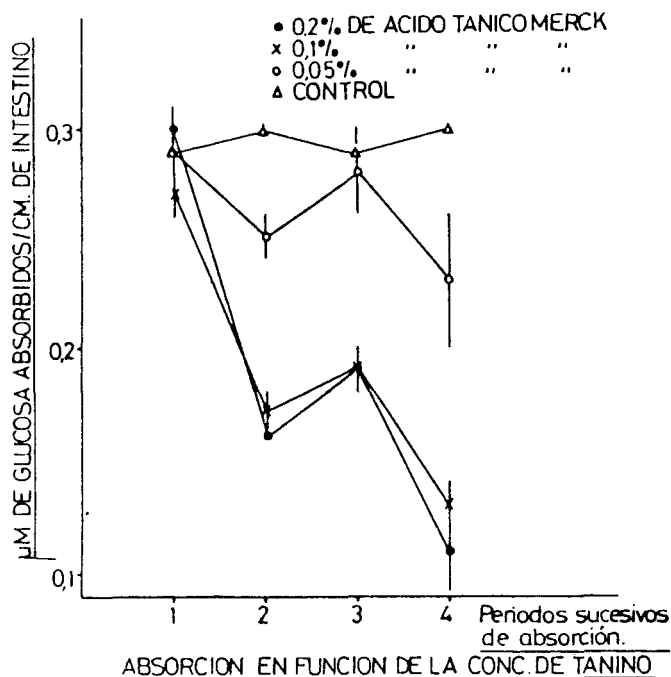


FIGURA 3

Representación gráfica de los valores absolutos de absorción intestinal *in vivo* de D-glucosa 2 mM en presencia de ácido tánico en concentraciones de 0.05%, 0.1% y 0.2%

0.05% la absorción volvía a la normalidad tras la eliminación del inhibidor. Al añadir el ácido tánico en la cuarta absorción, el transporte de glucosa fue inferior en un 21.4, 53.0 y 61.9 para las concentraciones 0.05, 0.1 y 0.2%, respectivamente.

DISCUSION

El retraso en el crecimiento observado en animales alimentados con legumbres crudas ha sido atribuido a la presencia de sustancias termolábiles, tales como inhibidores de proteína (13) hemaglutininas y saponinas (3) y entre otros, también a la presencia de polifenoles (14, 15) y a un bajo contenido de aminoácidos azufrados (4, 15). En este caso particular, la adición de metionina a una dieta de *Vicia faba*, mejoró ligeramente el valor biológico de la proteína, sin que ésta alcanzara los valores correspondientes a la proteína patrón (25). No obstante, hasta el presente todavía no se ha determinado el mecanismo de acción de algunos de estos componentes y su influencia sobre la utilización nutricional de las leguminosas.

Trabajos previos de este laboratorio (10) han puesto de manifiesto la inhibición del transporte intestinal de glucosa después de la ingestión de *Vicia faba* y posteriormente por la presencia de extractos de tegumentos procedentes de *Vicia faba* (16) y otras leguminosas (17) ricas en taninos. En este contexto, surge la necesidad de determinar la influencia de taninos extraídos de la leguminosa así como de la adición de ácido tánico a diferentes concentraciones sobre la absorción de glucosa y el crecimiento.

Los compuestos pertenecientes al grupo de los polifenoles, se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas superiores. Su presencia en las semillas de leguminosas podría afectar significativamente el valor nutritivo de las mismas (18). Por otra parte, es conocido el hecho de que aquellas variedades de habas cuyas testas son coloreadas suelen ser ricas en taninos, y su inclusión en la dieta de animales monogástricos reduce la digestibilidad de la proteína (19).

En estudios sobre los efectos comparativos del ácido galotánico y compuestos fenólicos afines sobre el crecimiento de ratas, otros investigadores (20) afirman que existe una disminución en el desarrollo corporal, proporcional al contenido de estos productos. Resultados paralelos fueron obtenidos por Sobrini *et al.*, (4) al investigar diferentes variedades de habas con distintos contenidos de taninos, en las que los índices nutricionales estaban correlacionados con el contenido en polifenoles de las semillas.

El papel de estos componentes de las leguminosas, vistos a la luz de los trabajos de Calderón *et al.*, (21) podrían explicarse a través de la formación de complejos entre las proteínas y los taninos, pero otros autores no comparten esta opinión (22, 23). Se ha sugerido también que los compuestos polifenólicos, asociados a la coloración del tegumento, afectan la digestibilidad de la proteína e inhiben la actividad enzimática intestinal (24). Estudios más recientes (18) han logrado mejorar el valor nutricional de la proteína de leguminosas, tras la adición de polietilenglicol, que permite extraer los productos polifenólicos de la semilla.

Los taninos parecen actuar formando complejos que modifican las estructuras del epitelio intestinal, dando lugar a una inhibición irreversible,

aunque no del todo (16). De este modo, los polifenoles podrían modificar débilmente el transporte de glucosa sin producir severas alteraciones en la mucosa intestinal. De hecho no hemos podido detectar alteraciones histológicas con el microscopio electrónico (resultados no publicados). A pesar de ello, y como lo indica Griffiths, cabe admitir ciertos efectos metabólicos (24).

A partir de los resultados obtenidos por nosotros, puede admitirse que la reducción en el crecimiento, observado en animales alimentados con harina de *Vicia faba* como fuente de proteína —o bien con caseína a la que se adicionó ácido tánico—, se debe, al menos en parte, a la presencia de productos polifenólicos que inhiben el transporte de glucosa por el intestino. Como lo hicimos manifiesto en trabajos anteriores (8), éstos a la vez reducen la retención nitrogenada en el organismo animal, tras la ingestión de tales leguminosas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de la Srta. María Luz Morcillo en las labores de secretaría, así como el apoyo económico que, para este estudio, tuvo a bien proporcionarnos el Gobierno de Navarra.

SUMMARY

ROLE OF POLYPHENOLS IN THE LOW NUTRITIVE VALUE OF *Vicia faba*

The inclusion of field bean (*Vicia faba*) in diets for growing experimental animals, reduced their growth performance in a similar way as compared with controls fed a casein diet, with 0.2% tannic acid. Hydroalcoholic extracts or isolated tannins obtained from *Vicia faba* seeds, decreased the intestinal transport of D-glucose. The addition of 0.05, 0.1 or 0.2% of tannic acid to the perfusion solutions containing D-glucose proportionally diminished the intestinal uptake of sugar according to its polyphenolic content. It has been postulated that polyphenols reduce, at least partially, the nutritive value of legumes, by altering monosaccharide absorption. Other constituents, however, could also be involved.

BIBLIOGRAFIA

1. FAO. Legumes in Human Nutrition. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1982. (Food and Nutrition Papers Series 20).
2. Hebblethwaite, P. L. The Faba Bean: A Basis for Improvement. London, Ed. Butterworths, 1983.
3. Liener, I. E. Toxic Constituents in Plant Foodstuffs. New York, N. Y., Academic Press, Inc., 1980.
4. Sobrini, F. J., J. A. Martínez, A. Ilundain & J. Larralde. The effects of *Vicia faba* L. polyphenols on absorption, growth and metabolism in the rat. *Plant Food for Human Nutrition*, 33: 125-131, 1983.
5. Martínez, J. A. & J. Larralde. Developmental changes on protein turnover in

- growing rats fed on diets containing field beans (*Vicia faba* L.) as source of protein. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, **34**: 466-476, 1984.
6. Cenarruzabeitia, E., S. Santidrián, J. Bello & J. Larralde. Effect of raw field bean (*Vicia faba*) on amino acid degradating enzymes in rats and chickens. **Ann Nutr. Metab.**, **23**: 203-209, 1979.
 7. Griffiths, D. W. & G. Moseley. The effects of diets containing field beans of high or low polyphenolic content on the activity of digestive enzymes in the intestine of rats. **J. Sci. Food Agric.**, **31**: 255-259, 1980.
 8. Martínez, J. A. & J. Larralde. Influence of diets containing different levels of *Vicia faba* L. as source of protein on body protein composition and nitrogen balance of growing rats. **Ann Nutr. Metab.**, **28**: 174-180, 1984.
 9. Bressani, R. & L. G. Elías. Legume foods. (Chapter V). In: **New Protein Foods**. Vol. 1A. **Technology**. Aaron M. Altschul (Ed.). New York, N. Y., Academic Press, Inc., 1974, p. 230-297.
 10. Santidrián, S. Intestinal absorption of D-glucose, D-galactose and L-leucine in male growing rats fed a raw field bean diet. **J. An. Sci.**, **53**: 414-419, 1981.
 11. Ilundain, A., F. Ponz & M. Lluch. Kinetic of intestinal transport *in vivo*. **Rev. Esp. Fisiol.**, **35**: 359-366, 1979.
 12. Marquardt, R. R., T. Ward, L. D. Campbell & P. E. Cansfield. Purification, identification and characterization of a growth inhibitor in faba bean. **J. Nutr.**, **167**: 1313-1324, 1977.
 13. Abbey, B. W., R. J. Neale & G. Norton. Nutritional effects of field bean proteinase inhibitors fed to rats. **Br. J. Nutr.**, **41**: 31-38, 1979.
 14. Jaffé, W. G., D. I. González & M. C. Mondragón. Composición de caldos de frijoles. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, **26**: 76-83, 1976.
 15. Mondragón, M. C. & D. I. González. Caldos de frijoles en relación a su contenido en polifenoles y aminoácidos. **Arch. Latinoamer. Nutr.**, **28**: 44-62, 1978.
 16. Motilva, M. J., J. A. Martínez, A. Ilundain & J. Larralde. Effect of extracts from *Phaseolus vulgaris* and field bean varieties on intestinal D-glucose transport *in vivo*. **J. Sci. Food Agric.**, **34**: 239-246, 1983.
 17. Barcina, Y., A. I. Alcalde, A. Ilundain & J. Larralde. Kinetic study of the effects of extracts from *Vicia faba* on intestinal sugar absorption. **J. Sci. Food Agric.**, **35**: 996-1003, 1984.
 18. Hewitt, D. & J. E. Ford. Influence of tannins on the protein nutritional quality of food grains. **Proc. Nutr. Soc.**, **41**: 7-17, 1982.
 19. Moseley, G. & D. W. Griffiths. Varietal variation in the antinutritive effects of field bean when fed to rats. **J. Sci. Food Agric.**, **30**: 772-778, 1979.
 20. Glick, Z. & M. A. Joslyn. Effect of tannic acid and related compounds of the absorption and utilization of proteins in the rat. **J. Nutr.**, **100**: 509-515, 1970.
 21. Calderón, P. J., J. P. Van Buren & W. B. Robinson. Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatine and condensed tannins. **J. Agr. Food Chem.**, **16**: 479-482, 1968.
 22. Mitjavilla, S., G. Saint Blanquat & G. Derache. Effet de l'acide tannique sur l'absorption intestinale chez le souris. **Food Cosmet. Toxicol.**, **8**: 27-33, 1970.
 23. Mitjavilla, S., C. Lacombe, C. Carrera & G. Derache. Tannic acid and oxidized tannic acid on the functional state of rat intestine epithelium. **J. Nutr.**, **107**: 2113-2121, 1977.
 24. Griffiths, D. W. The poliphenolic content and enzyme inhibitory activity of testas of field bean and pea varieties. **J. Sci. Food Agric.**, **32**: 797-804, 1981.
 25. Bello, J., M.N. Cenarruzabeitia & J. Larralde. Factores antinutritivos contenidos en las semillas de *Vicia faba*. II. Influencia de la suplementación aminoacídica y el tratamiento térmico. **Rev. Nutr. Anim.**, **10**: 139-149, 1972.