

EFFECTO DE LOS POLIFENOLES DE LA PULPA DE CAFE EN LA ABSORCION DE HIERRO¹

Martha P. de Rozo², Jeanette Vélez R.³ y L. Amparo García A.³

Departamento de Química, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia
Bogotá, Colombia

RESUMEN

Con el fin de determinar el efecto de los polifenoles de la pulpa de café en la absorción del hierro, se llevó a cabo una serie de ensayos en ratas (peso promedio 200 g) utilizando el método del segmento ligado. Se estandarizaron las condiciones óptimas para medir la absorción de ⁵⁹Fe usando como criterio la concentración de dicho elemento y el tiempo que produjeran mayor radiactividad en la sangre. Se escogió una concentración de 0.4 µCi/dosis y un tiempo de tres horas para realizar los ensayos de absorción de hierro en presencia de polifenoles.

Se midió la absorción de ⁵⁹Fe en presencia de los polifenoles patrones (ácido tánico y catequina) y los extractos de pulpa de café en dos concentraciones, utilizando para el caso seis ratas por cada tratamiento. Se encontró que el mejor indicador de la absorción de hierro era el paso de ⁵⁹Fe a través del duodeno, y no la suma de ⁵⁹Fe presente en los tejidos (sangre, hígado, bazo, riñones, corazón y carcás). Por esta razón, se investigó el efecto de los polifenoles de la pulpa de café en la absorción del hierro, tomando para cada tratamiento el valor promedio de los resultados de absorción de ⁵⁹Fe a través del segmento ligado (100 — 0/o ⁵⁹Fe presente en el duodeno).

El análisis de los resultados reveló que tanto la presencia de los polifenoles patrones, como la de los extractos de pulpa de café disminuían considerablemente la absorción de hierro al compararse con el grupo control.

Los niveles de polifenoles aplicados en este estudio son comparables a los que consumen animales alimentados con dietas suplementadas con pulpa de café, aún a niveles tan bajos como 100/o. Por consiguiente, es factible asegurar que el efecto antinutricional de la pulpa de café se debe en parte a la capacidad de los polifenoles de ligar el hierro de la dieta.

Manuscrito modificado recibido: 14-12-84.

- 1 Este trabajo, que dirigió la Dra. de Rozo, se basa en una Tesis de grado previo a optar al título de Químico, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Apartado Aéreo 14490, Bogotá, Colombia.
- 2 Profesora Asociada, Departamento de Química de la citada Facultad.
- 3 Estudiantes del mismo Departamento.

INTRODUCCION

Desde hace varios años se ha venido investigando el empleo de la pulpa de café en alimentación animal, debido a su enorme potencial como fuente de nutrientes. Desde el comienzo de dichas investigaciones, cabe señalar, se han observado ciertos efectos negativos cuando ese subproducto se utiliza en raciones para animales (1, 2). Se ha informado, asimismo, que las sustancias adversas son la cafeína, la fibra, el potasio y los polifenoles que contiene la pulpa de café en cantidades relativamente altas (3).

Es un hecho conocido que los polifenoles, en general, pueden afectar el metabolismo del hierro (4, 5), por lo que se acordó investigar el efecto de los polifenoles de la pulpa de café en la absorción del hierro. La interferencia en el metabolismo de hierro, en este paso, podría ser uno de los mecanismos por cuyo medio se suscita el efecto antinutricional de la pulpa de café.

MATERIALES Y METODOS

En el desarrollo de este trabajo se usó pulpa de café de la variedad "Caturra" cultivada en Colombia. La pulpa se secó al sol, se pulverizó en un molino de cuchillas y se pasó por un tamiz de 60 mallas. El polvo obtenido se guardó luego en bolsas plásticas oscuras a fin de protegerlo de la luz.

Para la extracción de los polifenoles se utilizaron reactivos analíticos. Los solventes usados fueron: metanol puro; metanol-agua (50-50); hidróxido de amonio, 30/o, e hidróxido de calcio, 10/o.

La relación muestra-solvente fue de 1 g de pulpa de café a 100 ml de solvente, y el extracto se obtuvo mediante agitación mecánica y a temperatura ambiente por un período de 10 minutos.

La cuantificación de los polifenoles presentes en los extractos de pulpa de café se hizo aplicando los métodos de Folin-Ciocalteu (6, 7), ligación de fenoles a polivinilpirrolidona (PVP) (8, 9), y vainillina acidificada (10).

Los extractos se llevaron a sequedad a la temperatura de 35°C, disolviéndose luego en solución salina antes de inyectarlos.

Con el objeto de evaluar el efecto de los diferentes extractos de pulpa de café en la absorción de hierro, se hicieron ensayos utilizando el método del segmento ligado (11), que mide el transporte de hierro radiactivo a través de un segmento ligado del duodeno. Con esta técnica se anestesia a las ratas, y la cavidad peritoneal se abre mediante una incisión de aproximadamente 3 cm. El duodeno se saca de la cavidad y se liga en sus extremos; la segunda ligadura (hacia el final del duodeno) se afloja, y a través de ella se inyecta una solución que contiene el Fe radiactivo. El segmento se coloca de nuevo en la cavidad después de volver a apretar la segunda ligadura, y se cierra la incisión. Luego del tiempo necesario para obtener máxima radiactividad en sangre (tiempo óptimo), las ratas son anestesiadas y, por punción cardíaca, se toma una muestra de sangre; en seguida se extraen los tejidos (hígado, corazón, bazo y riñón) para conteo posterior de ^{59}Fe . El segmento ligado también se elimina y se efectúa el conteo para ^{59}Fe . Con estos datos se determinó individualmente el por ciento de

^{59}Fe presente en cada tejido, promediándose estos valores. Se obtuvo así el valor promedio para el respectivo tratamiento.

Para encontrar el tiempo óptimo y la concentración óptima de ^{59}Fe se utilizaron diferentes dosis de Fe radiactivo (en forma de FeCl_3) (0.2, 0.4 y 0.9 μCi /dosis y distintos tiempos de absorción (2, 3, 4 horas) similares a los usados por Van Campen y Mitchell (11). Se escogieron las dosis y el tiempo que dieron origen al mayor valor de radiactividad en sangre. La concentración del Fe radiactivo se determinó con un analizador Multicanal SA40B provisto de un detector de pozo con NaI (T1).

Para cada medida se inyectó un volumen total de 0.2 ml de solución salina (dosis) que contenía 0.4 μCi de ^{59}Fe y la solución que contenía el polifenol a ensayar en concentraciones de 2.5 y 5 μmoles expresados como ácido clorogénico con excepción del grupo testigo que contenía únicamente ^{59}Fe . Como polifenoles patrones se utilizaron ácido tánico y catequina (Sigma) en dos concentraciones, una baja (2 μmoles /dosis), y una alta (10 μmoles /dosis). En todos los experimentos se utilizaron seis ratas (machos y hembras) de la raza Fischer, cuyo peso promedio era de 200 g, con excepción del grupo control, el que estuvo integrado por siete ratas. Estas fueron alimentadas con una dieta comercial que contenía 200 ppm de hierro y previo a cada ensayo se dejaron en ayunas durante 24 horas.

Análisis Estadístico

Los resultados de los diferentes experimentos fueron sometidos a análisis de varianza, y las medias individuales se compararon por un test de rango múltiple. Se utilizó un nivel de significancia del 50/o.

RESULTADOS Y DISCUSION

Al aumentar la concentración de ^{59}Fe en la dosis inyectada en el segmento de duodeno, de 0.2 μCi a 0.4 μCi , se observó un incremento apreciable en la radiactividad presente en la sangre después de tres horas. Un aumento posterior de la concentración de ^{59}Fe a 0.9 μCi , sin embargo, no incrementó la radiactividad sanguínea (Figura 1). Por esta razón, se escogió la concentración de 0.4 μCi /dosis para realizar todos los ensayos de absorción de hierro.

Al incrementar el tiempo de reposo del animal de dos a tres horas después de la inyección de ^{59}Fe (0.4 μCi /dosis), en un segmento ligado de duodeno, se observó un aumento en la radiactividad presente en la sangre, mientras que un tiempo de cuatro horas indujo un descenso de la misma (Figura 2). Esta disminución se debe posiblemente a que la mayoría de ^{59}Fe ya ha sido distribuido a los tejidos. De acuerdo a estos hallazgos, se escogió el tiempo de tres horas para los ensayos posteriores de absorción de hierro.

Ensayos de Absorción en Presencia de Polifenoles

Con excepción del duodeno, el porcentaje de ^{59}Fe en los distintos tejidos varía entre 0 y 25.6. Sin embargo, la mayoría de los valores de

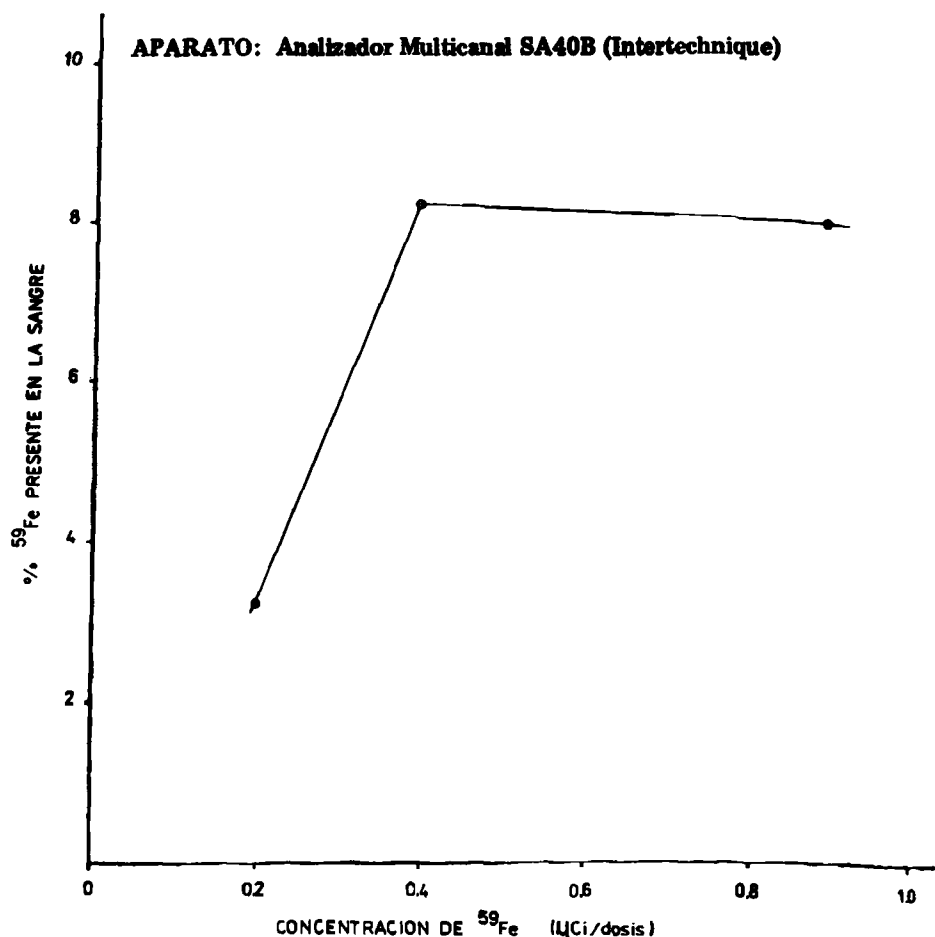


FIGURA 1

Influencia de la concentración de ^{59}Fe de la dosis en el nivel de ^{59}Fe en la sangre

absorción son inferiores a 1.0. Además, en la mayoría de los casos las desviaciones estándar superan el valor promedio (Tablas 1 y 2), mostrando que el nivel de hierro en los tejidos no es un buen indicador de la absorción de este mineral.

Aun cuando otros autores han concluido que para medir la absorción del hierro se puede utilizar tanto la suma del ^{59}Fe presente en los tejidos como la desaparición de ^{59}Fe del duodeno (12, 13), en este trabajo se encontró que el mejor indicador de la absorción es el paso de ^{59}Fe a través del duodeno, y que no es necesario determinar el ^{59}Fe en los otros tejidos. Esta simplificación del procedimiento para medir absorción de hierro significa un ahorro en tiempo de trabajo experimental y en cuanto al uso del contador gamma.

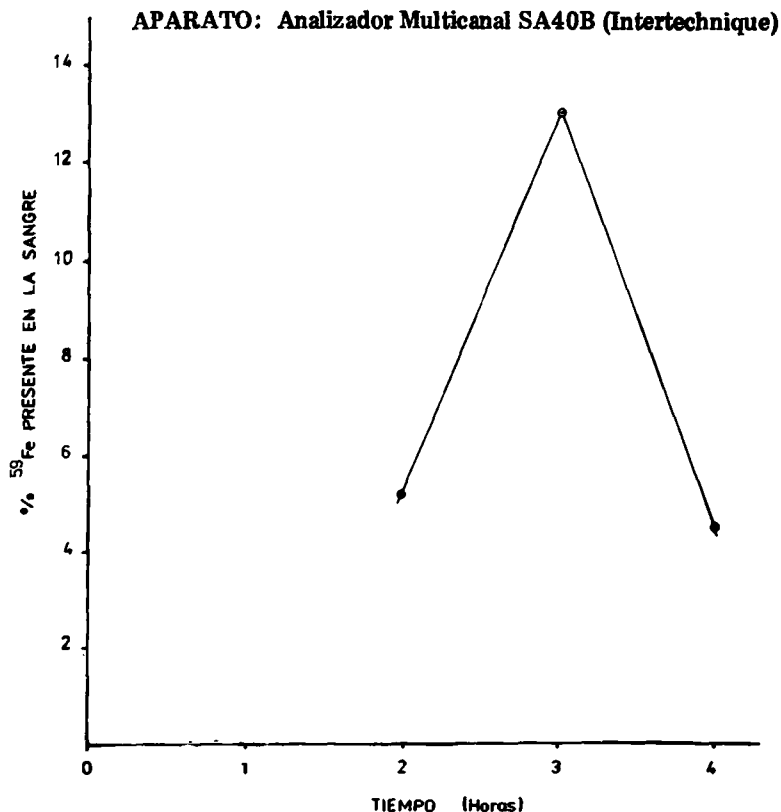


FIGURA 2

Influencia del tiempo en el nivel de ⁵⁹Fe en la sangre

Por las razones apuntadas, al comentar el efecto de los polifenoles de la pulpa de café en la absorción del hierro, se tuvieron en cuenta los resultados de absorción de ⁵⁹Fe a través del segmento ligado (100-0/o de ⁵⁹Fe presente en el duodeno).

La presencia, tanto de los polifenoles patrones como de los extractos de pulpa de café, disminuyó considerablemente este valor en todos los casos. La diferencia en absorción entre el grupo control y los grupos sujetos a tratamiento en presencia de polifenoles osciló entre 22.1 y 36.10/o, siendo estadísticamente significativa al nivel del 50/o. En contraposición a lo esperado, no se observaron diferencias significativas en lo referente a absorción a las dos concentraciones de polifenoles sometidas a ensayo, tanto en los patrones como en los distintos extractos de pulpa de café (Tabla 3).

Las diferencias constatadas en los porcentajes de absorción de ⁵⁹Fe a través del segmento ligado de duodeno con los distintos extractos, puede deberse a que los solventes posiblemente extraigan diferentes tipos de polifenoles. Se sabe que estos últimos, condensados, son los que ejercen el efecto negativo en la absorción al ligar el hierro.

TABLA 1
PORCENTAJE DE ^{59}Fe QUE APARECE EN LOS TEJIDOS

Tratamiento	No. de animales utilizados ^a	Porcentaje promedio \pm Desviación estándar			
		Hígado	Riñones	Corazón	Bazo
Control	7	2.1 \pm 2.4	0.5 \pm 0.6	0.1 \pm 0.0	0.3 \pm 0.3
Catequina (DB)	5	0.7 \pm 1.2	1.0 \pm 1.2	0.0 \pm 0.0	0.3 \pm 0.3
Catequina (DA)	6	0.2 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
Acido tánico (DB)	6	0.7 \pm 0.7	1.0 \pm 1.5	0.5 \pm 1.0	0.3 \pm 0.5
Acido tánico (DA)	5	4.1 \pm 5.3	1.1 \pm 1.6	1.6 \pm 2.1	0.1 \pm 0.1
Ext. de pulpa de café en MeOH puro (DB)	6	1.0 \pm 1.5	0.2 \pm 0.4	0.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0
Ext. de pulpa de café en MeOH puro (DA)	5	0.2 \pm 0.3	0.1 \pm 0.2	0.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0
Ext. de pulpa de café en MeOH-H ₂ O (50:50) (DB)	5	0.2 \pm 0.2	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.3	0.2 \pm 0.2
Ext. de pulpa de café en MeOH-H ₂ O (50:50) (DA)	6	0.5 \pm 0.5	0.8 \pm 1.1	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1
Ext. de pulpa de café en NH ₄ OH 30/o (DB)	4	0.6 \pm 0.6	0.8 \pm 1.2	0.4 \pm 0.7	0.3 \pm 0.5
Ext. de pulpa de café en NH ₄ OH 30/o (DA)	6	1.0 \pm 0.9	1.0 \pm 1.4	0.1 \pm 0.1	0.5 \pm 1.1
Ext. de pulpa de café en Ca(OH) ₂ 10/o (DB)	5	3.2 \pm 3.5	0.6 \pm 0.4	0.3 \pm 0.2	0.9 \pm 1.4
Ext. de pulpa de café en Ca(OH) ₂ 10/o (DA)	4	0.5 \pm 0.9	1.1 \pm 1.7	0.3 \pm 0.5	0.7 \pm 1.3

^a Durante los experimentos se presentó mortalidad en algunos grupos debido a sobredosis de anestesia.
(DB) = Dosis baja. Patrones: 2 μ moles/dosis. Ext. de pulpa de café: 2.5 μ moles expresadas como ácido clorogénico/dosis.
(DA) = Dosis alta. Patrones: 10 μ moles/dosis. Ext. de pulpa de café: 5 μ moles expresadas como ácido clorogénico/dosis.

TABLA 2
PORCENTAJE DE ⁵⁹Fe QUE APARECE EN LOS TEJIDOS

Tratamiento	No. de animales utilizados ^a	Porcentaje promedio ± Desviación estándar		
		Sangre	Carcás	Duodeno
Control	7	13.4 ± 12.2	20.1 ± 10.9	18.2 ± 5.7
Catequina (DB)	5	6.6 ± 8.2	6.8 ± 5.2	42.4 ± 12.9
Catequina (DA)	6	0.3 ± 0.8	4.8 ± 5.7	41.6 ± 10.3
Acido tánico (DB)	6	12.1 ± 13.9	3.8 ± 5.4	48.1 ± 11.0
Acido tánico (DA)	5	25.6 ± 29.5	3.9 ± 1.8	40.3 ± 6.4
Ext. de pulpa de café en MeOH puro (DB)	6	1.5 ± 2.2	2.4 ± 2.1	42.8 ± 13.4
Ext. de pulpa de café en MeOH puro (DA)	5	5.7 ± 8.7	2.6 ± 2.1	49.2 ± 7.6
Ext. de pulpa de café en MeOH-H ₂ O (50:50) (DB)	5	10.5 ± 14.9	3.1 ± 4.9	54.3 ± 15.3
Ext. de pulpa de café en MeOH-H ₂ O (50:50) (DA)	6	3.2 ± 4.3	4.2 ± 3.3	43.6 ± 10.5
Ext. de pulpa de café en NH ₄ OH 30/o (DB)	4	13.1 ± 13.6	1.5 ± 1.1	44.4 ± 6.2
Ext. de pulpa de café en NH ₄ OH 30/o (DA)	6	14.5 ± 20.0	1.7 ± 1.8	52.3 ± 9.2
Ext. de pulpa de café en Ca(OH) ₂ 10/o (DB)	5	19.2 ± 22.9	2.5 ± 3.2	48.0 ± 13.6
Ext. de pulpa de café en Ca(OH) ₂ 10/o (DA)	4	13.9 ± 16.3	6.8 ± 10.6	52.8 ± 10.0

^a Durante los experimentos se presentó mortalidad en algunos grupos debido a sobredosis de anestesia.

(DB) = Dosis baja. Patrones: 2 µmoles/dosis. Ext. de pulpa de café: 2.5 µmoles expresados como ácido clorogénico/dosis.

(DA) = Dosis baja. Patrones: 10 µmoles/dosis. Ext. de pulpa de café: 5.0 µmoles expresados como ácido clorogénico/dosis.

TABLA 3

**PORCENTAJE DE ABSORCION DE ^{59}Fe A TRAVES DEL SEGMENTO
LIGADO DE DUODENO**

Tratamiento	No. de animales utilizados ^a	Porcentaje \pm Desviación promedio estándar
Control	7	81.8 \pm 5.7 (a)
Catequina (DB)	5	57.6 \pm 12.9 (b)
Catequina (DA)	6	58.4 \pm 10.3 (b)
Acido tánico (DB)	6	51.9 \pm 11.0 (b)
Acido tánico (DA)	5	59.7 \pm 6.4 (b)
Ext. de pulpa de café en MeOH puro (DB)	6	57.2 \pm 13.4 (b)
Ext. de pulpa de café en MeOH puro (DA)	5	50.8 \pm 7.5 (b)
Ext. de pulpa de café en MeOH-H ₂ O (50:50) (DB)	5	45.7 \pm 15.3 (b)
Ext. de pulpa de café en MeOH-H ₂ O (50:50) (DA)	6	56.4 \pm 10.5 (b)
Ext. de pulpa de café en NH ₄ OH 30/o (DB)	4	55.6 \pm 6.2 (b)
Ext. de pulpa de café en NH ₄ OH 30/o (DA)	6	47.7 \pm 9.2 (b)
Ext. de pulpa de café en Ca(OH) ₂ 10/o (DB)	5	52.0 \pm 13.6 (b)
Ext. de pulpa de café en Ca(OH) ₂ 10/o (DA)	4	47.2 \pm 10.0 (b)

Los valores en la columna con diferente letra son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

^a Durante los experimentos se presentó mortalidad en algunos grupos, debido a sobredosis de anestesia.

(DB) = Dosis baja: Patrones: 2 μ moles/dosis. Extracto de pulpa de café: 2.5 μ moles expresados como ácido clorogénico/dosis.

(DA) = Dosis alta: Patrones: 10 μ moles/dosis. Extracto de pulpa de café: 5.0 μ moles expresados como ácido clorogénico/dosis.

Los niveles de polifenoles utilizados en el trabajo descrito, los que producen un efecto adverso en la absorción del hierro son comparables a las cantidades de polifenoles que contienen las dietas para animales suplementadas con pulpa de café, aún a niveles tan bajos como 100/o. Este efecto negativo de los polifenoles de la pulpa de café en la absorción del hierro aporta una explicación al efecto antinutricional de dicho subproducto.

SUMMARY

EFFECT OF THE POLYPHENOLS OF COFFEE PULP ON IRON ABSORPTION

The effect of the polyphenols of coffee pulp on iron absorption was studied using the method of ligated segments in rats. Optimal conditions to measure iron absorption, were determined using as criteria the concentration of Fe^{59} and the time that

produced the highest value of blood radioactivity. A concentration of 0.4 uCi/dose of Fe^{59} and a 3-hr period were chosen to measure iron absorption.

Experimental groups were formed assigning six rats randomly to each group. Each group was injected with a solution of ^{59}Fe and either with the standard polyphenol solution or with the coffee pulp extract, except the control group which was injected with the Fe^{59} solution only. The effect of two polyphenol concentrations was also studied.

Iron uptake from the duodenum was found to be the best indicator of iron absorption when compared to the sum of iron uptake by the tissues (blood, liver, spleen, kidneys, heart and carcass). Therefore, this indicator was used to interpret the results obtained.

Catechin, tannic acid and the coffee pulp extract decreased significantly iron absorption when compared with the control group.

The level of polyphenols used in these experiments is similar to the amounts consumed by animals fed coffee pulp at a 10% level. Therefore, we can conclude that the antinutritional effect of coffee pulp polyphenols may be partially due to their capacity to bind iron.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestra gratitud a las siguientes personas e instituciones:

Al Dr. Horacio Gómez porque sin su guía, ayuda y paciencia este trabajo no habría sido posible; al Dr. Augusto Corredor y las Secciones de Bioquímica y Microbiología del Instituto Nacional de Salud; a las Secciones de Química y Física del Instituto de Asuntos Nucleares; al Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas "Colciencias" por su aporte financiero; a la Sección de Farmacología del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional por su valiosa colaboración en el desarrollo del ensayo biológico, y finalmente, a la Sección de Bioquímica del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, A. Nutritive value of coffee hulls. *East Afric. Agric. J.*, 20:254-255, 1955. (*Nutr. Abstr. Revs.*, 25:1086-1955, Abstract 5761).
2. Squibb, R. L. El ensilaje de la pulpa de café en el engorde de los becerros. *La Hacienda*, 40:438-441, 1945.
3. Bressani, R., E. Estrada & R. Jarquín. Pulpa y pergamino de café. I. Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa. *Turrialba*, 22: 299-304, 1972.
4. Disler, P. B., S. R. Lynch, R. W. Charlton, J. D. Torrance, T. H. Bothwell, R. B. Walker & F. Mayert. The effect of tea on iron absorption. *Gut*, 16:193-200, 1975.
5. Roy, S. N. & S. Mukherjee. Influence of food tannins on certain aspects of iron metabolism. Parts I, II, III. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 16:93-104, 151-157, 1979.
6. Slinkard, K. & V. L. Singleton. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, 28:49-55, 1977.

7. García, L. A. & A. J. Vélez. **Cuantificación de los Polifenoles Presentes en la Pulpa de Café, su Interacción con Proteínas y sus Posibles Efectos en Algunos Aspectos del Metabolismo del Hierro.** Tesis de Grado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, 1983.
8. Andersen, R. A. & J. R. Todd. Estimation of total tobacco plant phenols by their binding to polyvinylpyrrolidone. *Tobacco Sci.*, **12**: 107-111, 1968.
9. Rozo, C. **Effect of Extended Storage on the Degree of Thermal Softening During Cooking Cell Wall Components and Polyphenolic Compounds of Red Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*).** Ph.D. Thesis, Cornell University, Ithaca, New York, 1982.
10. Boradhurst, R. B. & W. T. Jones. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agr.*, **29**:788-794, 1978.
11. Van Campen, D. R. & E. A. Mitchell. Absorption of Cu⁶⁴, Zn⁶⁵, Mo⁹⁹, and Fe⁵⁹ from ligated segments of the rat gastrointestinal tract. *J. Nutr.*, **86**:120-124, 1965.
12. Van Campen, D. R. & E. Gross. Effect of histidine and certain other amino acids on the absorption of iron⁵⁹ by rats. *J. Nutr.*, **99**:68-74, 1969.
13. Van Campen, D. R. Enhancement of iron absorption from ligated segments of rat intestine by histidine, cysteine, and lysine: Effects of removing ionizing groups and of stereoisomerism. *J. Nutr.*, **103**:139-142, 1973.