

## INTERACCION *in vitro* ENTRE LOS POLIFENOLES DE LA PULPA DE CAFE Y ALGUNAS PROTEINAS<sup>1</sup>

A. Jeanette Vélez R.<sup>2</sup>, L. Amparo García A.<sup>2</sup> y Martha P. de Rozo<sup>3</sup>

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

### RESUMEN

Se estudió la interacción *in vitro* de los polifenoles de la pulpa de café y polifenoles patrones con proteínas puras. Los ensayos de ligación de los polifenoles patrones (ácido tánico, ácido clorogénico y catequina) y extractos polifenólicos de pulpa de café a proteínas puras (gelatina, caseína y albúmina de suero bovino) se efectuaron a diferentes pH y a diferente relación polifenol/proteína. Se utilizaron extractos de pulpa de café en metanol puro, metanol-agua (50:50), hidróxido de amonio al 30/o e hidróxido de calcio al 10/o.

Se observó que a una relación polifenol/proteína 1/2 y a un pH de 5.0 la interacción era máxima, dando los mayores porcentajes de polifenol ligado a proteínas, especialmente en el caso del extracto amoniacal de pulpa de café y del ácido tánico. En cambio, los menores porcentajes de ligación correspondieron al extracto de pulpa de café en metanol-agua (50:50). Los otros extractos mostraron porcentajes de ligación intermedios.

La investigación reveló que los polifenoles de la pulpa de café tienen capacidad para ligar las proteínas *in vitro* a los pH sometidos a este ensayo. Este fenómeno puede, pues, ser la causa de la utilización deficiente de las proteínas de la dieta en presencia de pulpa de café.

### INTRODUCCION

La pulpa de café constituye uno de los desechos agrícolas más abundantes en América Latina. Aunque se ha tratado de utilizar este subproducto en la alimentación animal, se ha encontrado que contiene sustancias

---

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 Estudiantes del Departamento de Química de la citada Facultad.
- 3 Profesora Asociada, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

de acción fisiológica adversa (1). Este efecto antinutricional ha sido atribuido a la cafeína, la fibra, el potasio y los polifenoles que contiene.

En vista de que ha demostrado que los polifenoles disminuyen significativamente la utilización de las proteínas (2), el objetivo de este trabajo fue estudiar *in vitro* el grado de interacción de polifenoles puros y extractos polifenólicos de pulpa de café con proteínas puras en distintas relaciones y diferentes pH. Los resultados obtenidos sirven de base para interpretar el efecto de los polifenoles en la utilización de las proteínas de la dieta.

### MATERIALES Y METODOS

Se utilizó pulpa de café de la variedad "Caturra" cultivada en Colombia, la cual fue recolectada y puesta a secar al sol. Luego la pulpa seca se pulverizó en un molino de cuchillas y se pasó por un tamiz de 60 mallas. El polvo obtenido se guardó en bolsas plásticas oscuras para protegerlo de la luz.

Para las extracciones 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 a temperatura ambiente, por un tiempo de 10 minutos.

Los ensayos de interacción *in vitro* entre los polifenoles puros (ácido tánico, ácido clorogénico y catequina) y de los distintos extractos de la pulpa de café con proteínas puras (gelatina, caseína y albúmina de suero bovino), se hicieron a los pH de 3.5, 5.0 y 8.0, utilizando diferentes relaciones de polifenol a proteína, que variaban entre 1/2 y 4/1, usando el método informado por Calderón, Van Buren y Robinson (3). Todas las determinaciones se hicieron en duplicado, y se promediaron los dos datos.

Para estos ensayos la proteína se disolvió en agua destilada y la solución se ajustó al pH deseado. Se adicionó el polifenol en la cantidad que se quería y se completó con agua hasta un volumen de 10 ml. La solución se dejó en reposo a temperatura ambiente durante una hora, y luego se centrifugó a 50,000 x G. El sobrenadante se usó para la determinación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu, que se basa en la reducción del ácido fosfotungstomolibdico por los polifenoles en solución alcalina, produciendo una coloración azul fuerte (4), y vainillina acidificada, basado en la especificidad de este compuesto para reaccionar en condiciones ácidas con taninos condensados (5). Las interferencias se midieron por la técnica de la ligación de fenoles a polivinilpirrolidona (PVP). La PVP liga los fenoles, dejando libres otras clases de compuestos que también reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, pero que no presentan la capacidad de formar complejos insolubles con PVP. El cambio en la absorbancia después de añadir PVP a los extractos, corresponde a la concentración de polifenoles en la muestra (6, 7).

Para llevar a cabo los ensayos con los extractos de pulpa de café se tomaron alícuotas de estos extractos, que contenían 4.5, 9.0, 18.0 ó 36.0 mg de polifenoles, expresados como ácido clorogénico. Las alícuotas

se llevaron a sequedad a una temperatura de 20°C, y el polvo resultante se adicionó a los tubos que contenían la proteína disuelta.

## RESULTADOS Y DISCUSION

De los polifenoles patrones sometidos a ensayo, el único que acusó unión a las proteínas fue el ácido tánico; este compuesto es un polifenol de mayor peso molecular que la catequina y el ácido clorogénico. Se ha notificado que la ligación de polifenoles a proteínas es directamente proporcional al peso molecular (8); por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo se ajustan a dicha generalización.

Los experimentos realizados para establecer el efecto que la relación polifenol-proteína ejerce en el proceso de ligación, revelaron, en general, que a medida que la relación polifenol-proteína aumenta de 1/2 a 4/1, ocurre una disminución en el porcentaje de ligación, independientemente del pH, proteína o extracto utilizado. Es posible que ello se deba a que la proteína se vuelve limitante, razón por la que un aumento en la concentración de polifenol no produce un incremento en el porcentaje de ligación (Figuras 1, 2 y 3). Estos resultados concuerdan con los de Van Buren y Robinson (9), quienes encontraron un incremento en la ligación de ácido tánico a gelatina cuando la relación polifenol/proteína aumentaba de 1/1 a 1/3.

Se constató que el pH influye en el grado de ligación de los polifenoles a proteínas, obteniéndose los mayores porcentajes de ligación (83.5) al pH de 5.0, valor que está muy cercano al punto isoelectrico de las proteínas ensayadas. Este pH favorece la ligación tanto del ácido tánico como de los extractos de la pulpa de café. Los hallazgos, de nuevo concuerdan con los dados a conocer por otros investigadores. Calderón, Van Buren y Robinson (3), por ejemplo, encontraron que al pH de 5.0 y una relación polifenol/proteína de 1/2, el porcentaje de ligación entre ácido tánico y gelatina era máximo. Asimismo, Butler, Hagerman y Price (10) afirman que a un pH cercano al punto isoelectrico de las proteínas, la interacción polifenol/proteína es mayor.

Debido a que se observa una mayor formación del complejo polifenol-proteína a un pH cercano al punto isoelectrico de las proteínas utilizadas en este ensayo, en el que las proteínas no tendrían carga o estarían débilmente cargadas, se ha sugerido que los polifenoles se unen a la proteína por un proceso de adsorción (11). Este hecho, sin embargo, no descartaría la posibilidad de que otras interacciones (iónicas, enlaces de hidrógeno o enlaces covalentes) estén contribuyendo también a la formación del complejo polifenol-proteína (12, 13). Tampoco puede eliminarse la existencia de complejos solubles entre el polifenol y la proteína (3, 9).

En cuanto a la capacidad de los distintos extractos de pulpa de café para ligarse a proteínas, se observó que el extracto amoniacal acusaba los mayores porcentajes (72.80/o) de ligación de proteínas (en relación 1/2) independientemente del pH (Figura 4). Al contrario, el extracto de pulpa de café en metanol-agua (50:50) mostró los porcentajes más bajos (20.00/o) de ligación a proteínas. Los otros extractos presentaban porcentajes de ligación intermedios.

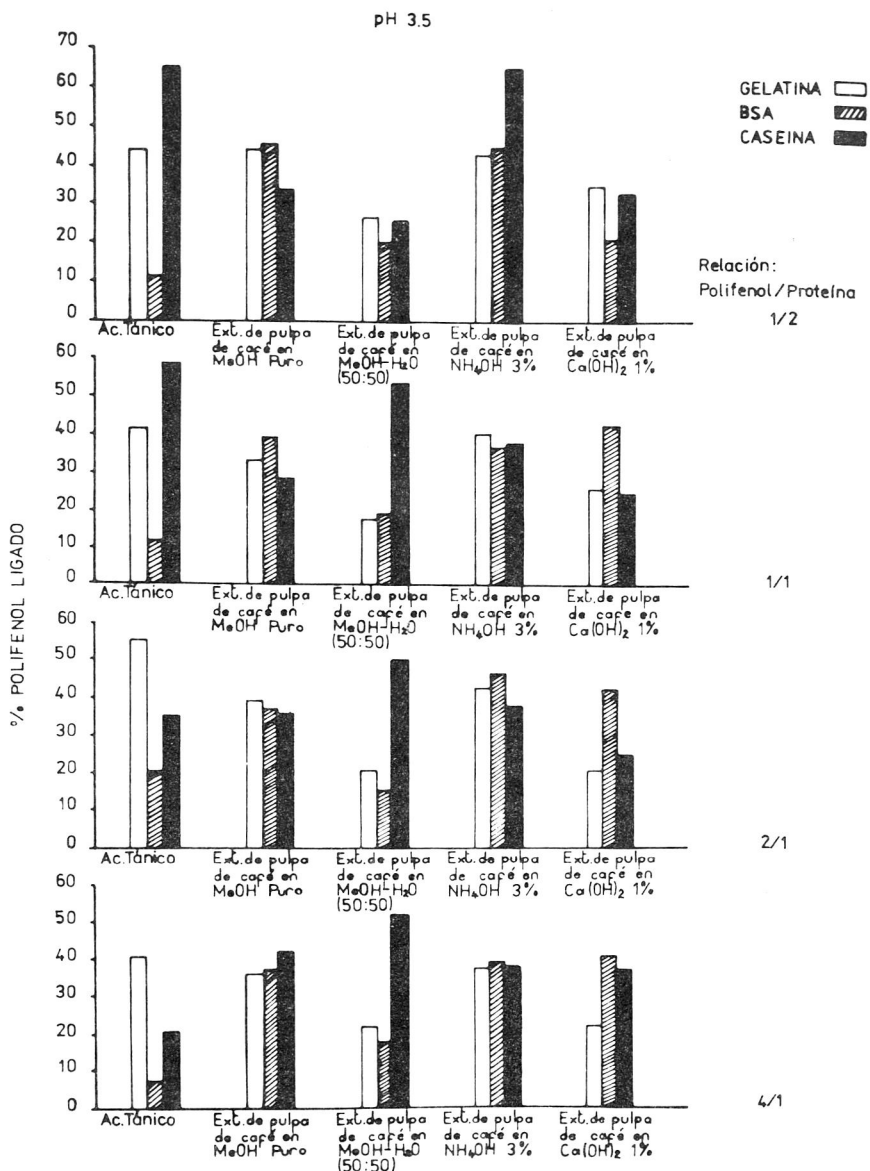


FIGURA 1

Porcentaje de polifenol ligado por diferentes proteínas

Las tres proteínas de prueba no acusaron porcentajes de ligación similares con los diferentes extractos, lo cual puede deberse a su diferencia en estructura.

De acuerdo con los resultados de este trabajo, el extracto amoniacal tiene una alta capacidad para ligar proteínas *in vitro* a todos los pH

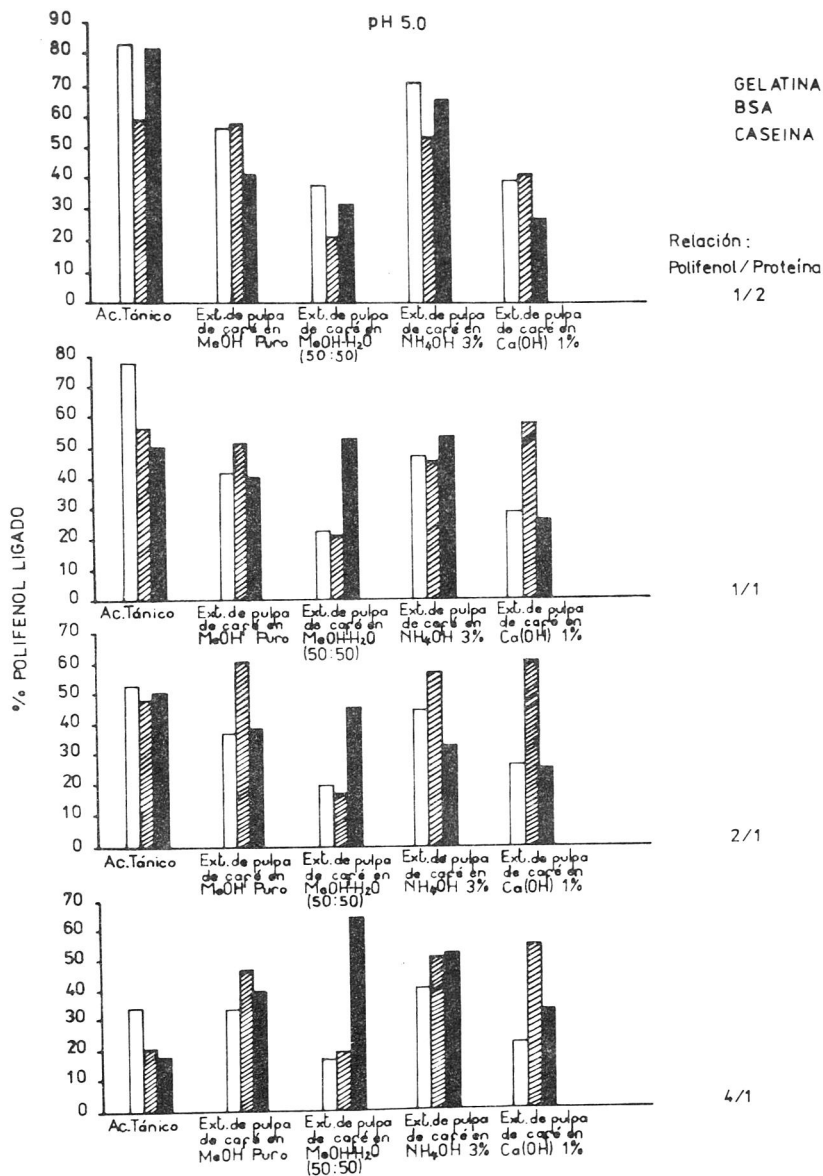


FIGURA 2

Porcentaje de polifenol ligado por diferentes proteínas

sometidos a ensayo, lo que puede atribuirse principalmente a la presencia de polifenoles condensados (14).

Si se considera que los resultados *in vitro* son indicadores de lo que ocurre en el animal, podríamos asegurar que al pH neutro del intestino ocurre una ligación de las proteínas dietarias y de algunas enzimas por los

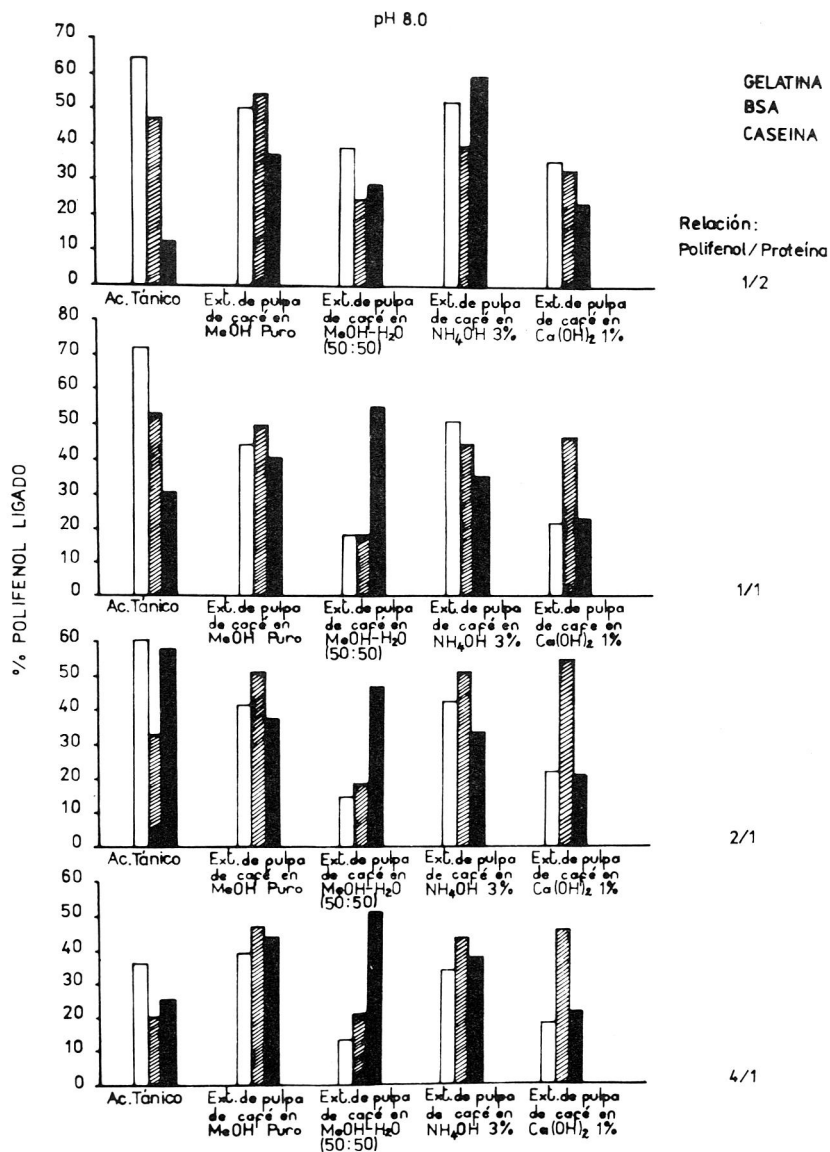


FIGURA 3

Porcentaje de polifenol ligado por diferentes proteínas

polifenoles presentes en la pulpa de café. Esta interacción polifenol-proteína puede ser responsable, en parte, del efecto antinutricional de la pulpa de café.

Lo expuesto concuerda con los ensayos realizados por Price *et al.* (15), quienes trataron una variedad de sorgo con un contenido alto de taninos con NH<sub>4</sub>OH 3%. Este último no solo redujo la cantidad de taninos,

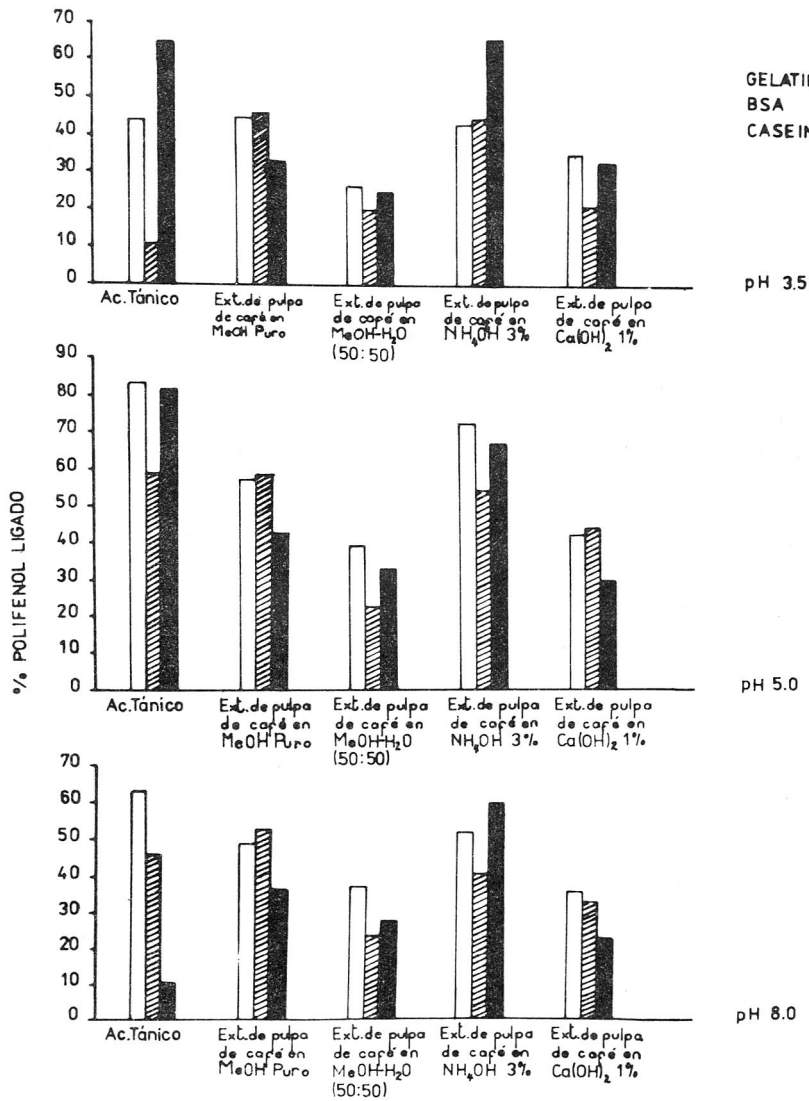


FIGURA 4

Porcentaje de polifenol ligado por diferentes proteínas  
Relación: polifenol-proteína, 1/2

sino que mejoró también su valor nutritivo, demostrado en ensayo con pollos.

Dueñas y de Tovar (16) también extrajeron la pulpa de café con solución amoniacal al 30/o y agitación mecánica, reduciendo en 800/o el contenido de polifenoles de la pulpa.

Podría, pues, pensarse que el tratamiento de la pulpa con  $\text{NH}_4\text{OH}$  30/o reduce la acción antifisiológica de ésta, aunque sería necesario corroborar esta posibilidad, con los ensayos biológicos del caso.

#### SUMMARY

##### *In vitro* INTERACTION OF POLYPHENOLS OF COFFEE PULP WITH SOME PROTEINS

The *in vitro* interaction of pure polyphenols and polyphenol extracts of coffee pulp with pure proteins was studied.

The polyphenols used for the assays were tannic acid, chlorogenic acid and catechin, and the proteins were gelatin, casein and bovin serum albumin (BSA). Different pHs and different polyphenol/protein ratios were used in the experiments. Extracts of coffee pulp in methanol, methanol-water (50:50), ammonium hydroxide 30/o, and calcium hydroxide 10/o, were used.

In general, the maximum binding of polyphenol with protein was obtained at a polyphenol/protein ratio of 1/2, at a pH of 5.0. The higher binding percentages were found with the ammonium hydroxide extract and with tannic acid. The lowest binding percentage was obtained with the methanol-water extract. The other extracts presented intermediate binding degrees.

The results herein reported demonstrate that the polyphenols of coffee pulp have capacity to bind proteins *in vitro* at the pHs assayed. This phenomenon may be the cause of the deficient protein utilization when coffee pulp is included in the animals' diet.

#### AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestra gratitud a las siguientes personas e instituciones:

A los Doctores Elizabeth López de Leal y Moisés Wasserman por su asistencia permanente y valiosa colaboración durante la realización de este trabajo; a las Secciones de Bioquímica del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia y del Instituto Nacional de Salud de Colombia, y al Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas "Colciencias", por su aporte financiero.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bressani, R., E. Estrada, L. G. Elfás, R. Jarquín & L. de Valle. Pulpa y pergamino de café. IV. Efecto de la pulpa de café deshidratada en la dieta de ratas y pollos. *Turrialba*, 23:403-409, 1973.
2. Glick, Z. & M.A. Joslyn. Effect of tannin acid related compounds on the absorption and utilization of proteins in the rat. *J. Nutr.*, 100:516-520, 1970.
3. Calderón, P., J. Van Buren & W. B. Robinson. Factors influencing the formation of precipitates and hazes by gelatin and condensed and hydrolyzable tannins. *J. Agr. Food Chem.*, 16:479-492, 1968.
4. Slinkard, K. & V. L. Singleton. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Vitic.*, 28:49-55, 1977.

5. Broadhurst, R. B. & W. T. Jones. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agr.*, 29:788-794, 1978.
6. Andersen, R. A. & J. R. Todd. Estimation of total tobacco plant phenols by their bonding to polyvinylpyrrolidone. *Tobacco Sci.*, 12:107-111, 1968.
7. 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, N. Y., 1982.
8. Haslam, E. **Chemistry of Vegetable Tannins**. New York, N. Y., Academic Press, 1966, p. 1-179.
9. Van Buren, J. P. & W. B. Robinson. Formation of complexes between protein and tannic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 17:722-777, 1969.
10. Butler, L. G., A. E. Hagerman & L. M. Price. **Polyphenols in Cereals and Legumes**. Proceedings of a Symposium held during the 26th Annual Meeting of the Institute of Food Technologists, Missouri. Joseph Hulse (Ed.). Ottawa, Canada, 1979.
11. Oh, H. I., J. E. Hoff, G. S. Armstrong & L. A. Haff. Hydrophobic interaction in tannin-protein complexes. *J. Agric. Food Chem.*, 28:394-398, 1980.
12. Loomis, W. D. & J. Bataille. Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes. *Phytochem.*, 5:423-438, 1966.
13. Synge, R. L. Interactions of polyphenols with proteins in plants and plant products. *Qual. Plant. Pl. Fds. Hum. Nutr.*, XXIV, 3/4:337-350, 1975.
14. 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.
15. Price, M. L., L. G. Butler, J. C. Rogler & W. R. Featherston. Overcoming the nutritionally harmful effects of tannin in sorghum's grain by treatment with inexpensive chemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 27:441-445, 1979.
16. Dueñas, J. A. & J. E. de Tovar. **Ensayos para Eliminar los Polifenoles de la Pulpa de Café Mediante Extracción con Solventes y Ensayos Biológicos del Mejor Tratamiento**. Tesis de Grado. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, 1979.