



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

EFECTO DE LA DIGESTION *IN-VITRO* SOBRE EL
CONTENIDO DE β -CAROTENO EN BLEDO (*Amaranthus*
spp.), CHIPILIN (*Crotolaria longirostrata*), ESPINACA
(*Spinacea oleracea*) Y MACUY (*Solanum nigrum*)

MICHELE ADELINE MURY AREVALO

Trabajo de investigación presentado para optar
al grado académico de Licenciada en Bioquímica

Guatemala

1990

EFECTO DE LA DIGESTION *IN-VITRO* SOBRE EL
CONTENIDO DE β -CAROTENO EN BLEDO (*Amaranthus*
spp.), CHIPILIN (*Crotolaria longirostrata*), ESPINACA
(*Spinacea oleracea*) Y MACUY (*Solanum nigrum*)

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

EFECTO DE LA DIGESTION *IN-VITRO* SOBRE EL
CONTENIDO DE β -CAROTENO EN BLEDO (*Amaranthus*
spp.), CHIPILIN (*Crotolaria longirostrata*), ESPINACA
(*Spinacea oleracea*) Y MACUY (*Solanum nigrum*)

MICHELE ADELINE MURY AREVALO

Guatemala

1990

Vo. Bo.:

(f) Concepción Mendoza de Bosque
Licda. Concepción Mendoza de Bosque
Asesora

Tribunal:

(f) Concepción Mendoza de Bosque
Licda. Concepción Mendoza de Bosque

(f) Ricardo Bressani
Dr. Ricardo Bressani

(f) Juan de Dios Calle
Dr. Juan de Dios Calle

Fecha de aprobación: 8 de octubre de 1990

A mi familia,
especialmente a mi Mamá

AGRADECIMIENTO

A la Universidad del Valle de Guatemala por su formación.

A la División de Ciencias Agrícolas del Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP) por la oportunidad de realizar mi Tesis.

A la Licda. Conchita de Bosque y al Dr. Ricardo Bressani por su asesoría en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Juan de Dios Calle por todas sus enseñanzas durante mi carrera.

A la Licda. Margarita Selle por su ayuda incondicional en el trabajo de análisis químico.

Al Sr. Hugo Paz del INCAP por toda su colaboración.

A Gabriel Guzmán por su comprensión y apoyo en todo momento.

RESUMEN

Se desarrolló una metodología de simulación del proceso digestivo para evaluar el efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de beta-caroteno de cuatro muestras vegetales: Bledo (*Amaranthus spp.*), chipilín (*Crotalaria longirostrata*), espinaca (*Spinacea oleracea*) y macuy (*Solanum nigrum*). Se evaluó la digestibilidad *in-vivo* de beta-caroteno de las muestras, obteniéndose una digestibilidad del 100%.

En la evaluación del efecto de la digestión *in-vitro* de beta-caroteno, los resultados sugieren que el proceso digestivo degrada los carotenos, no por acción enzimática, sino por cambios de pH y/o temperatura. Esto indica que el método convencional de evaluación de la digestibilidad *in-vivo* puede sobreestimar la digestibilidad del beta-caroteno, pues considera como absorbido el beta-caroteno degradado.

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
A. Vitamina A y Carotenoides	3
B. Metabolismo de la Vitamina A	7
C. Requerimiento y deficiencia de Vitamina A	10
D. Valoración de vitamina A en dietas	12
E. Proceso digestivo	14
III. OBJETIVOS	22
IV. TRABAJO EXPERIMENTAL	23
A. Metodología	23
1. Recolección, procesamiento y análisis de las muestras vegetales	23
2. Evaluación de la digestibilidad <i>in-vivo</i> de β -caroteno en las muestras vegetales	24
3. Proceso de digestión <i>in-vitro</i> de las muestras vegetales	27
B. Materiales	29
1. Muestras	29
2. Animales experimentales	30

	Páginas
3. Equipo	30
4. Reactivos específicos	30
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
A. Análisis de las muestras vegetales	32
B. Evaluación de la digestibilidad <i>in-vivo</i> de β -caroteno en las muestras vegetales	34
C. Proceso de digestión <i>in-vitro</i> de las muestras vegetales	35
1. Prueba 1	35
2. Prueba 2	36
3. Prueba 3	38
4. Prueba 4	39
5. Método final para la evaluación del efecto de la digestión <i>in-vitro</i> en el contenido de β -caroteno en las muestras vegetales	41
VI. CONCLUSIONES	45
VII. RECOMENDACIONES	46
VIII. LITERATURA CITADA	47
APENDICES	
A. Métodos de análisis utilizados en la presente investigación	55

	Páginas
B. Algunos cromatogramas obtenido por HPLC para la cuantificación de β -caroteno	59
C. Resultados del análisis estadístico para la comparación de tratamientos del método de digestión <i>in-vitro</i> de β -caroteno en muestras vegetales	81

I. INTRODUCCION

La hipovitaminosis A es uno de los principales problemas nutricionales del mundo, especialmente en los países en desarrollo (1). Aunque esta deficiencia afecta varios tejidos (2, 3), su principal consecuencia es la xeroftalmia, la cual puede causar hasta ceguera (4).

Debido a la poca disponibilidad y acceso de la mayoría de las poblaciones de los países en desarrollo a los alimentos de origen animal ricos en vitamina A, las principales fuentes consumidas las constituyen vegetales verdes y amarillos (4). Con base en ésto, se ha desarrollado un programa que, entre otras cosas, pretende promover el cultivo y consumo de verduras y frutas ricas en carotenos (5).

Hoy en día, existen grandes dudas sobre la exactitud de las cifras de las tablas de composición de alimentos en lo que respecta al contenido de vitamina A (6). Principalmente, en el caso de los vegetales, donde se cuantifican los carotenos totales y se expresan en términos de β -caroteno (7). Aquí, ya se está sobreestimando el contenido de vitamina A en la fuente, pues ningún otro caroteno presenta mayor actividad como provitamina A que el β -caroteno (2). Una solución a esto la presenta la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), por medio de la cual se pueden separar y cuantificar los principales carotenos (4, 8).

Además de los métodos químicos o analíticos para la valoración de vitamina A en dietas, existen los métodos biológicos, entre los cuales se encuentra la determinación de la digestibilidad *in-vivo*. Para determinar la digestibilidad *in-vivo* de carotenos, se mide la cantidad de éstos en el alimento ingerido por el animal, así como el excretado en las heces; la diferencia se asume que fue la cantidad absorbida (6). En el caso de que

hubiera alguna degradación de carotenos a lo largo del proceso digestivo, se podría estar sobreestimando la digestibilidad de estos, pues no necesariamente todo lo que no fue excretado fue absorbido; pudo haber sido simplemente degradado. Esta inquietud fue la que nos llevó a realizar el estudio, en el cual se trató de determinar el efecto de la digestión en los carotenos al simular *in-vitro* el proceso digestivo. Estos resultados podrían corroborar si en realidad la digestibilidad *in-vivo* es o no una sobreestimación de la digestibilidad.

II. ANTECEDENTES

A. Vitamina A y Carotenoides

Vitamina A es un término genérico que se aplica a todos los compuestos que tienen actividad biológica de vitamina A. Incluye los compuestos de retinol y los carotenos convertibles en retinol (6). Las dos formas naturales de vitamina A, retinol (A1) y 3-dehidroretinol (A2), son alcoholes isoprenoides C-15 conteniendo anillos β -ionona y 3-dehidro- β -ionona sustituidos, respectivamente (Figura 1). Estos compuestos son aceites amarillentos sensibles al oxígeno y luz ultravioleta, además de ser prácticamente insolubles en agua. Aunque el hombre no puede biosintetizar la estructura de la β -ionona, puede obtener el aldehído de retinol mediante el rompimiento catalizado por la dioxigenasa intestinal de los carotenos provenientes de las plantas, los cuales sirven como provitamina. El retinal se reduce luego a retinol mediante enzimas dependientes de piridinas (9).

Los carotenoides son pigmentos liposolubles, amarillos y rojos, compuestos por una clase de hidrocarburos (carotenos) y sus derivados oxigenados como oxicarotenoides o xantofilas. Los carotenoides se presentan en casi todos los tejidos de las plantas (10), principalmente en las hojas verdes como componentes universales de los cloroplastos. Tanto los carotenos como las xantofilas se encuentran enlazados o íntimamente asociados con proteínas o lípidos y, aparentemente, son componentes del complejo clorofila-proteína (2, 11). La estructura básica de los carotenoides consiste en ocho unidades isoprenoides. Una serie de dobles enlaces conjugados provee la característica de cromóforo. Debido a la naturaleza no saturada de los carotenoides, son especialmente sensibles a la luz, calor, oxígeno y medios alcalinos (2). Se oxidan muy rápidamente, sobre todo en los dobles enlaces, formando de esta manera epóxidos. La figura 2

FIGURA 1

Estructuras de las formas naturales
de Vitamina A (9)

R = CH₂OH para Retinols

CHO para Retinales

CO₂H para Acidos Retinoicos

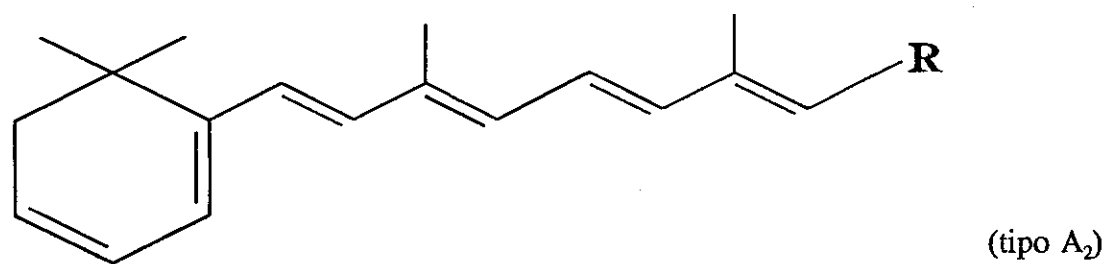
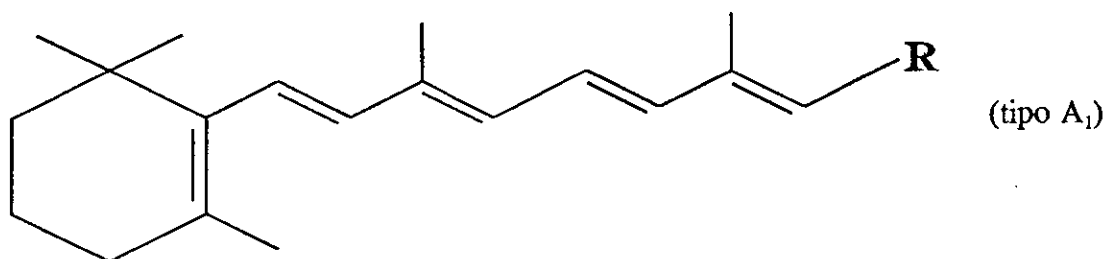
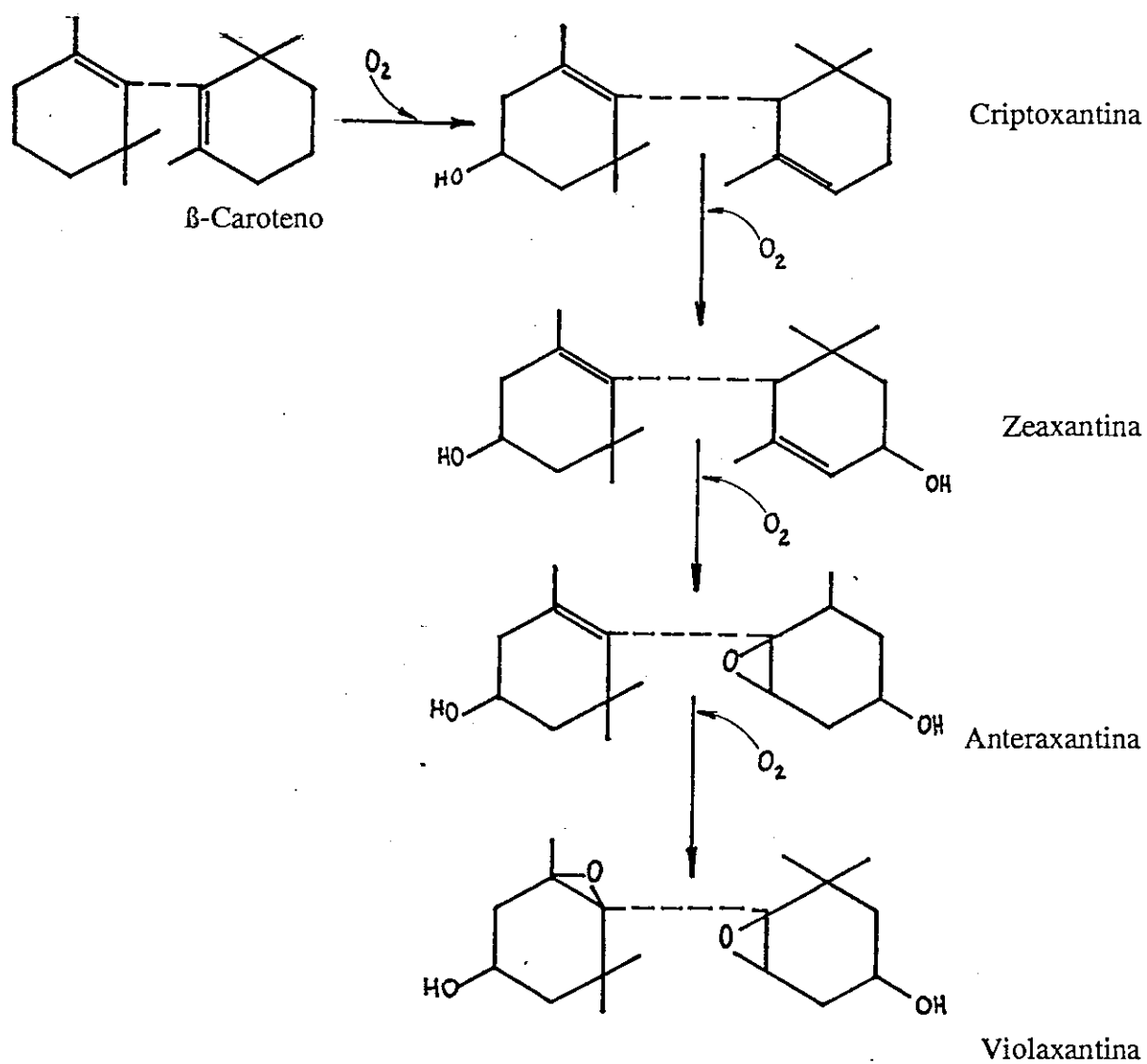


FIGURA 2

Hidroxilación y epoxidación del β -caroteno (13)



muestra la hidroxilación y epoxidación secuencial del β -caroteno. Existen indicios de que la oxidación y desintegración subsiguiente de los carotenoides se inicia en la terminación de la molécula y no ocurre al azar (Figura 3) (12).

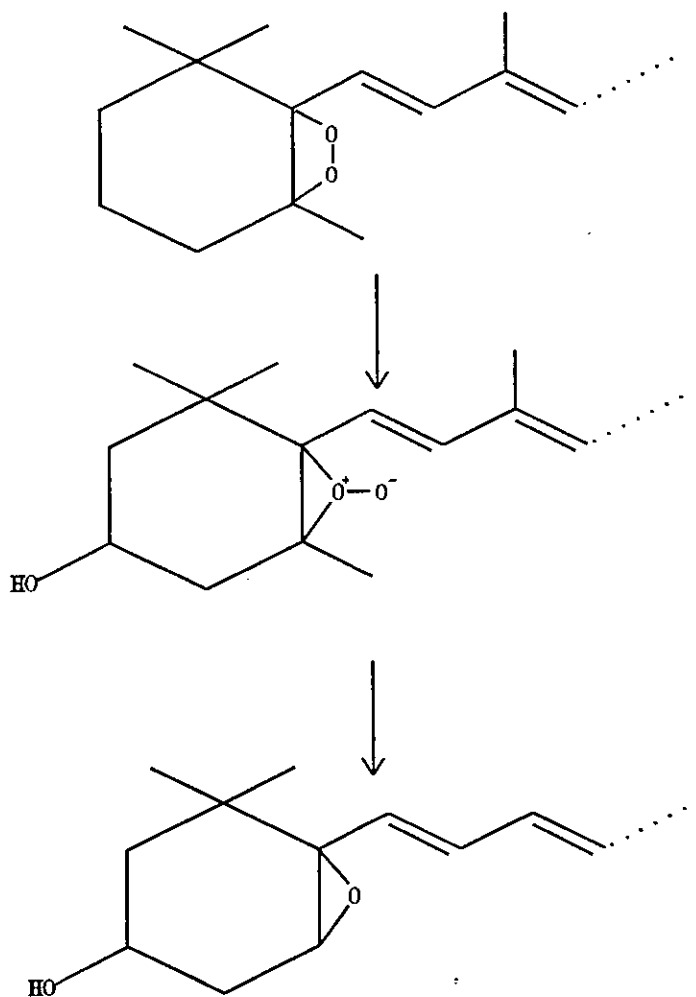
La biopotencia de los carotenoides como precursores de vitamina A depende de su estructura. Esto explica como el β -caroteno es el carotenoide que presenta la mayor actividad como provitamina A, ya que la molécula de éste es perfectamente simétrica y al romperse por la mitad (en el enlace 15-15') e hidratarse, producirá dos moléculas de retinol (Figura 4) (6, 14).

Otros de los principales compuestos provitamina A, no tan eficientes como el β -caroteno, son alfa-caroteno, gama-caroteno y criptoxantinas (Figura 5). Además existen otros precursores de vitamina A de menor actividad (Tabla 1) (2).

Ya que la vitamina A no es sintetizada por mamíferos, incluyendo al hombre, debe obtenerse de la dieta, ya sea como vitamina A, un derivado de vitamina A o como carotenoides provitamina A. La biosíntesis de vitamina A a partir de carotenoides provitamina A se lleva a cabo principalmente en la mucosa intestinal durante la absorción, mediante el rompimiento simétrico (β -caroteno) o asimétrico (otros carotenoides) y/u oxidación terminal para producir retinal, el cual se reduce luego a retinol (15).

FIGURA 3

Posible mecanismo para la formación de
5,6-epóxidos (10)



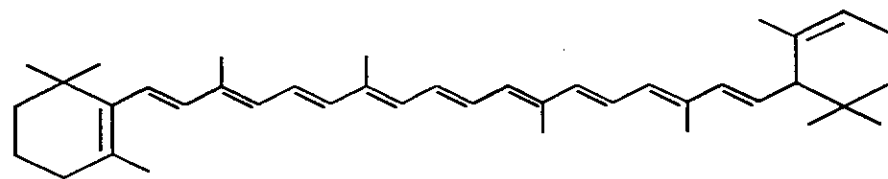
B. Metabolismo de la vitamina A

Una vez ingeridos los alimentos, la vitamina A preformada de los tejidos animales y los carotenoides provitamina A, son liberados de las proteínas por la acción de la pepsina en el estómago y enzimas proteolíticas en el intestino delgado. En el estómago, los carotenoides libres y ésteres de retinilo tienden a formar glóbulos grasos, los cuales entran al duodeno. En presencia de sales biliares, estos glóbulos se rompen en pequeños grumos lipídicos, los cuales son más fácilmente digeribles por la lipasa pancreática, hidrolasa de ésteres de retinilo, hidrolasa de ésteres de colesterol y similares. Las micelas resultantes, que contienen retinol, carotenoides, esteroides, mono y diglicéridos, algunos fosfolípidos y ácidos grasos, se difunden dentro de la capa de glicoproteínas que rodean los microvellos y se ponen en contacto con las membranas celulares. Luego, varios componentes de las micelas, excepto las sales biliares, son absorbidas por las células de la mucosa, principalmente en la parte superior del intestino (16).

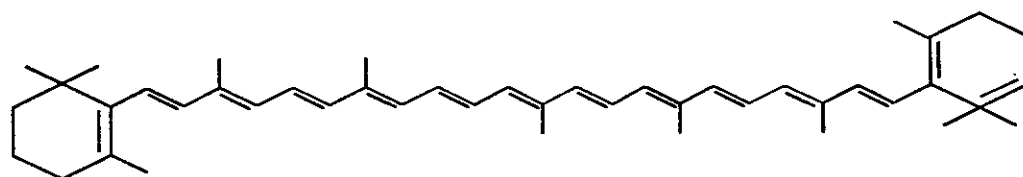
El retinol que ha sido absorbido de la solución micelar y el que ha sido sintetizado en la mucosa a partir de carotenoides provitamina A son esterificados (2). El éster formado predominantemente es el palmitato, junto con pequeñas cantidades de oleato, esterato y otros acil ésteres grasos (16). Estos ésteres en asociación con los quilomicrones pasan vía el sistema linfático al hígado, donde las células del parénquima hidrolizan los ésteres de retinilo para formar retinol. Proteínas enlazadoras de Retinol (RBP, por las siglas en Inglés) intrahepáticas se unen al retinol, el cual se reesterifica por acil-CoA y se almacena como un complejo glicoproteínico (9). Aunque la mayoría de retinol está almacenado en el hígado en forma de ésteres, existe un 10% como alcohol libre. Hay evidencia de que estas dos presentaciones difieren en su distribución en las células hepáticas (17).

FIGURA 5

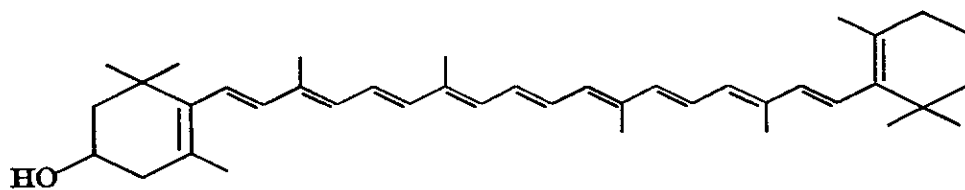
Fórmulas estructurales de α -caroteno,
 γ -caroteno y Criptoxantina (2)



α -Caroteno



γ -Caroteno



Criptoxantina

TABLA 2.1

Actividad de Carotenoides provitamina A (2)

Carotenoide	Actividad (%)
β -caroteno	100
α -caroteno	50-54
τ -caroteno	42-50
β -zeacaroteno (7'-8'-Dihidro- τ -caroteno)	20-40
β -caroteno 5'-6' monoepóxido	21
β -caroteno 5'-8' monofuranóxido (mutatocromo, citroxantina, flavacina)	50
Criptoxantina (3-hidroxi- β -caroteno)	50-60
Isocriptoxantina (4-hidroxi- β -caroteno)	48
β -apo-2'-carotenal	activo
β -apo-8'-carotenal	72
β -apo-10'-carotenal	activo
β -apo-12'-carotenal	120
β -apo-8'-ácido carotenoico	activo
Citranaxantina	44

La movilización de la reserva hepática de vitamina A y su distribución a los tejidos periféricos comienza con un precursor de la RBP (pre-RBP), el cual se sintetiza en el hígado y después de su conversión a RBP en las células del parénquima, se une al all-trans retinol y es entonces cuando se secreta al plasma (16). En el plasma, la RBP circula como un complejo formado al unirse con otra proteína mayor, la pre-albúmina, la cual le confiere estabilidad a la interacción entre el retinol y la RBP, previniendo la pérdida de la pequeña molécula de RBP por filtración glomerular (18).

La movilización de retinol hepático y su distribución a los tejidos periféricos está regulado por la velocidad de síntesis y secreción de las proteínas acarreadoras (RBP); la producción de éstas, a su vez, está regulada por el retinol disponible (9).

Al llegar el retinol unido a la RBP a los tejidos que lo requieren y que poseen receptores de superficie para la holo- RBP, se une a estos receptores y se libera el retinol transfiriéndose a través de la membrana. Dentro de la célula, el retinol es aparentemente enlazado por proteínas específicas en el citosol, las Proteínas Celulares Enlazadoras de Retinol (CRBP). Estas proteínas no sólo protegen al retinol de la oxidación, sino que sirven como acarreadores de éste hasta su sitio intracelular de acción. Otra proteína intracelular, específica para el ácido retinoico, es la Proteína Celular Enlazadora del Acido Retinoico (CRABP) (16).

C. Requerimiento y deficiencia de vitamina A

El requerimiento de vitamina A de los diferentes tejidos depende de la función de ésta, involucrada en cada tejido. En general, la vitamina A es necesaria en todos los tejidos para mantener la diferenciación de éstos. Además, el retinol es indispensable para que se lleve a cabo, normalmente, el ciclo de la visión y el ácido retinoico es necesario para el crecimiento (16).

La deficiencia de vitamina A tiene un efecto sistémico en el organismo, ya que es necesaria en todos los tejidos. Estos tejidos tienen diferentes requerimientos de ésta, por lo que la evidencia funcional de una ingesta inadecuada se expresa de varias formas, dependiendo en qué parte del ciclo de vida del organismo ocurre la deficiencia y si ésta es crónica o aguda. Estos factores son la causa de la diferencia en la secuencia de la manifestación de los signos clínicos de la progresión de la deficiencia, entre individuos de la misma y diferente especie (2, 16).

En el hombre, las manifestaciones predominantes de deficiencia de vitamina A son las oculares y, generalmente, proveen una clara evidencia del estado de deficiencia. El término Xeroftalmia se utiliza para indicar colectivamente todas las lesiones oculares resultantes de la deficiencia de vitamina A (18). Este término incluye ceguera nocturna, xerosis conjuntiva, xerosis de la córnea, manchas de Bitot, ulceración de la córnea, queratomalacia, cicatrices de la córnea y xeroftalmia fundus (16).

Otros signos clínicos no oculares que se dan en casos de deficiencia de vitamina A son: Aumento de la presión del líquido cerebroespinal (más común en animales), anorexia, disminución en la velocidad de ganancia de peso durante el crecimiento, anormalidades en balance y respuesta inmune, aumento en la susceptibilidad a infecciones, metabolismo impedido de hierro, disturbios en el sistema reproductor, hiperqueratosis folicular y anormalidades en el proceso de maduración de la coclea (involucrándose así el sentido auditivo) (2, 3).

Para evitar la deficiencia de vitamina A se debe ingerir, por lo menos, la cantidad mínima recomendada, la cual difiere para los humanos dependiendo de la edad, sexo y estado fisiológico (16).

Las principales fuentes de vitamina A en países desarrollados son los productos animales, mientras que en los países en desarrollo, como el nuestro, las frutas, vegetales amarillos y hojas verdes, constituyen las fuentes de mayor importancia (2).

D. Valoración de vitamina A en dietas

Para la valoración de vitamina A y sus precursores en dietas se han empleado dos enfoques distintos, el químico o analítico y el biológico (2).

Se han utilizado una variedad de métodos analíticos para determinar la concentración de vitamina A en preparaciones químicas o farmacéuticas, plasma, tejidos y alimentos. El método varía dependiendo de la muestra y de lo que se desee determinar (Retinol, sus ésteres, carotenoides totales o algún carotenoide en especial) (16, 19).

La determinación cuantitativa de carotenos, básicamente puede considerarse en tres pasos esenciales: a) extracción del pigmento mediante saponificación y extracción con solventes adecuados; b) separación de éstos de xantofilas y clorofila, así como de productos de la oxidación de los carotenos y otras impurezas de color; y c) medición del contenido de caroteno en el extracto purificado (7, 8, 19, 20). En caso que se desee identificar o cuantificar uno o varios de los distintos carotenos, es necesario llevar a cabo una separación cromatográfica previa a la medición. Esto es importante en el caso que se desee cuantificar únicamente los distintos carotenos provitamina A que interesen en el análisis (4, 21, 22).

En los últimos años se ha utilizado la cromatografía líquida de alta presión o resolución (HPLC) para la medición y aislamiento de carotenoides en fuentes vegetales (8, 16, 23, 24, 25, 26, 27), así como en otras sustancias (8, 28, 29). Este método tiene

la ventaja de que se necesitan cantidades muy pequeñas de muestra, no es destructivo, es altamente sensible y provee excelente resolución (8, 16, 20).

La respuesta fisiológica de una especie a una provitamina, mezcla de provitaminas o vitamina A, sólo puede evaluarse mediante métodos biológicos. Los más usados son las pruebas clásicas de respuesta de crecimiento en ratas deficientes en vitamina A, ensayos de almacenamiento hepático en ratas y pollos, la técnica del frotis vaginal y la medición de la presión del líquido cerebrospinal (2, 16, 19, 30). Últimamente se han introducido sistemas de cultivo en órganos y células para la valoración de la actividad biológica de la vitamina A (16).

Estos métodos biológicos, principalmente el ensayo de almacenamiento hepático, se utilizan para estudios sobre la biodisponibilidad de la vitamina A en alguna fuente de ésta (6, 31, 32).

Al igual que otras sustancias, la digestibilidad de los carotenos usualmente se determina *in-vivo*, midiendo el contenido de éstos en la fuente, y luego midiendo los carotenos excretados en las heces del animal que los ingirió (6, 33).

Aunque existen métodos para la determinación *in-vitro* de la digestibilidad de proteínas, carbohidratos y otras sustancias, no existe ninguno para la determinación *in-vitro* de la vitamina A o sus precursores (7, 33-38).

La ventaja de la determinación *in-vitro* de la digestibilidad sobre el método *in-vivo*, consiste en ahorro de tiempo y dinero, pues no se trabaja con animales de laboratorio (34, 35). Además, el método *in-vivo* está limitado por las diferencias en el proceso digestivo del animal experimental y el humano (39). La desventaja del método *in-vitro* consiste en la dificultad de reproducir las condiciones reales del proceso digestivo,

obteniéndose así resultados distintos a los verdaderos. En estos casos se aconseja comparar ambos métodos y establecer una correlación entre ellos, para poder obtener un factor de corrección y saber cuán alejado están los resultados de la realidad (40, 41).

Para poder diseñar un método *in-vitro* para la determinación de la digestibilidad de la vitamina A, es necesario conocer los mecanismos de digestión para tratar de reproducirlos lo mejor posible.

E. Proceso Digestivo

La digestión consiste, principalmente, de un conjunto de reacciones catabólicas mediante las cuales se degradan las macromoléculas de carbohidratos, proteínas y lípidos de los alimentos. Los productos de la digestión son suficientemente pequeños para atravesar las paredes de los órganos digestivos hacia los capilares sanguíneos y linfáticos y, finalmente, a las células de los diversos tejidos del organismo (42).

Los principales carbohidratos que componen la alimentación son almidones, dextrinas, disacáridos y monosacáridos (43). La degradación de los carbohidratos se inicia en la boca por la acción de la amilasa salival o ptilina. Esta enzima rompe rápidamente la parte amilosa del almidón para formar maltosa y maltotriosa, y la porción amilopectina solamente se rompe parcialmente formando maltosa, maltotriosa y alfa-dextrinas (38, 44). La actividad óptima de la ptilina se realiza entre 37 y 39.5 grados centígrados y con un pH entre 6.5 y 6.9. La acción de esta enzima es breve en la cavidad bucal, pero los almidones o sus derivados, empapados en saliva, continúan siendo digeridos por ésta en el estómago, hasta que los ácidos de este órgano finalmente la inactivan (42, 43). Otra enzima que actúa sobre el almidón es la amilasa pancreática o amilopsina, ésta desdobla las dextrinas formando maltosa (42). Esta enzima actúa en medio neutro, débilmente alcalino o débilmente ácido; pero su actividad óptima se produce con un pH de 6.7 a 7.

Además, el ion cloruro es absolutamente indispensable para su actividad digestiva (43). En siguiente término, las disacaridasas del jugo intestinal, maltasa, sucrasa, lactasa y alfa-dextrinasa (isomaltasa), descomponen a los disacáridos en monosacáridos (44). Con ésto se completa la digestión de los carbohidratos.

La digestión de proteínas se inicia en el estómago. En el adulto, esta actividad se lleva a cabo, principalmente, por acción de la enzima denominada pepsina, que rompe algunos enlaces peptídicos específicos para fraccionar las proteínas. La acción de la pepsina es muy eficaz en el medio gástrico (pH de 1.5 a 2.5), mientras que muestra inactividad en medios alcalinos. La pepsina es secretada en una forma inactiva llamada pepsinógeno, el cual al entrar en contacto con el ácido clorhídrico secretado por las células parietales, se transforma en la sustancia activa. El estómago de los lactantes produce la enzima digestiva llamada renina, la cual es importante para la digestión de la leche, pues al coagularla, impide que pase rápidamente a los intestinos. Las proteínas se continúan digiriendo por acción de las enzimas del jugo pancreático. La tripsina degrada cualquier proteína que no haya sufrido transformaciones previas o las fracciones ya desdobladas. Esta enzima es secretada por el páncreas en forma de tripsinógeno, el cual es activado por una enzima intestinal denominada enteroquinasa (42). El pH óptimo para la acción de la tripsina es alrededor de 8 y el de la enteroquinasa se encuentra entre 5.3 y 6.1 (43). La quimotripsina es otra enzima pancreática de acción parecida a la tripsina pero de distinta especificidad (45). Esta enzima también se secreta en forma inactiva, como quimotripsinógeno, y es la tripsina la que lo activa. El pH óptimo de la quimotripsina es alrededor de 8 (43). Otras enzimas proteolíticas pancreáticas son las carboxipeptidasas A y B. Estas enzimas convierten parcial o totalmente las proteínas digeridas en aminoácidos. Se secretan como pro- carboxipeptidasas y se activan por acción de la tripsina en el intestino delgado (42, 46). Finalmente, un grupo de enzimas intestinales a las que se les da el nombre conjunto de erepsina, completan la digestión de

las proteínas al convertir los dipéptidos restantes en aminoácidos sencillos, los cuales ya pueden ser absorbidos (42) y el pH óptimo de estas enzimas es de 7.9 a 8.2 (43).

Las nucleoproteínas son digeridas por enzimas de la pared intestinal: nucleasas, nucleotidasas y nucleosidasas. Las nucleasas actúan sobre el ácido nucleico dividiéndolo en sus nucleótidos constitutivos. Las nucleotidasas desdoblan los nucleótidos en nucleósidos y ácido fosfórico, y las nucleosidasas separan las pentosas y las bases purínicas de los nucleósidos. En la pared entérica y en otros tejidos, se encuentra también la arginasa, que convierte la arginina en ornitina y urea y la fosfatasa que pone en libertad los distintos ésteres fosfóricos (43).

Aunque la digestión de lípidos se lleva a cabo, en su mayoría, en el lumen del intestino delgado, la digestión comienza con la acción de una esterasa pregástrica (47). El término esterasa pregástrica es el más ampliamente aceptado para enzimas esterolíticas o lipolíticas secretadas por tejidos orales de mamíferos. Enzimas de origen oral también reciben el nombre de enzima glandular, preparación oral glandular, lipasa oral, lipasa lingual, lipasa faringear, lipasa salivar (48) o lipasa gástrica (47). El pH óptimo de la lipasa gástrica humana puede variar entre 4 y 8, dependiendo del sustrato usado. Y al igual que la mayoría de lipasas, es más activa a una temperatura entre 30 y 40 grados centígrados (49). La mayor fuente de esta actividad lipolítica gástrica se origina en un grupo de glándulas serosas (von Ebner), debajo de las papilas circunvalantes de la lengua (50).

En el estómago se lleva a cabo una emulsificación debido a las contracciones musculares y a emulsificadores potenciales que pueden funcionar en medio ácido (productos peptídicos de la digestión de proteínas de la dieta, polisacáridos complejos y fosfolípidos derivados de membranas). Además, es también en el estómago donde se inicia la hidrólisis de lípidos, por la acción de la lipasa lingual. Sin embargo, la

hidrólisis y absorción cuantitativa, especialmente de ácidos grasos de cadenas largas, requieren de condiciones menos ácidas, lipasas apropiadas y detergentes (sales biliares), y de células de absorción especializadas. Esto se provee posteriormente en el intestino delgado. La hidrólisis de lípidos de la dieta por la acción de la lipasa lingual facilita la hidrólisis duodenal de varias maneras: a) Ácidos grasos de cadenas largas disueltos en gotas de grasa se ionizan parcialmente y promueven la emulsificación fina en el duodeno. b) Pequeñas cantidades de estos ácidos grasos aumentan la unión de la colipasa con la interfase de emulsión y, como resultado de esto, se promueve la unión de la lipasa con la colipasa. c) Los diglicéridos, al estar más activos en la superficie, pueden localizarse preferentemente en la interfase emulsión-agua, donde son hidrolizados más rápido por la lipasa pancreática. d) La absorción de ácidos grasos de cadenas largas en el duodeno inicia la liberación de colecistoquinina (CCK), la cual induce la contracción de la vesícula biliar, la relajación de la esfínter de Oddi y la secreción de las enzimas pancreáticas. e) Ya que la lipasa lingual no es afectada por los anfifílicos del lumen, incluyendo las sales biliares, continúa la hidrólisis de di- y triglicéridos en el duodeno a un pH de 5-7 (50).

La emulsión lipídica formada en el estómago pasa al intestino delgado en forma de finas gotas de lípido con un diámetro menor que $0.5 \mu\text{m}$ (47) y entran en contacto con la bilis, jugo pancreático y jugo intestinal. El cambio abrupto del pH del estómago al duodeno causa un cambio en el comportamiento físico de los ácidos grasos en la emulsión cruda. Estos se ionizan parcialmente y migran a la interfase de la partícula de emulsión y comienza una emulsificación espontánea limitada (50). Luego estas partículas entran en contacto con la bilis.

Los componentes de la bilis de mayor interés fisiológico son las sales biliares, lecitina y colesterol. La razón molar de sales biliares-lecitina-colesterol es del orden de 11:3:1 y la lecitina y el colesterol están presentes en forma micelar mixta con las sales biliares. Además, la bilis también contiene glucoproteínas, proteínas, pigmentos biliares y una

menor cantidad de otros compuestos como vitaminas liposolubles y derivados de éstas (51). Las sales biliares humanas constan de las sales de sodio y potasio de los conjugados glicínicos y taurínicos de los ácidos cólico, quenodeoxicólico y deoxicólico (los nombres sistemáticos de estos son: ácido 3 alfa-, 7 alfa-, 12 alfa-trihidroxicolanoico; ácido 3 alfa-, 7 alfa-dihidroxicolanoico y ácido 3 alfa-, 12 alfa-dihidroxidocolanoico, respectivamente) (52). La principal función de las sales biliares es actuar como detergentes para la formación de micelas. Pero para esto es necesario que los ácidos biliares estén conjugados, ya que los no conjugados no son buenos detergentes bajo las condiciones del contenido intestinal, y no son resistentes al ácido (53). Una micela es un agregado coloidal formado espontáneamente por compuestos anfifílicos en agua, en concentración mayor que la concentración micelar crítica (CMC), y a una temperatura de solución mayor que la temperatura micelar crítica (TMC) (52, 54). Se ha reportado que la CMC de ácidos biliares es de 10^{-3} a 10^{-4} moles por litro (55). A diferencia de las soluciones típicas de emulsiones, las soluciones micelares usualmente son transparentes, constan de partículas más pequeñas (3-10 μm), se forman espontáneamente cuando la concentración del anfifílico excede la CMC, son totalmente estables y contienen alto contenido del anfifílico (53). Fisiológicamente, a la fase micelar formada por la acción de las sales biliares, se le denomina fase acuosa. Esta fase acuosa es una mezcla de micelas, formas monoméricas de los ácidos biliares y lípidos (56). Antes de la acción biliar, la fase acuosa consta, principalmente, de ácidos grasos y, en menos cantidad, monoglicéridos. Los di- y triglicéridos, ácidos grasos protonados de cadenas largas, alcoholes de cadenas largas, aminas y aldehídos, vitamina A, D, E y K, colesterol y sitosterol, se encuentran en la fase oleica (51, 54). La adición de las sales biliares remueve lípidos a la fase micelar, esto depende de la polaridad del compuesto y de la concentración de las sales biliares (51). Experimentos *in-vitro* han mostrado que la fase micelar o acuosa es la forma física preferente para la absorción de grasa por la mucosa intestinal (57, 58).

A diferencia de otros detergentes, las sales biliares tienen la capacidad de ser reabsorbidas por el intestino, permitiendo que se dé una alta concentración de detergente en el lumen del duodeno, lo cual es de fundamental importancia para la absorción de grasas de la dieta. Además, la estructura de la molécula de las sales biliares es tal que las micelas formadas interactúan con el producto de la lipólisis pancreática en una forma cuantitativa específica. También tiene la capacidad de afectar las enzimas lipolíticas. Difiere también de otros detergentes en que las sales biliares por sí solas no solubilizan grasas no polares en grandes cantidades, pero la micela mixta de sales biliares-monoglicéridos-jabón tiene mayor capacidad de hacerlo (51).

Las lecitinas de la bilis son necesarias para mantener el colesterol biliar en solución, ya que la solubilidad del colesterol en la bilis es bastante baja. Por esto mismo, la razón molar de sales biliares-lecitina-colesterol es de mucha importancia. Los productos de la acción de la fosfolipasa A_2 sobre los fosfolípidos, tanto biliares como de la dieta, reciben el nombre de lisofosfolípidos. Estos son detergentes con propiedades similares a las sales biliares. La lisolecitina aumenta la incorporación del colesterol a la fase micelar y puede ser de gran importancia para la absorción intestinal de lípidos no polares (51).

Aún no se conoce exactamente la función del colesterol biliar. Posiblemente es útil como suplemento continuo de colesterol para la membrana de las células de la mucosa del intestino. También podría ser importante como buffer para las variaciones de pH dados por el colesterol de la dieta (51).

Cuando los lípidos se encuentran estado micelar, actúan más fácilmente sobre ellos las enzimas lipolíticas del jugo pancreático. Estas enzimas son: lipasa pancreática que requiere de la colipasa, fosfolipasa A_2 y colesterol esterasa.

La lipasa pancreática, al igual que la lipasa lingual, son específicas para enlaces ésteres primarios (sn-1 y sn-3) de triglicéridos, en cambio, los enlaces ésteres de ácidos grasos de 2-monoglicéridos, fosfolípidos y colesterol, son resistentes. Ambas enzimas son más activas con ácidos grasos de cadenas cortas (50). La lipasa pancreática trabaja en la interfase entre las fases oleica y acuosa. Su actividad se inhibe grandemente en presencia de sales biliares en concentraciones mayores a la CMC (47). Esto se debe a que las sales biliares desplazan la lipasa pancreática de las interfases, inhibiendo así su actividad (59). Entonces, en presencia de sales biliares, la colipasa se une a la superficie de las micelas que contienen los lípidos y provee un sitio de unión para la lipasa. Así pues, la colipasa es un pre-requisito para la actividad de la lipasa en presencia de sales biliares (59, 60). El pH óptimo de la lipasa pancreática es de 7.5-8.0 y además requiere de iones de calcio para su actividad (46), ya que éstos mantienen su estabilidad. Los iones de calcio también aceleran el proceso de la formación de diglicéridos, monoglicéridos y glicerol. Además, su principal función es la de remover ácidos grasos formados en la hidrólisis, mediante la formación de jabones insolubles de calcio (49).

La fosfolipasa pancreática A_2 cataliza la hidrólisis de los ácidos grasos esterificados en la posición sn-2 de una gran variedad de fosfoglicéridos, pero no tiene ningún efecto en esfingolípidos. Esta enzima requiere, para su actividad, de los iones de calcio, los cuales se unen en una estequiometría 1:1 al sustrato y a la enzima (50). Además, requiere de la presencia de sales biliares. Las sales biliares llevan sustratos insolubles en agua (fosfatidilcolina o etanolamina) en soluciones micelares mixtas, y esto puede ser importante para el enlace enzima- sustrato (51).

La colesterol esterasa pancreática y la esterasa carboxílica pancreática, aparentemente son la misma enzima. Esta cataliza la hidrólisis de ésteres carboxílicos solubles en agua (triacetina, tripropionina, metilbutirato, isoleutina) y ésteres insolubles (de colesterol y lipovitamina A, D y E) dispersos en las micelas de sales biliares. Los sustratos

emulsificados son pobremente hidrolizados (50). Se ha mostrado que se requiere de las sales biliares trihidroxídicas como cofactores para las actividades esterificadoras e hidrolizantes de la colesterol esterasa (55).

Los productos creados por la acción de las distintas enzimas lipolíticas llegan a formar parte de la fase micelar, donde son más fácilmente absorbidos (57).

III. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL.

Determinar el efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de β -caroteno en cuatro muestras de hojas verdes: Bledo (*Amaranthus spp.*), Chipilín (*Crotalaria longirostrata*), Espinaca (*Spinacea oleracea*) y Macuy (*Solanum nigrum*).

B. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Desarrollar un método de simulación, *in-vitro*, de la digestión de carotenos.
2. Cuantificar el contenido de β -caroteno en las muestras de hojas verdes, antes y después de la digestión *in-vitro*.
3. Evaluar el contenido de proteína y fibra dietética en las muestras, como posibles factores influyentes en la digestibilidad de β -caroteno.
4. Evaluar la digestibilidad de β -caroteno, *in-vivo*, de las muestras vegetales.

IV. TRABAJO EXPERIMENTAL

A. Metodología.

El trabajo experimental se desarrolló en tres etapas:

1. Recolección, procesamiento y análisis de las muestras vegetales.

Las cuatro muestras de hojas verdes (bledo, chipilín, espinaca y macuy) se compraron frescas en las primeras horas de la mañana en un mercado local de la ciudad de Guatemala. Se separaron las hojas del resto de la planta, con el fin de evaluar la porción comestible.

Se determinó la humedad en fresco de las muestras de hojas, pesando una muestra de ellas antes y después de secarlas en un horno a 60°C. El porcentaje de humedad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ HUMEDAD}_f = \frac{(\text{PESO FRESCO} - \text{PESO SECO}) * 100}{(\text{PESO FRESCO})}$$

De la misma forma se determinó el porcentaje de humedad residual, pero liofilizando las hojas secas. Para calcularla se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ HUMEDAD}_r = \frac{(\text{PESO SECO} - \text{PESO LIOFILIZADO}) * 100}{(\text{PESO FRESCO})}$$

Se liofilizaron todas las muestras, se molieron y se pasaron por un tamiz 45. Se almacenaron en frascos de vidrio oscuros en atmósfera de nitrógeno a 0°C. Estas muestras liofilizadas y molidas fueron las utilizadas en todo el resto del trabajo experimental, teniendo el cuidado de almacenarlas correctamente.

Se llevó a cabo el análisis del contenido de proteína en las muestras por micro-kjeldahl (7), al igual que de fibra dietética (61).

Se analizó el contenido de β -caroteno en las muestras vegetales (apéndice A). Se extrajeron los carotenos de las muestras (7). Se cuantificaron por el método de AOAC y por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

2. Evaluación de la digestibilidad *in-vivo* de β -caroteno en las muestras vegetales.

a. **Preparación de las dietas.** Se prepararon cinco dietas distintas con, aproximadamente, 1 mg de β -caroteno/100 gr de dieta, que variaban entre sí en la fuente de vitamina A: bledo, chipilín, espinaca, macuy, β -caroteno (control positivo); y una dieta libre de vitamina A (control negativo). La composición de las dietas se muestra en la tabla 4.1. El contenido de la muestra vegetal de las primeras 4 dietas se estableció con base en el análisis de β -caroteno de la muestra por HPLC. Durante el tiempo que duró la evaluación *in-vivo*, las dietas se almacenaron en bolsas plásticas dentro de costales oscuros y a 0°C, para minimizar la degradación de los carotenos. Se llevó a cabo el análisis del contenido de β -caroteno en las dietas ya preparadas (apéndice A) y de proteína por el método de macro- Kjeldahl (7).

Tabla 4.1

Composición de la dieta control por 100 gr de dieta (32)

Ingrediente	Dieta Bledo	Dieta Chipilín	Dieta Espinaca	Dieta Macuy	Dieta Control +	Dieta Control -
Caseína (gr)	14.4	14.4	14.4	14.4	14.4	14.4
Almidón (gr)	74.0	73.6	74.5	74.1	76.6	76.6
Minerales (gr) (63)	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
Aceite Algodón (ml)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Solución vitaminas complejo B (ml) (64)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Muestra vegetal (gr)	2.6	3.0	2.1	2.5	-	-
β -caroteno (mgr)	-	-	-	-	10.0	-

b. Disposición de los animales experimentales. 72 ratas Wistar adultas se ordenaron, de acuerdo a sus pesos para formar 6 grupos de 12 ratas cada uno, lo más homogéneo entre sí, respecto de sus pesos. En cada grupo se incluyeron 6 machos y 6 hembras. Cada rata se colocó en una jaula y éstas se ubicaron en orden de grupos, cuidando de no confundirlas.

c. Período de adaptación. En el período de adaptación se alimentó a las ratas con su dieta correspondiente y se le proporcionó agua *ad libitum*. Este período duró 13 días.

d. Período de evaluación. Antes de iniciar el período de evaluación se pesaron nuevamente las ratas. Se le proporcionaron 150 gr de su dieta correspondiente y agua *ad libitum*. A partir de este momento se empezaron a recolectar las heces. Después de 6 días se pesaron las ratas y el alimento sobrante y se recolectaron las heces.

e. Análisis de heces. Las heces recolectadas se pusieron a secar a 60°C por 20 horas. Se limpiaron y pesaron. Luego se molieron, pasándolas por un tamiz número 40. Mientras se analizaban, se almacenaron en frascos de vidrio con atmósfera de nitrógeno, a 0°C y en la oscuridad. Se extrajeron los carotenos (apéndice A) (33) y la cuantificación de β -caroteno se llevó a cabo por HPLC.

f. Cálculo de la digestibilidad de β -caroteno. Además de analizar el contenido de β -caroteno en las heces, también se cuantificó en las dietas, para poder calcular la digestibilidad de β -caroteno por la siguiente fórmula:

$$\text{DIGESTIBILIDAD} = \frac{(\text{CAROT. INGERIDO} - \text{CAROT. HECES})}{(\text{CAROT. INGERIDO})} * 100$$

3. Proceso de digestión in-vitro de las muestras vegetales.

Con base en algunos procedimientos que simulan el proceso digestivo (61, 62), y al conocimiento de la acción de las enzimas digestivas, se desarrolló un método preliminar para evaluar el efecto de la digestión en el contenido de β - caroteno de las muestras vegetales. Este método inicial incluía los siguientes pasos:

1. Pesar 1 gr de muestra vegetal seca
2. Agregar 25 ml de buffer de fosfato pH 6.0
3. Agregar 100 μ l de Termamyl
4. Mezclar e incubar por 1 hra a 37°C con agitación
5. Llevar a pH 1.5 con solución de HCl
6. Agregar 500 μ l de solución de Pepsina (10% w/v)
7. Mezclar en incubar por 1 hra a 37°C con agitación
8. Llevar a pH 7.5 con solución de NaOH
9. Agregar 500 μ l de solución de Proteasa (1% w/v)
10. Mezclar en incubar por 1 hra a 37°C con agitación
11. Llevar a pH 8.0 con solución de NaOH
12. Agregar 5 ml de bilis (10% w/v)
13. Agregar 5 μ l de Fosfolipasa A₂
14. Mezclar en incubar por media hora a 37°C con agitación
15. Agregar 10 μ l de solución de Colipasa (0.5 mg/ml)
16. Mezclar en incubar por 10 min a 37°C con agitación
17. Agregar 10 μ l de solución de Lipasa (50 mg/L)
18. Agregar 1 ml de solución de Colesterol Esterasa (25 mg/10 ml)
19. Mezclar en incubar por 1 hra a 37°C con agitación.

Utilizando sólo una muestra (espinaca), se llevaron a cabo varias pruebas de este método, para determinar qué enzimas afectaban realmente la digestión de β -caroteno. Para ésto fue necesario analizar el contenido de β - caroteno en el producto ya digerido, ya sea como un todo o el líquido y el sólido por separado. La extracción de carotenos del sólido se llevó a cabo de forma similar a la del material seco (apéndice A) y el líquido por extracción líquido-líquido con éter de petróleo. También se hicieron diferentes pruebas de extracción, para asegurarse que era el proceso de digestión el que afectaba el contenido de β -caroteno en la muestra y no la extracción. Finalmente, la cuantificación de β -caroteno en todas las pruebas se llevó a cabo por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Después de varias pruebas (ver resultados y discusión), se optó en utilizar el proceso de digestión *in-vitro* incluido en el análisis de fibra dietética de Asp, et al. (61), para evaluar el efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de β -caroteno en muestras vegetales. Asimismo, debido a los problemas afrontados en el análisis de β -caroteno en el líquido, se decidió liofilizar el producto de la digestión y analizar el contenido de β -caroteno en éste, con el método de extracción de AOAC (7) y cuantificación por HPLC.

El método final utilizado para determinar el efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de β -caroteno en muestras vegetales, es el siguiente:

1. Liofilizar la muestra vegetal
2. Extraer y analizar el contenido de β -caroteno por HPLC (apéndice A)
3. Pesar 1 gr de muestra
4. Agregarle 25 ml de buffer de fosfato pH 6.0
5. Agregar 100 μ l de Termamyl
6. Mezclar e incubar por 1 hra a 37°C con agitación

7. Llevar a pH 1.5 con solución de HCl
8. Agregar 500 μ l de solución de Pepsina (10% w/v)
9. Mezclar e incubar por 1 hora a 37°C con agitación
10. Llevar a pH 6.8 con solución de NaOH
11. Agregar 1 ml de solución de Pancreatina (10% w/v)
12. Mezclar e incubar por 1 hora a 37°C con agitación
13. Verter el producto de la digestión en un beaker de Nalgene
14. Congelar y liofilizar
15. Extraer y cuantificar por HPLC el contenido de β - caroteno en el producto liofilizado (apéndice A)

Este proceso completo se llevó a cabo para las cuatro muestras vegetales (bledo, chipilín, espinaca y macuy), además de un proceso sin enzimas (sólo cambios de pH y temperatura) y otro sólo agregándole agua a la muestra y liofilizándola. Cada proceso en triplicado. Esto se hizo para determinar si era el proceso completo el que degradaba el β -caroteno, o sólo el cambio de pH y la temperatura.

B. Materiales

1. Muestras.

- Hojas de Bledo (*Amaranthus spp.*)
- Hojas de Chipilín (*Crotalaria longirostrata*)
- Hojas de Espinaca (*Spinacea oleracea*)
- Hojas de Macuy (*Solanum nigrum*)

2. Animales experimentales.

- 36 ratas Wistar machos adultos
- 36 ratas Wistar hembras adultos

3. Equipo.

- Balanza analítica OHAUS GA200
- Liofilizadora Virtis 10-MR-TR
- Analizador de Kjeldahl, Kjeltec Auto 1030 Analyzar, Tecator
- Baño térmico con agitación 1020 Tecator
- Centrífuga 16172H, International Equipment, Co.
- Espectrofotómetro UV/visible Lambda 5, Perkin-Elmer
- Cromatógrafo líquido de alta presión Varian Vista 5500, detector UV-Visible con longitud de onda variable.
- Columna Nova Pak C-18 (Waters)
- Graficador 024, Perkin-Elmer

4. Reactivos específicos.

- β -caroteno para preparación de dietas (seco 10% soluble en agua, ROCHE)
- β -caroteno para estándar (SIGMA C-0126)
- Termamyl 120L (NOVO A/S AAN 4306)
- Pepsina 200 FIP U/g (MERCK 7190)
- Pancreatina (FLUKA AG 76190)
- Proteasa (SIGMA P-4630)
- Colipasa (SIGMA C-3028)
- Lipasa pancreática (SIGMA L-0382)

- Fosfolipasa A₂ (SIGMA P-6534)
- Colesterol Esterasa (SIGMA C-9530)
- Bilis deshidratada (OxGall)
- Acetonitrilo grado HPLC
- Metanol grado HPLC
- Tetrahidrofurano grado HPLC
- Filtros 0.5 μm (Millipore FHLF 01300)
- Prefiltros 10 μm (Varian 00-996690-05)
- Filtros de solvente 0.5 μm tipo FH (Millipore)

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A. Análisis de las muestras vegetales

Los resultados de los análisis en las muestras vegetales de humedad en fresco, humedad residual, contenido de proteína, fibra dietética y β -caroteno por el método de AOAC y por HPLC se muestran en la tabla 5.1. En el apéndice B se muestra un cromatograma de una curva estándar (cromatograma 1) y del análisis de una muestra (cromatograma 2), así como un ejemplo de los cálculos de concentración de β -caroteno.

Se llevaron a cabo los análisis antes mencionados para determinar si influían en la digestibilidad de β -caroteno. La tabla 5.1 muestra que no existe diferencia significativa entre las muestras, respecto a la humedad en fresco y residual y muy poca diferencia en contenido de proteína y fibra dietética. Por otro lado, sí existe diferencia significativa en el contenido de β -caroteno.

En lo que respecta al contenido de β -caroteno (tabla 5.1), la determinación por el método de AOAC es mayor que la determinación por HPLC. Esto se debe a que el método de AOAC expresa el contenido de carotenos totales como β -caroteno, sobreestimando el contenido real de este caroteno (29.41-44.24%). En cambio, el método por HPLC separa los carotenos en sus diferentes tipos, pudiéndose así cuantificar solamente el tipo de caroteno de interés. Por esta razón y por la facilidad que se tenía de utilizar el HPLC, todas las demás muestras se analizaron con el HPLC.

Tabla 5.1

Análisis de las muestras vegetales

Análisis	Muestra vegetal			
	Bledo	Chipilín	Espinaca	Macuy
Humedad Fresco (%)	87.0 ± 0.01 ⁴	85 ± 6	90 ± 10	86 ± 8
Humedad Residual (%) ²	7 ± 2	5.8 ± 0.5	7 ± 1	7 ± 3
Proteína (mg/g)	269 ± 10 ³	302 ± 16 ³	339 ± 14 ²	380 ± 25 ²
Fibra Dietética B.S. (%) ¹	36.25	35.48	34.22	34.79
β-caroteno (AOAC) (mg/g) ³	0.379 ± 0.008	0.33 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.401 ± 0.006
β-caroteno (HPLC) (mg/g) ³	0.266 ± 0.001	0.255 ± 0.002	0.33 ± 0.01	0.278 ± 0.008
% sobreestimación β-caroteno AOAC/HPLC	42.48	29.41	42.42	44.24

¹ Análisis sin réplica² Análisis con dos réplicas³ Análisis con tres réplicas⁴ Intervalos de confianza al 95%

B. Evaluación de la digestibilidad *in-vivo* de β -caroteno en las muestras vegetales

Como un paso previo a la evaluación de la digestibilidad, se analizó el contenido de proteína y de β -caroteno en las 6 diferentes dietas (apéndice B, cromatograma 3), para asegurarse que todas poseían, aproximadamente, el mismo contenido proteínico y de β -caroteno (excepto el control negativo). Los resultados se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2

Análisis de las dietas

Dieta	Proteína ¹ (%)	β -caroteno ² ($\mu\text{g/g}$)
Bledo	13 ± 2^3	8 ± 2
Chipilín	14 ± 3	8.5 ± 0.3
Espinaca	14 ± 5	7.59 ± 0.02
Macuy	14 ± 2	8.9 ± 0.3
Control positivo	13 ± 4	6.2 ± 0.9
Control negativo	12 ± 6	0

- 1 Análisis con dos réplicas
- 2 Análisis con tres réplicas con excepción de Espinaca.
- 3 Intervalo de confianza al 95%

Para la evaluación de la digestibilidad *in-vivo* de β -caroteno, se llevaron a cabo los períodos de adaptación y evaluación sin problemas, pero al analizar el contenido de β -caroteno en las heces, ninguna poseía una cantidad detectable de éste (apéndice B, cromatograma 4). De esta manera, se obtiene un 100% de digestibilidad de β -caroteno para las 5 dietas que lo contenían, lo que indica que todo el β -caroteno ingerido por las ratas fue absorbido. Esto sugiere que si hubo alguna degradación en el proceso de digestión de la rata, el β -caroteno degradado, se considera también como absorbido. Así, fue necesario evaluar el efecto de la digestión en el contenido de β -caroteno.

C. Proceso de digestión *in-vitro* de las muestras vegetales

Para evaluar el efecto de la digestión en el contenido de β -caroteno, se diseñó un método inicial de digestión *in-vitro*. En este método no se reprodujo exactamente el proceso digestivo, sino que se trató de montarlo de tal forma que involucrara los elementos principales de la digestión: enzimas digestivas para carbohidratos (Termamyl), proteínas (pepsina y proteasa) y lípidos (colipasa, lipasa, fosfolipasa A₂ y colesterol esterasa); cambios de pH; temperatura adecuada (37°C) y agitación constante. Para optimizar este método *in-vitro* fue necesario hacer 4 pruebas distintas, variando la digestión y/o la extracción de β -caroteno, para determinar el método final adecuado de evaluación del efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de β -caroteno de las muestras. En estas pruebas se trabajó sólo con espinaca, pues es la que presentó mayor cantidad de β -caroteno.

1. Prueba 1.

Para evaluar si todas las enzimas utilizadas eran indispensables para determinar el efecto de la digestión sobre el contenido de β -caroteno, se probaron 5 tratamientos:

1. Utilizando sólo Termamyl (ver página 27, hasta paso 4)
2. Termamyl y pepsina (hasta paso 8)
3. Termamyl, pepsina y proteasa (hasta paso 10)
4. Termamyl, pepsina, proteasa y enzimas lipolíticas (todo el proceso del método inicial)
5. Todo el proceso del método inicial, pero sin adicionar ninguna enzima.

Después de la digestión, se analizó el contenido de β -caroteno en la parte líquida del producto de la digestión o digerido (apéndice B, cromatograma 5), pues, supuestamente, en éste se encuentran los carotenos listos para ser absorbidos. Para esto, se centrifugó el digerido a 5,000 rpm por 15 min. Se separó el sobrenadante, del cual se extrajeron los carotenos por separación líquido-líquido utilizando éter de petróleo. El extracto etéreo se llevó a sequedad y se diluyó a 10 ml con hexano, para luego cuantificar β -caroteno por HPLC.

De esta prueba no se obtuvieron resultados significativos del contenido de β -caroteno en los sobrenadantes. Esto podría implicar: **a.** que no fue posible solubilizar el β -caroteno en la fase acuosa, **b.** si se solubilizó, pero al centrifugar quedó en el sedimento o **c.** se degradó todo el β -caroteno durante las digestiones. **d.** Otra posibilidad es que no se hubieran liberado los carotenos del tejido vegetal, pero, por lo menos en el tratamiento 4 donde están presentes todas las enzimas, tuvieron que haberse liberado.

2. Prueba 2.

Se llevaron a cabo 5 tratamientos distintos (ver tabla 5.3), sin réplica, analizando sobrenadante y sedimento.

Tabla 5.3

Tratamientos y resultados de la prueba 2

Tratamiento	β -caroteno en sedimento (mg/g)
1. Termamyl	0.070
2. Termamyl y pepsina	0.200
3. Termamyl, pepsina y proteasa	0.199
4. Todo el proceso completo	- ¹
5. Todo el proceso sin enzimas	0.122

¹ Se perdió la muestra durante la centrifugación

Al analizar el contenido de β -caroteno en el sobrenadante, no se detectaron cantidades significantes (mismas implicaciones de la prueba 1).

En la cuantificación de β -caroteno en el sedimento, (apéndice B, cromatograma 6 y tabla 5.3) lo único que se puede inferir de estos resultados, al comparar los tratamientos 2 y 3, es que la proteasa no afecta el contenido de β -caroteno. Esto puede deberse a que la pepsina por si sola degrada las proteínas necesarias para liberar los carotenos. Por la pérdida de la muestra del tratamiento 4 no se sabe si las enzimas lipolíticas afectan o no el contenido de β -caroteno. La comparación de los tratamientos 1 y 5 que tienen los valores más bajos de β -caroteno, sugiere que degradar carbohidratos (tratamiento 1) y cambiar pH y temperatura a 37°C (tratamiento 5) no es suficientes para liberar los carotenos del tejido vegetal; se necesitan enzimas proteolíticas y/o, tal vez, enzimas lipolíticas.

3. Prueba 3.

Se llevaron a cabo los mismos 5 tratamientos de la prueba 2, más un blanco (sin proceso, sólo se le agregó agua para tener las mismas condiciones de extracción). Se analizó el contenido de β -caroteno sólo en el sedimento (apéndice B, cromatograma 7). Los resultados se muestran en la tabla 5.4.

Tabla 5.4

Tratamientos y resultados de la prueba 3

Tratamiento	β -caroteno en sedimento (mg/g)
1. Termamyl	0.05 ± 0.02^1
2. Termamyl y pepsina	0.09 ± 0.06
3. Termamyl, pepsina y proteasa	0.09 ± 0.03
4. Todo el proceso completo	0.11 ± 0.01
5. Todo el proceso sin enzimas	0.04 ± 0
6. Blanco (sólo agua)	0.2 ± 0.1

¹ Intervalo de confianza al 95%.

En estos resultados se observa que no existe diferencia significativa entre los tratamientos 2, 3 y 4. Esto corrobora que la proteasa no es indispensable y que se obtiene menor cantidad de β -caroteno en el tratamiento 1 (sólo degradación de carbohidratos), que en el tratamiento 2 (degradación de proteínas). Además sugiere que las enzimas lipolíticas tampoco afectan significativamente el contenido de β -caroteno en la muestra.

Aunque se obtienen intervalos de confianza muy grandes, los resultados parecen indicar que la muestra sin proceso contiene más β -caroteno que las que sufrieron algún tipo de digestión, pudiendo significar que las enzimas, pH y/o temperatura degradan el β -caroteno durante la digestión *in-vitro*. Los intervalos de confianza grandes son inherentes al proceso de extracción, pues se pierde muestra al transferir el sedimento al matraz aforado, para extraer los carotenos por el método de AOAC y luego cuantificarlos por HPLC (apéndice A).

4. Prueba 4.

Como no se observaron diferencias significativas con las enzimas lipolíticas, el proceso digestivo *in-vitro* llevado a cabo en esta prueba se limitó a la acción de la proteasa. Se ensayaron 4 tratamientos, el primero con 4 réplicas para evaluar la reproducibilidad del método de extracción, el segundo con 2 y los otros sin réplicas (ver tabla 5.5). Como se deseaba mejorar la extracción de los carotenos de la fase líquida del producto de digestión, se probó utilizar KOH metanólico (40%) en lugar de bilis para saponificar los carotenos y ver si así mejoraba la solubilización de éstos en el medio acuoso.

Respecto de la extracción, hubo variación en las réplicas, analizando en algunos casos el contenido de β -caroteno sólo en el sedimento, en el sedimento y el sobrenadante por separado y en el sedimento y sobrenadante juntos (completo) (apéndice B, cromatograma 8). Los resultados se muestran en la tabla 5.5.

La tabla 5.5 muestra que al usar KOH metanólico al 40% en lugar de bilis, no mejora significativamente la solubilización del β -caroteno en la fase acuosa. También se puede observar que no es congruente que la extracción completa del digerido presente

una cantidad menor a la del análisis del sedimento. Esto se debe a que el método de extracción utilizado es para material seco, no líquido o húmedo, el agua, consecuentemente, afecta la extracción de carotenos con solventes orgánicos.

En estos resultados puede observarse, para β -caroteno puro, que el proceso digestivo utilizado sí degrada los carotenos. En el caso de la espinaca, esta diferencia entre los dos tratamientos es muy pequeña.

Tabla 5.5

Tratamientos y resultados de la prueba 4

Tratamiento	β -caroteno (mg/g)		
	sedimento	sobrenadante	completo
1. Espinaca con proceso	0.057	0.007	0.03
2. Espinaca sin proceso	0.085	0.008	0.05
3. β -caroteno ¹ con proceso	-	0.014	-
4. β -caroteno ¹ sin proceso	-	0.082	-

¹ 2 ml de solución de β -caroteno 1.7 mg/ml

5. Método final para la evaluación del efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de β -caroteno en las muestras vegetales.

Después de las 4 pruebas anteriores, se elaboró la metodología final, tomando en cuenta los siguientes aspectos:

a. No todas las enzimas son indispensables para esta evaluación. Aún así, se emplearon enzimas para los componentes principales: carbohidratos (Termamyl), proteínas (pepsina y pancreatina) y lípidos (pancreatina).

b. Debido a la dificultad del análisis del contenido de β -caroteno en la fase acuosa y sedimento húmedo del digerido, se optó por liofilizar el digerido y luego extraer los carotenos por el método de AOAC para material seco y luego cuantificarlo por HPLC (apéndice A).

Para evaluar el efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de β -caroteno, se llevaron a cabo 3 tratamientos para cada una de las 4 muestras, en triplicado. El primer tratamiento era el proceso completo del método final, el segundo era el proceso pero sin enzimas y el tercero sólo con agua (blanco) y liofilizando. La liofilización de las muestras de los tres tratamientos permite descartar el efecto de variación por diferencia en la extracción. Los resultados se muestran en la tabla 5.6 (apéndice B, cromatograma 9).

Para visualizar mejor los resultados, la tabla 5.7 muestra las medias de éstos con su límite de confianza al 95%.

Tabla 5.6

Tratamientos y resultados para la determinación del efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de β -caroteno en las muestras vegetales (β -caroteno en mg/g)

Tratamiento	Muestra vegetal			
	Bledo	Chipilín	Espinaca	Macuy
1. Proceso completo	0.1343	0.1870	0.0876	0.2628
	0.1259	0.1811	0.0993	0.2674
	0.1232	0.1962	0.1024	0.2732
2. Proceso sin enzimas	0.1245	0.2045	0.1038	0.2838
	0.1267	0.1954	0.0974	0.2672
	0.1166	0.2095	0.0918	0.2698
3. Blanco	0.1978	0.2117	0.2068	0.2852
	0.2242	0.2363	0.2440	0.2895
	0.2031	0.2703	0.1873	0.3158

Tabla 5.7

Medias de los resultados para la determinación del efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de β -caroteno en las muestras vegetales (β -caroteno en mg/g)

Tratamiento	Muestra vegetal			
	Bledo	Chipilín	Espinaca	Macuy
1. Proceso completo	0.13 $\pm 0.01^1$	0.19 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.27 ± 0.01
2. Proceso sin enzimas	0.12 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.27 ± 0.02
3. Blanco	0.21 ± 0.04	0.24 ± 0.07	0.21 ± 0.07	0.30 ± 0.04

¹ Intervalo de confianza al 95%.

Se procesó β -caroteno puro en la misma forma que las muestras, pero no fue posible recuperarlo después de liofilizar el digerido. Esto presenta un problema práctico al utilizar β -caroteno puro como control. Podría usarse, pero adicionándolo en una muestra vegetal de efecto de digestión de β -caroteno conocido, así, por diferencia, se obtendría el efecto de la digestión sobre el β -caroteno puro.

Para determinar si existe diferencia entre los tres tratamientos, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANDEVA), utilizando el paquete estadístico para computadora SAS (apéndice C). En este ANDEVA la hipótesis nula fue: Los tratamientos son iguales.

Los resultados del ANDEVA (apéndice C) indican que sí existe diferencia entre tratamientos. Adicionalmente, la prueba de Tukey muestra que no hay diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2, mientras que ambos difieren del tratamiento 3.

Con estos resultados estadísticos y con los datos de la tabla 5.7 se observa que el proceso de digestión *in-vitro* sí degrada los carotenos de la muestra vegetal, pues hay mayor cantidad de β -caroteno en las muestras con el tratamiento 3 que con las de tratamientos 1 y 2. El no haber encontrado una diferencia significativa entre los tratamientos 1 y 2 indican que no es el proceso enzimático por si solo el que degrada el β -caroteno, sino que es el cambio de pH y/o la temperatura. Lamentablemente, en este trabajo se evaluó el efecto de pH y temperatura juntos, por lo que no se puede saber si la temperatura por si sola afecta la degradación del β -caroteno.

Estos resultados indican que el método *in-vivo* para evaluar la digestibilidad de carotenos, sobreestiman los resultados. En ese método los carotenos no excretados, incluyendo los degradados, se consideran como absorbidos. Como sugerencia, se podría utilizar el método de digestión *in-vitro* como complemento del método de evaluación de la digestibilidad *in-vivo*, ya que el primero puede dar una idea del grado de degradación de los carotenos en la muestra a analizar y así podría obtenerse un factor de corrección para el método *in-vivo*. Para lograr esto, se debe hacer un estudio más profundo de la metodología empleada en este trabajo, además podría complementarse con una evaluación de biodisponibilidad de carotenos.

Este trabajo también podría usarse como base para el desarrollo y estandarización de una metodología *in-vitro* para evaluar digestibilidad de carotenos o β -caroteno. Para eso, debe encontrarse una forma efectiva para lograr solubilizar y extraer los carotenos de la fase acuosa del digerido.

VI. CONCLUSIONES

- A. El método de determinación de β -caroteno de la AOAC, sobreestima el contenido real de éste.

- B. La determinación *in-vivo* sobreestima la digestibilidad de β -caroteno, puesto que la cantidad ingerida de éste es menor a la absorbida, debido a la degradación de este caroteno durante la digestión.

- C. La degradación de β -caroteno ocurrida durante la digestión *in-vitro* no es causada por acción enzimática, sino por efecto de cambios en el pH y/o temperatura.

VII. RECOMENDACIONES

- A. Si se va a cuantificar β -caroteno en una muestra, es recomendable hacerlo por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), pues el método de cromatografía abierta de la AOAC sobreestima el contenido de este caroteno.
- B. Para el estudio del efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de β -caroteno de muestras, es necesario evaluar individualmente el efecto de pH y temperatura, y la interacción de ambos factores.
- C. El método *in-vivo* para la evaluación de la digestibilidad de carotenos, aparentemente sobreestima los valores de esta.
- D. Es de vital importancia estandarizar bien este método para la determinación del efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de β -caroteno de muestras vegetales, con ayuda de métodos de bio-disponibilidad de carotenos, y así pueda servir como complemento del método *in-vivo* de evaluación de la digestibilidad de β -caroteno.
- E. Desarrollar y estandarizar una metodología para evaluar la digestibilidad *in-vitro* de β -caroteno o carotenos.

VII. LITERATURA CITADA

1. Arroyave, G., L. Mejía & J.R. Aguilar. 1981. The effect of vitamin A fortification of sugar on the serum vitamin A levels of pre-school Guatemalan children: a longitudinal evaluation. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 41-9.
2. Underwood, B.A. 1984. Vitamin A in animal and human nutrition. In: *The Retinoids*. Vol. 1. Academic Press, New York.
3. Seminario sobre "Estrategias para controlar la hipovitaminosis A en Guatemala: El papel de los carotenos alimenticios". 1988. Centro de Estudios en Sensoriopatías, Senectud e Impedimentos y Alteraciones Metabólicas (CeSSIAM), Guatemala.
4. Speek, A.J., C.R. Temalilwa, & J. Schrinjver. 1976. Determination of β -Carotene content and vitamin A activity of vegetables by High-Performance Liquid Chromatography and Spectrophotometry. *Food Chemistry* 19: 65-74.
5. FAO. 1966. Programa de educación en nutrición. Informe a los gobiernos de América Central. Programa ampliado de Asistenica Técnica. FAO No. 2120.
6. Castellanos, E.J. 1987. Biodisponibilidad y digestibilidad de carotenoides en maíz común y maíz suplementado con lisina y triptófano en ratas. Tesis Universidad del Valle de Guatemala.
7. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 1984. 14a. ed. AOAC, Inc., Virginia.

8. Arroyave, G., et.al. 1982. Biochemical methodology for the assessment of vitamin A status. IVACG.
9. Aurbach, G.D. (ed). 1986. Vitamins and hormones. Advances in research and applications. Vol 43. Academic Press, Inc., London. 322 pp.
10. Goodwin, T.W. 1980. The biochemistry of the carotenoids. 2a. ed. Chapman & Hall, London. 377 pp.
11. Bonner, J. 1950. Plant biochemistry. Academic Press, Inc., New York. 537 pp.
12. Goldblith, S.A. 1967. Introducción a la bioquímica de los alimentos. Ediciones Omega, S.A., Barcelona. 355 pp.
13. Krogmann, D.W. 1973. The biochemistry of green plants. Prentice-Hall, Inc., New Jersey. 239 pp.
14. Karrer, P. & E. Jucker. 1950. Carotenoids. Elsevier Pub. Company, Inc., New York. 384 pp.
15. Baunfiend, J.C. 1983. Vitamina A: Technology and applications. **Wld. Rev. Nutr. Diet.** 41: 110-199.
16. Machlin, L.J. 1983. Handbook of vitamins. Nutritional, biochemical, and clinical aspects. Marcel Dekker, Inc., New York.

17. McGillivray, W.A. 1960. The role of carotene and Vitamin A in animal feeding. **Wld. Rev. Nutr. Diet.** 2: 131-155.
18. Srikantia, S.G. 1975. Human Vitamin A deficiency. **Wld. Rev. Nutr. Diet.** 20: 184-230.
19. Glick, D. (ed). 1957. Methods of biochemical analysis. Vol. 4. Interscience Publishers, Inc., New York. 362 pp.
20. King, R.D. (ed). 1978. Development in food analysis techniques-1. Applied Science Publishers Ltd., London. 323 pp.
21. Gebhart, S.E., E.R. Elkins, & J. Humphrey. 1977. Comparison of two methods for determining the vitamin A value of Clingston Peaches. **J. Agric. Food Chem.** 25(3): 629-632.
22. Premachandra, B.R. 1985. A simple TLC method for the determination of pro-vitamin A content of fruits and vegetables. **Internat. J. Vit. Nutr. Res.** 55: 139-147.
23. Zakaria, M., K. Simpson, P. Brown, & A. Krstulovic. 1979. Use of reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis for the determination of provitamina A carotenes in tomatoes. **J. Chromat.** 176: 109-117.
24. Bushway, R.J. 1985. Separation of carotenoids in fruits and vegetables by high performance liquid chromatography. **J. Liquid. Chromat.** 8(8): 1527-1547.

25. Bushway, R.J. & A.M. Wilson. 1982. Determination of α - and β -carotene in fruit and vegetables by high performance liquid chromatography. **Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.** 15(3): 165-169.
26. Bureau, J.L. & R.J. Bushway. 1986. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. **J. Food Sci.** 51(1): 128-130.
27. Singh, U. & J.H. Bradbury. 1988. HPLC determination of vitamin A and vitamin D-2 in South Pacific Root Crops. **J. Sci. Food Agric.** 1: 87-94.
28. Puglisi, C.V. & A.F. De Silva. 1976. Determination of the carotenoid phytoene in blood by high-pressure liquid chromatography. **J. Chromat.** 120: 457-464.
29. Molina, A. 1987. Carotenoides del aceite y subproductos de palma africana como fuente de pigmentación para yema de huevo. Tesis Universidad del Valle de Guatemala.
30. Ames, S.R. & P.L. Harris. 1956. Slope-ratio liver-storage bioassay for vitamin A. **Analyt. Chem.** 28(5): 874-878.
31. Zelada, E. 1988. Biodisponibilidad de carotenos en plantas autóctonas de Guatemala. Tesis Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
32. Wolzak, A. & R. Bressani. 1986. Efecto de la calidad y cantidad de proteína dietaria en la tasa de depleción de vitamina A, y disponibilidad biológica de precursores de vitamina A. **Arch. Latinoa. Nutr.** 36(3): 415-431.

33. Nozenko, A. 1963. The methods for determination of carotene in the feces. **Latvijas PSR Zinatnu Akad. Vestis.** 6: 105-108. Abstract: 1964. **Chem. Abstr.** 60: 3258h-3259a.
34. Hsu, H.W., D.L. Vavak, L.D. Satterlee, & G.A. Miller. 1977. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. **J. Food Sci.** 42(5): 1269-1273.
35. Akeson, W.R. & M.A. Stahmann. 1964. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **J. Nutr.** 83: 257-261.
36. Saunders, R.M., M.A. Connor, A.N. Booth, E.M. Bickoff, & G.O. Kohler. 1973. Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by *in vivo* and *in vitro* methods. **J. Nutr.** 103: 530-535.
37. Wolzak, A., R. Bressani, & R. Gómez. 1981. A comparison of *in vivo* and *in vitro* estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable proteins. **Qual. Plant Food Hum. Nutr.** 31: 31-43.
38. Macdonald, I. 1967. Physiological role of dietary carbohydrates. **Wld. Rev. Nutr. Diet.** 8: 144-183.
39. Miller, D.D., Schricker, B.R., R.R. Rasmussen, & D. Van Campen. 1981. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. **Am. J. Clin. Nutr.** 34: 2248-256.
40. Sakamoto, K., T. Asano, S. Furuya, & S. Takahashi. 1980. Estimation of *in vivo* digestibility with the laying hen by an *in vitro* method using the intestinal fluid of the pig. **Br. J. Nutr.** 43: 389-391.

41. Scricker, B.R., D.D. Miller, R.R. Rasmussen, & D. Van Campen. 1981. A comparison of *in vivo* and *in vitro* methods for determining availability of iron from meals. **Am. J. Clin. Nutr.** 34: 2257-2263.
42. Tortora, G.J. & N.P. Anagnostakos. 1987. Principios de anatomía y fisiología. Harla, México. 1034 pp.
43. Sentmanat, R. 1959. Digestión y absorción. 2a. ed. Publicaciones Cultural, S.A., La Habana. 226 pp.
44. Newcomer, A.D. 1973. Surface digestion of carbohydrates. **Mayo Clinic. Proc.** 48: 620-623.
45. Gordon, M.S. 1972. Animal physiology: Principles and adaptations. 2nd. ed. Macmillan Publishing Co., Inc., New York. 592 pp.
46. Worthington Manual. 1967. Worthington Biochemical Corporation, New Jersey.
47. Tso, P. 1985. Gastrointestinal digestion and absorption of lipid. **Adv. Lipid Res.** 21: 143-186.
48. Nelson, J.H., R.G. Jensen, & R.E. Pitas. 1977. Pregastric esterase and other oral lipases - a review. **J. Dairy Sci.** 60: 327-362.
49. Wills, E.D. 1965. Lipases. **Adv. Lipid Res.** 3: 197-240.
50. Carey, M.C., D.M. Small, & C.M. Bliss. 1983. Lipid digestion and absorption. **Ann. Rev. Physiol.** 45: 651-677.

51. Borgstrom, B. Intestinal function of bile. In: Hore, P. & G. Semanza (ed). 1970. Digestion and Intestinal absorption. Vol. 4. University Park Press, Baltimore. 133 pp.
52. Carey, M.C. & D.M. Small. 1972. Micelle formation by bile salts: physical-chemical and thermodynamic considerations. **Arch. Intern. Med.** 130: 506-527.
53. Hofmann, A.F. & B. Borgstrom. 1962. Physico-chemical state of lipids in intestinal content during their digestion and absorption. **Fed. Proc.** 21: 43-50.
54. Carey, M.C. & D.M. Small. 1970. The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile. **Am. J. Med.** 49: 590-608.
55. Vahouny, G.V., S. Weersing, & C.R. Treadwell. 1964. Micellar-solubilized substrates and cholesterol esterase activity *in vitro*. **Arch. Biochem. Biophys.** 107: 7-15.
56. Mansbach, C.M., R.S. Cohen, & P.B. Leff. 1975. Isolation and properties of the mixed lipid micelles present in intestinal content during fat digestion in man. **J. Clin. Invest.** 56: 781-791.
57. Hoffman, N.E. 1970. The relationship between uptake *in vitro* of oleic acid and micellar solubilization. **Biochem. Biophys. Acta.** 196: 193-203.
58. Johnston, J.M. & B. Borgstrom. 1964. The intestinal absorption and metabolism of micellar solutions of lipids. **Biophys, Biochim. Acta.** 84: 412-423.

59. Blackberg, L., O. Hernell, & T. Olivecrona. 1981. Hydrolysis of human milk fat globules by pancreatic lipase: role of colipase, phospholipase A-2, and bile salts. **J. Clin. Invest.** 67: 1748-1752.
60. Patton, J.S. & M.C. Carey. 1979. Watching fat digestion. **Science.** 204: 145-149.
61. Asp, N. G. Johansson, H. Hallmer, & M. Siljestrom. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. 1983. **J. Agric. Food Chem.** 31: 476-482.
62. Prosky, L., N. Asp, I. Furda, J.W. DeVries, T.F. Schweiser, & B.F. Harland. 1985. Determination of total dietary fiber on food products: Collaboratory study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 68(4): 677-679.
63. Hegsted, D.M., R.C. Mills, C.A. Elvehjem, & E.B. Hart. 1941. Choline in the nutrition of chicks. **J. Biol. Chem.** 138: 459-466.
64. Manna, L. & S.M. Hauge. 1953. A possible relationship of vitamin B-13 to Ortoric Acid. **J. Biol. Chem.** 202: 91-96.

APENDICE A

Métodos de análisis utilizados en la presente investigación

A.1 Análisis de carotenos en material seco.

Extracción de Carotenos. (7)

Se muele la muestra hasta pasar por un tamiz No. 40. Se pesan 2 gr (muestra vegetal) o 4 gr (dieta mixta) y se colocan en un matraz aforado de 100 ml. Se pipetea 30 ml del extractante (hexano-acetona-etanol absoluto-tolueno (10+7+6+7))y se agita por 1 min. Se pipetea 2 ml (muestra vegetal) o 4 ml (dieta mixta) de KOH metanólico al 40% dentro del balón, se agita por 1 min y se coloca en un baño a 56°C por 20 min. Se adhiere al balón un condensador para evitar pérdida del solvente. Se saca el balón del baño y se deja enfriar por 1 hora en la oscuridad. Se pipetea 30 ml de hexano dentro del balón, se agita por 1 min y se lleva a volumen con solución acuosa de sulfato de sodio al 10%. Se agita vigorosamente y se deja en la oscuridad por 1 hora, antes de la cromatografía. Puede llevarse a cabo la cromatografía abierta o la cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Cromatografía abierta. (7)

La columna cromatográfica debe ser un tubo de vidrio de 1 cm diámetro y 30 cm de largo, con llave para controlar el flujo (una bureta). En el fondo de la columna se coloca lana de vidrio y encima se deja caer el material adsorbente (mezcla de óxido de magnesio activado y Hyflo Super-Cel (1+1)), hasta formar una capa de 12 cm. Se aplica vacío a la columna para compactar el material y se apelmasa con una varilla de vidrio. Se coloca encima una capa de 2 cm de sulfato de sodio anhidro.

Se transfieren 5 - 15 ml del extracto (dependiendo de la concentración de carotenos de la muestra) a la columna y se aplica vacío para forzar su paso. Se eluye la franja de carotenos con hexano-acetona 9+1. El eluyente se recoge en un balón aforado de 10 - 50 ml (dependiendo de la concentración de la muestra) y se lleva a volumen con la solución eluyente. Se lleva a cabo la determinación inmediatamente.

Determinación. (7)

Se lee la absorbancia de la solución a 436 nm. Se obtiene el factor de corrección del aparato leyendo una solución 0.04 mM de sudán 1 a la misma longitud de onda.

Cálculos. (7)

La solución de sudán deberá leer 0.460 a 436 nm. El factor de corrección f se obtiene dividiendo la lectura esperada por la lectura obtenida. La concentración de carotenos totales C , expresada en mg de β -carotenos/g de muestra, se obtiene de la fórmula:

$$C = (A * f * 50 * V_f) / (E * b * g * V_i)$$

donde A es la absorbancia de la muestra a 436 nm, f es el factor de corrección, V_f es el volumen final (ml) de elución, E es la absortividad (196 para β -caroteno), b es el largo de celda en cm (1 cm), g es el peso de la muestra y V_i es el volumen (ml) del extracto transferido a la columna.

Cromatografía líquida de alta presión. (29)

Se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución modelo Vista 5500, marca Varian, con detector espectrofotométrico a 470 nm y columna Nova Pak C-18 (5mm). Como fase líquida se empleó acetonitrilo:metanol:tetrahidrofurano (58:35:7).

Se prepararon diferentes diluciones del estándar de β -caroteno, para correr una curva de calibración donde la concentración de la muestra quedara incluida. Para determinar la concentración exacta de los estándares, se leyeron en un espectrofotómetro lambda 5 a 450 nm, donde la concentración C (mg/L) se determinó con la fórmula:

$$C = A / (E * b)$$

donde A es la absorbancia a 450 nm, E es la absortividad al 1% (2563 ml/cm para β -caroteno SIGMA utilizado) y b la longitud de la celda (1 cm).

Las muestras se pasaron por un filtro de 0.5 μ m, con un pre-filtro de 10 μ m y los solventes a utilizar por un filtro de 0.5 μ m. Se inyectaron los estándares en el cromatógrafo (10 μ l), y se registraron los picos en un graficador Perkin- Elmer. Se midieron el tamaño de los picos y se hizo la curva estándar Concentración vrs. tamaño de pico. Se inyectaron los estándares de la curva, por lo menos cada tres muestras y se utilizó un promedio de las réplicas para hacer la curva.

Se inyectaron las muestras en duplicado (10 μ l) y se midieron los picos, para luego extrapolar en la curva estándar la concentración de de β -caroteno de cada muestra.

A.2 Análisis de carotenos en heces. (33)

Extracción de Carotenos.

Se pesa 1 gr de heces secas y 2 gr de sulfato de sodio anhidro y se maceran juntos en un mortero. Del macerado homogéneo se toma una alícuota de 1.5 gr y se coloca en un frasco mediano de boca ancha. Se adiciona 1 gr de arena y se agregan 25 ml de Metanol/éter de petróleo (p.e. mayor 50°C) 1:1 (v/v). Se sella y se coloca un

aparato de agitación por 5 min. Se decanta el sobrenadante a un matraz de 50 ml. Se repite la extracción con porciones de 15 y 10 ml por 10 min, juntando todos los extractos. Se adicionan 4 ml de hidróxido de potasio metanólico al 40% y se coloca la muestra en baño térmico a 45°C por 10 min. Se transfiere a ampolla de decantación y se agrega agua para separar las fases. El agua separada se transfiere a otra ampolla de decantación y se extrae con porciones de 10 ml de éter de petróleo hasta obtener un extracto incoloro. Se juntan todos los extractos etereos y se lavan con porciones de agua destilada hasta obtener un agua de lavado neutra. Se evapora el extracto etéreo con nitrógeno en un recipiente adecuado. Los residuos de humedad son evaporados adicionando un poco de etanol absoluto.

Cromatografía.

La cromatografía puede llevarse a cabo de forma abierta o por HPLC, al igual que las muestras secas.

APENDICE B

Algunos cromatogramas obtenidos por HPLC para la cuantificación de β -caroteno

Condiciones

Solvente: Acentonitrilo/Metanol/Tetrahidrofurano (58:35:7)

Flujo de solvente: 2 ml/min

Longitud de onda: 470 nm

Unidades de absorbancia/mV: 0.01

Graficador: 1 mV full scale - Cal

Velocidad de papel: 30 cm/hora

Volumen de muestra: 10 μ l

Cromatogramas

1. Ejemplo de cromatograma de curva estándar
2. Ejemplo de cromatograma de muestra vegetal (espíaca)
3. Ejemplo de cromatograma de muestra de dieta (espíaca)
4. Ejemplo de cromatograma de muestra de heces (espíaca)
5. Cromatogramas de prueba 1
6. Cromatogramas de prueba 2
7. Cromatogramas de prueba 3
8. Cromatogramas de prueba 4
9. Cromatogramas de la evaluación del efecto de la digestión *in-vitro* en el contenido de β -caroteno en las muestras vegetales.

Ejemplo de los cálculos para la cuantificación de β -caroteno por HPLC**Tabla 1b**

Curva de Calibración

Solución	[β -carot.] ¹ (mg/L)	Alto Pico réplica 1 (cm)	Alto Pico réplica 2 (cm)	Alto Pico réplica 3 ² (cm)	Alto Pico promedio (cm)
A	2.214	3.50	4.00	3.80	3.77
B	4.101	9.10	9.45	9.40	9.32
C	5.527	10.90	10.80	10.50	10.73
D	8.828	18.75	18.40	17.90	18.35

¹ Concentración obtenida espectrofotométricamente (ver apéndice A)

² Réplica mostrada en cromatograma 1

Con los datos de concentración de β -caroteno (variable independiente) y alto del pico promedio (variable dependiente), se hizo la regresión lineal (ver gráfica 1b), donde:

$$\text{Alto Pico} = 2.0901 ([\beta\text{-caroteno}]) - 0.2065$$

$$r = 0.9955$$

La curva estándar se corría antes y después de correr dos o tres muestras. Después de la curva estándar, se corría la muestra, cada réplica en duplicado (dos inyecciones de cada réplica de cada muestra). Para el análisis de espinaca se obtuvieron los resultados de la tabla 2b (ver cromatograma 2).

Gráfica 1b
Curva de calibración de Beta-caroteno

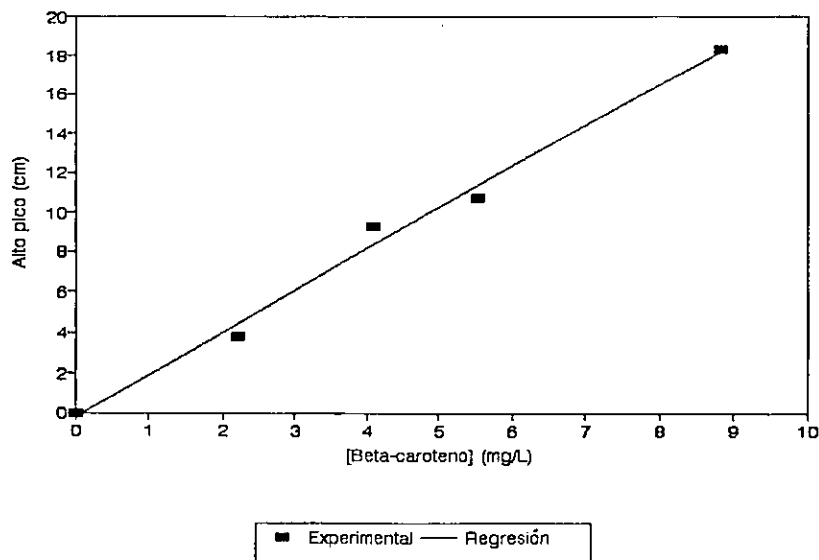


Tabla 2b

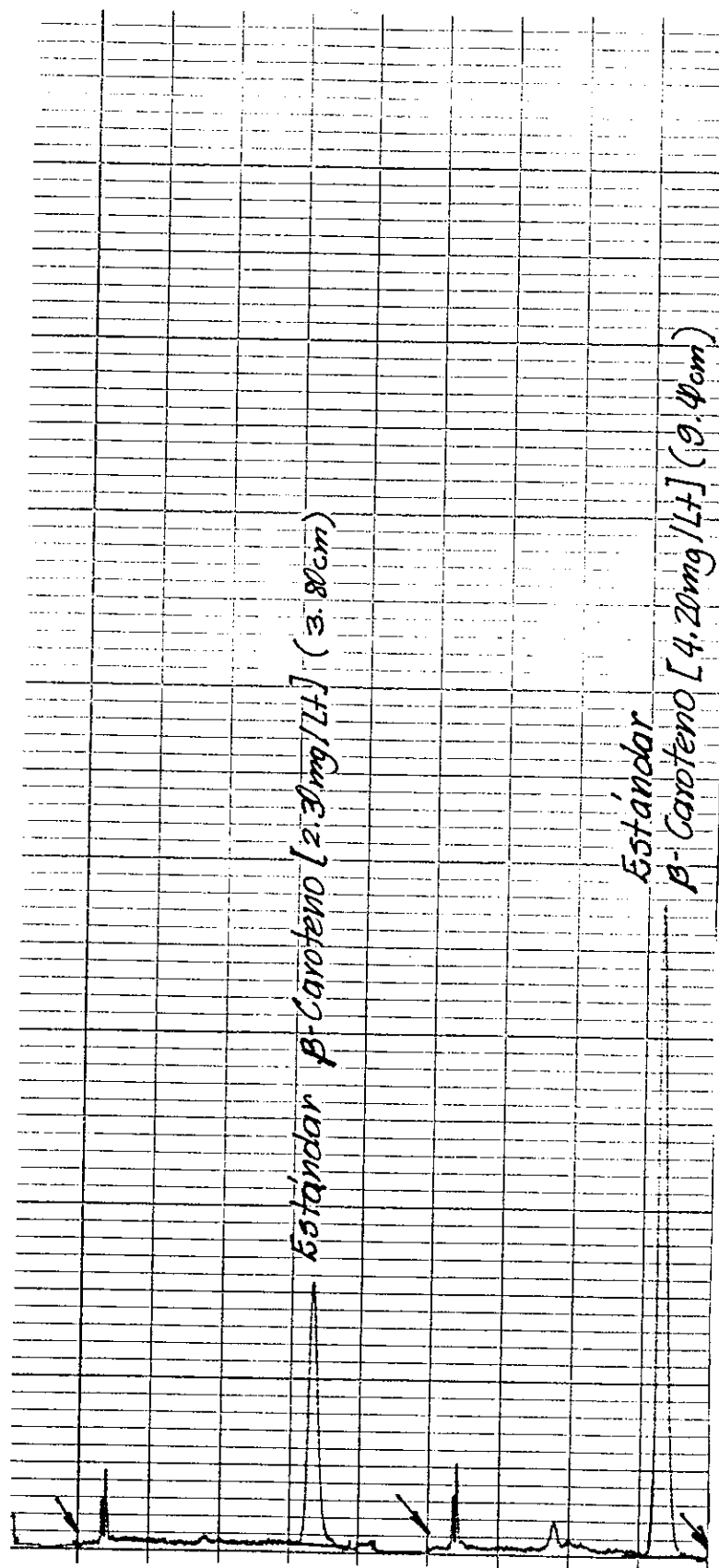
Resultados del análisis de β -caroteno de espinaca

Rep.	Alto Pico (inyec. 1) (cm)	Alto Pico (inyec. 2) (cm)	Alto Pico promedio (cm)	[β -carot.] (mg/L) ¹	[β -carot.] (mg/g) ²	[β -carot.] promedio
1	15.20	15.45	15.32	7.431	0.334	0.33 ± 0.01
2	14.20	14.40	14.30	6.940	0.337	
3	14.10	14.30	14.20	6.893	0.327	

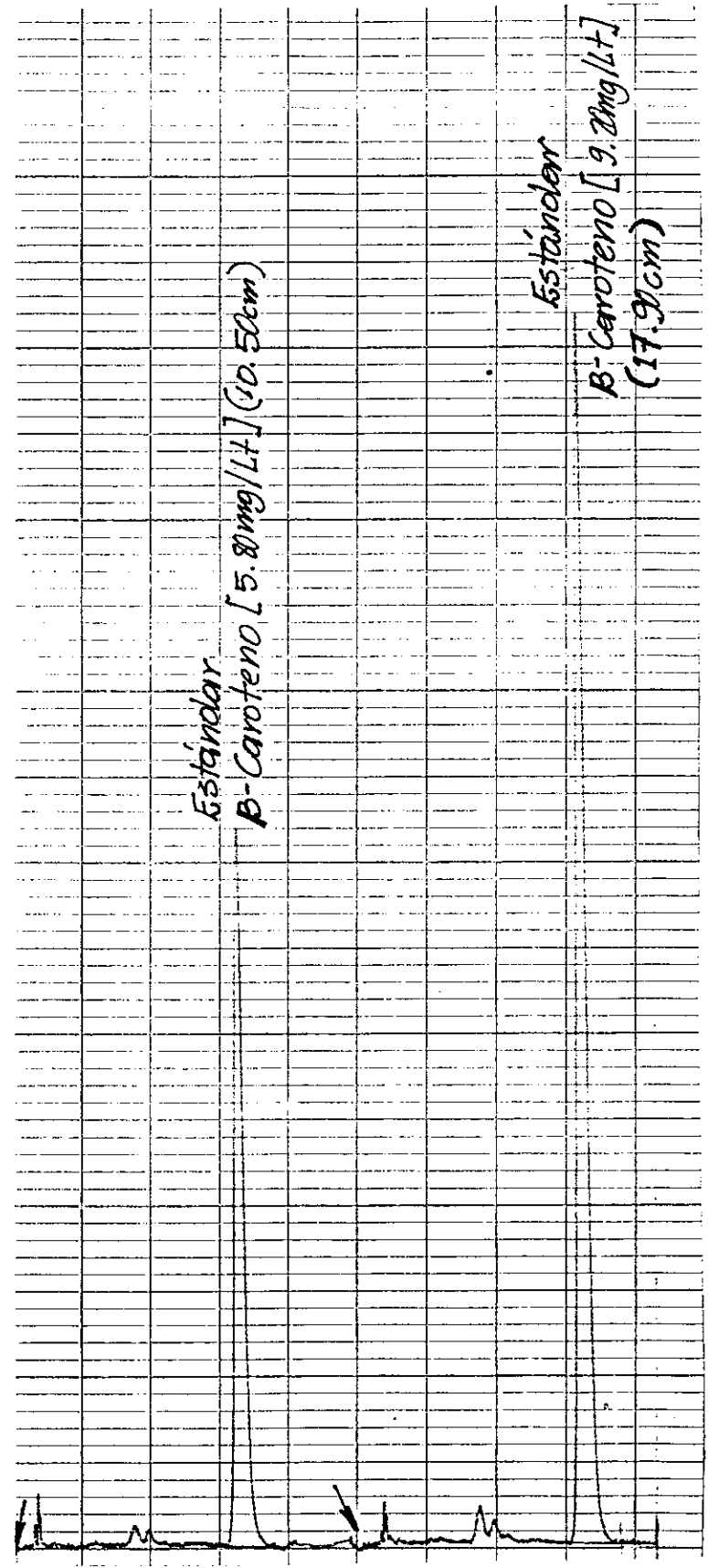
¹ Este dato se obtiene sustituyendo el valor de alto de pico promedio en la ecuación de la curva de calibración.

² Este resultado se obtiene de multiplicar el dato de la columna anterior por el factor de dilución (en este caso 2) y por el volumen final de solvente (0.05 L) y dividirlo por el peso de la muestra (2.2213, 2.0614 y 2.1088 gr para cada una de las réplicas, respectivamente).

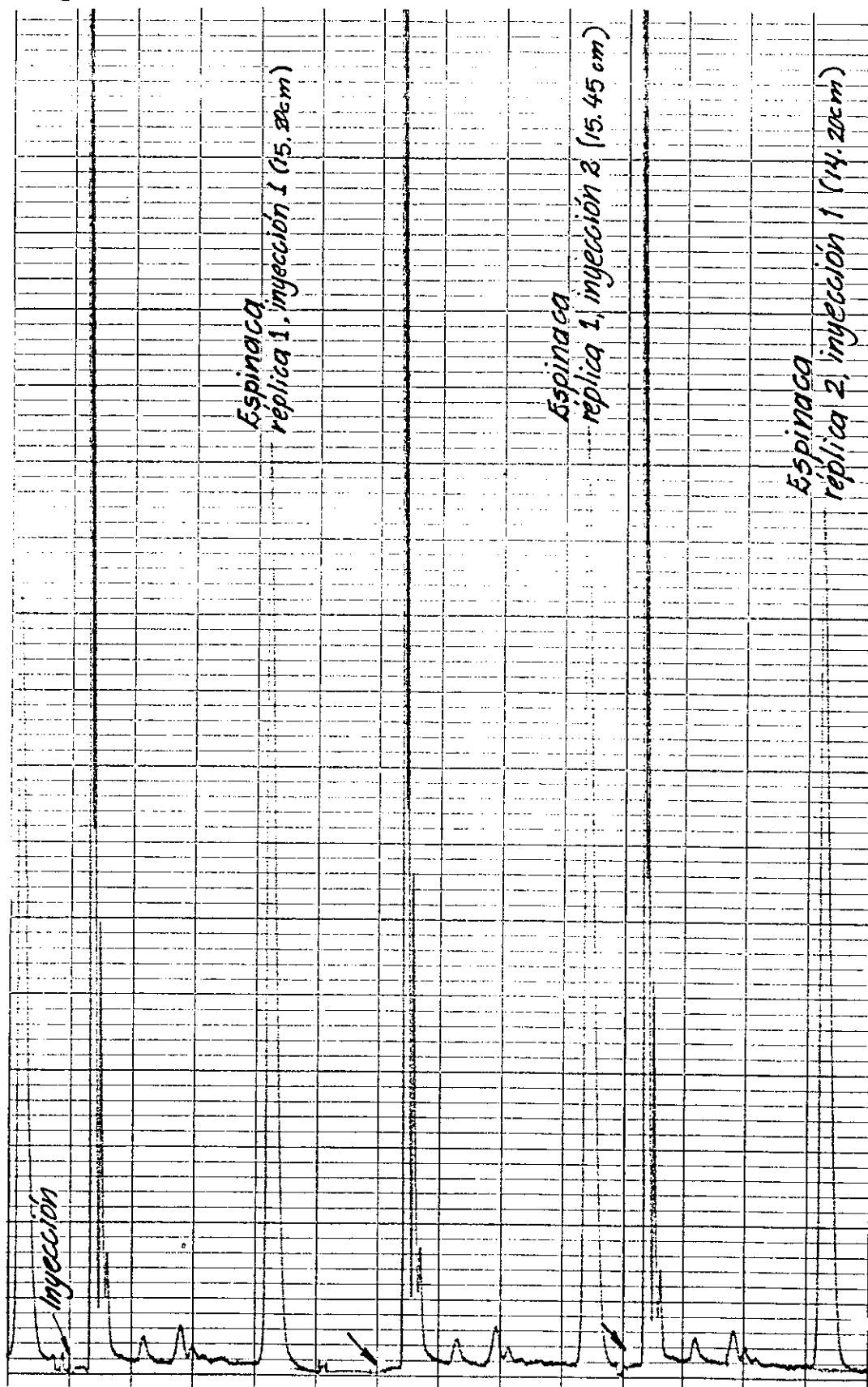
Cromatograma 1



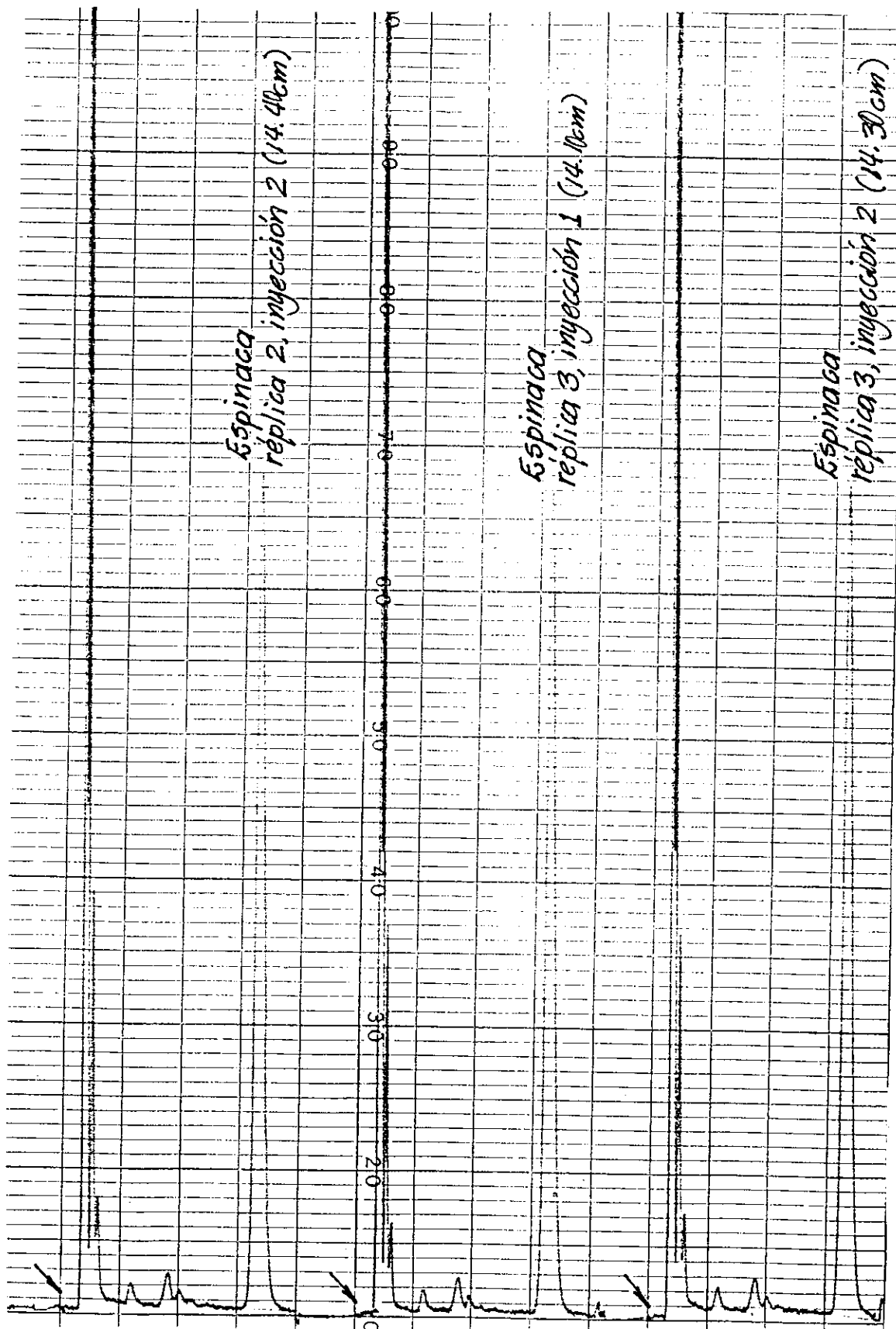
Cromatograma 1 (cont.)



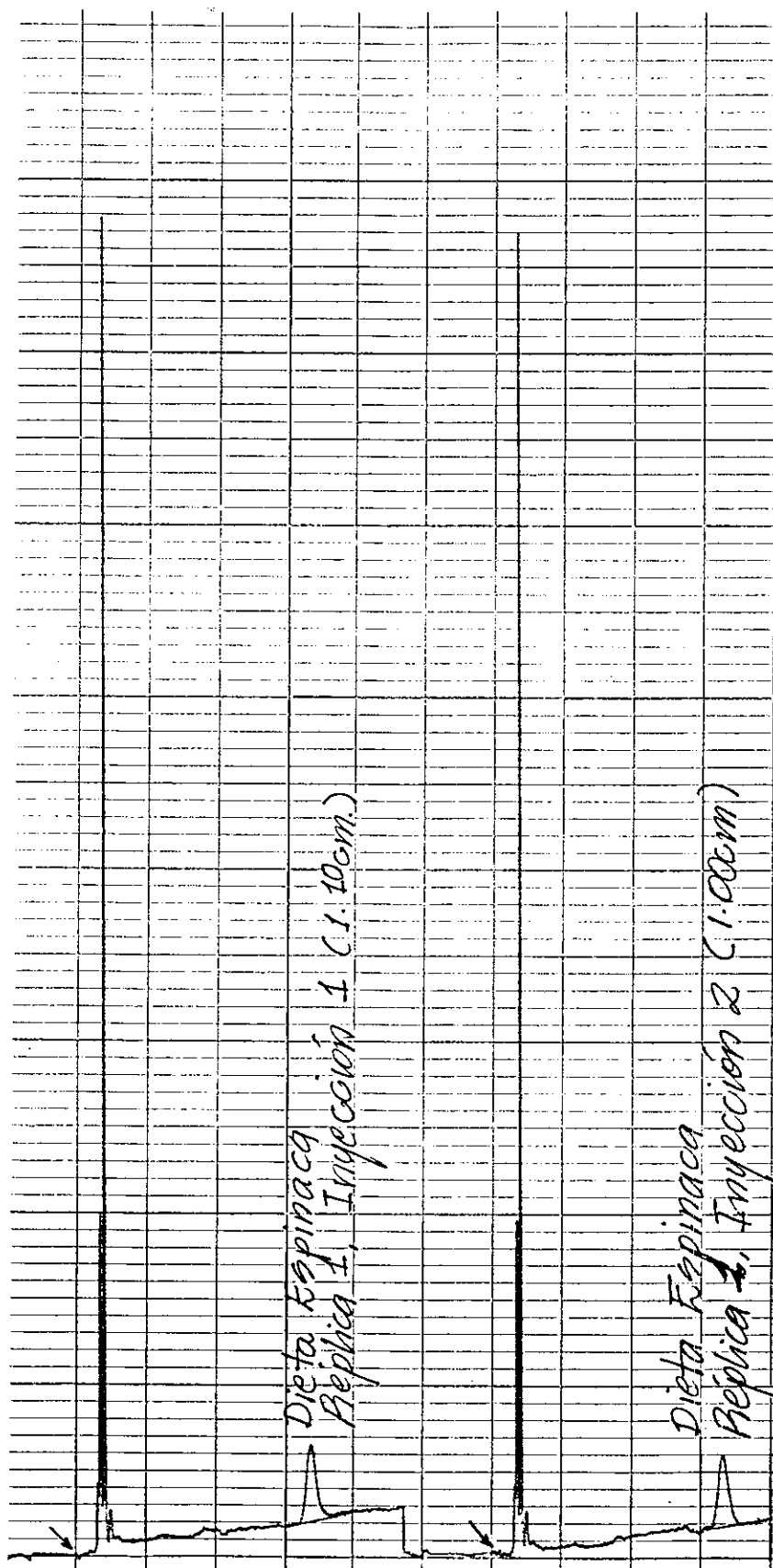
Cromatograma 2



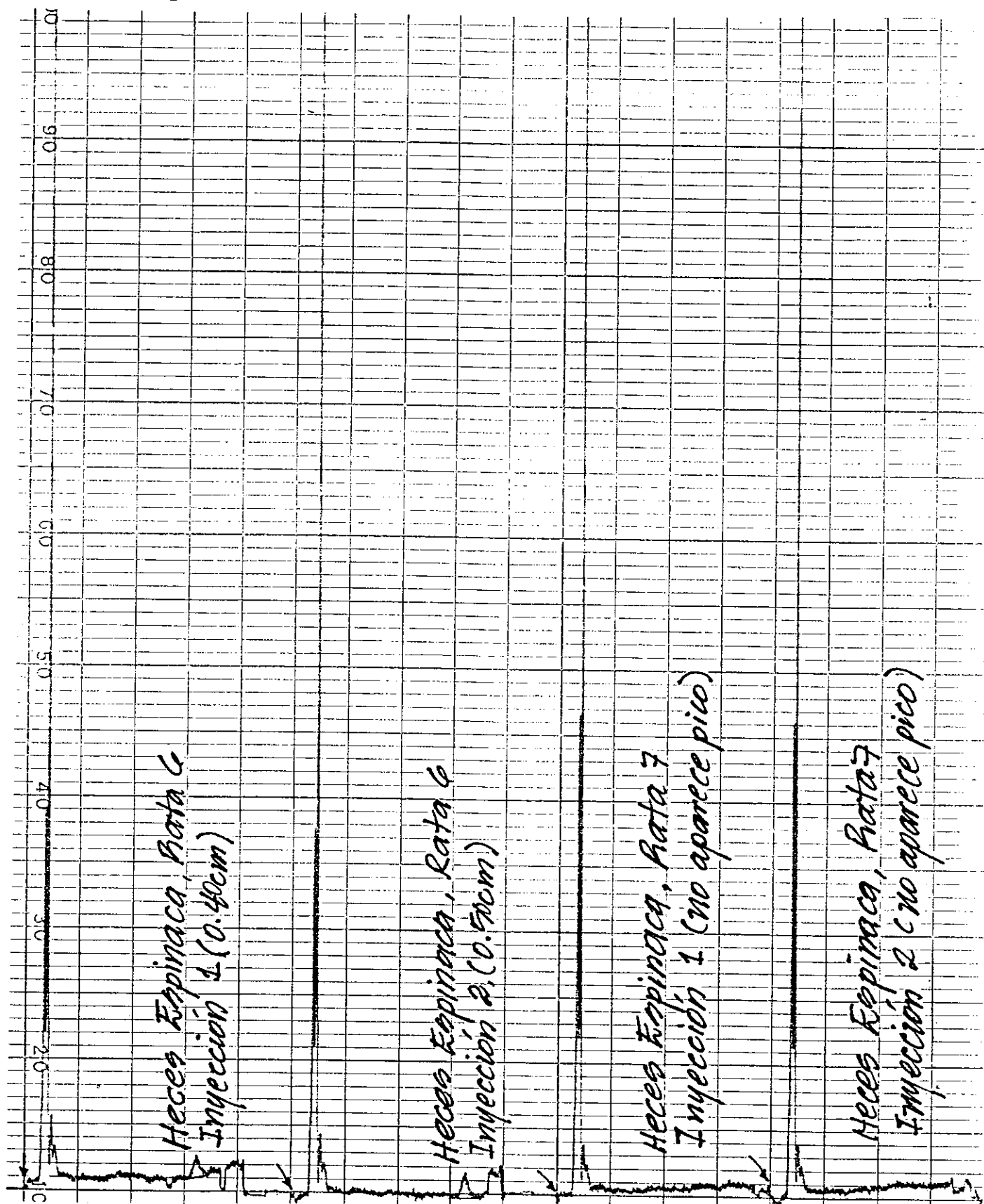
Cromatograma 2 (cont.)



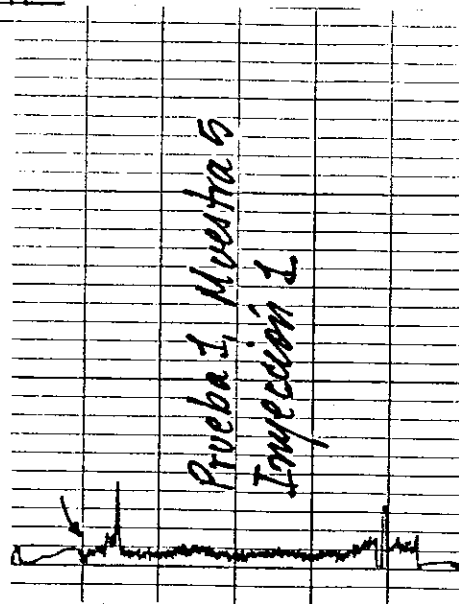
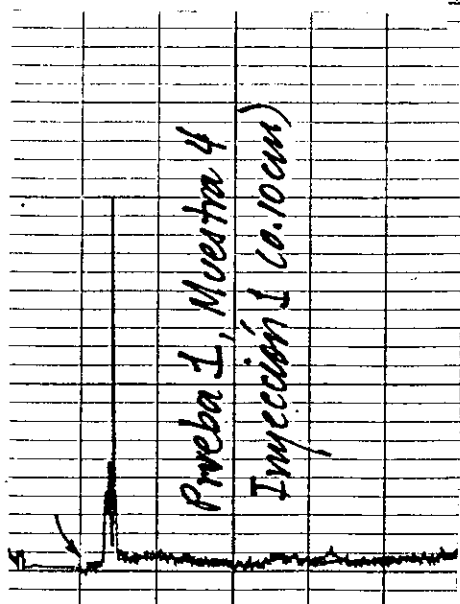
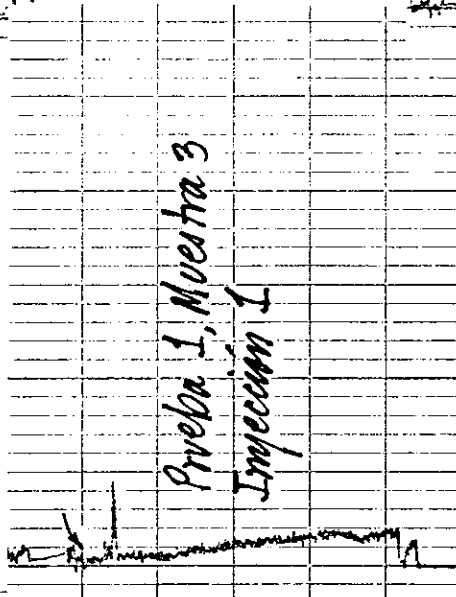
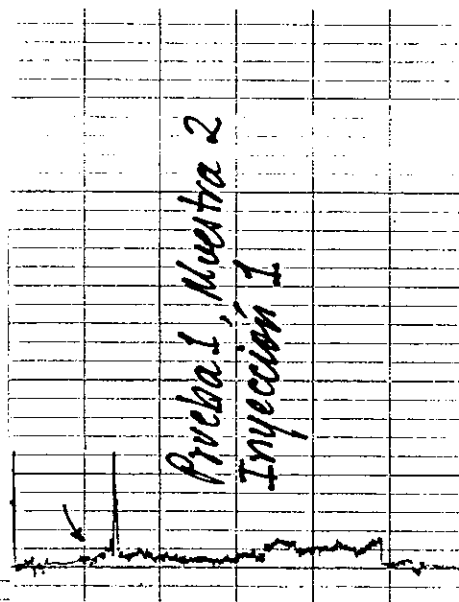
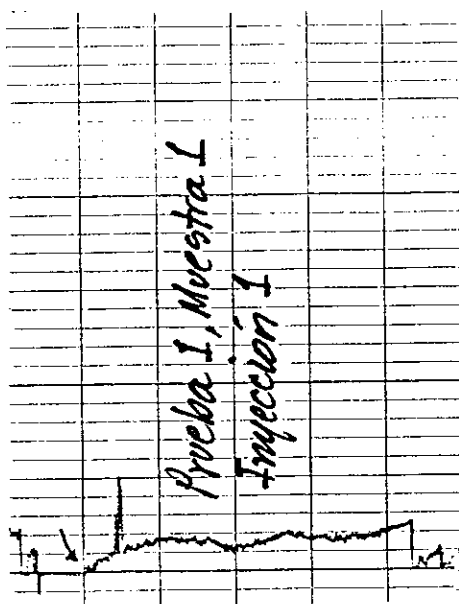
Cromatograma 3



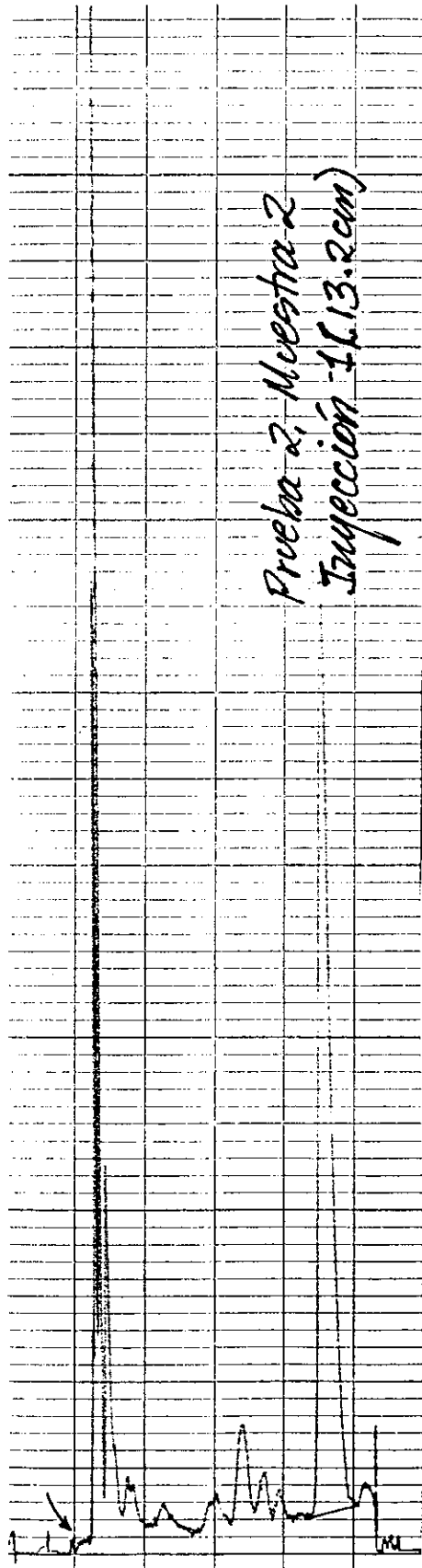
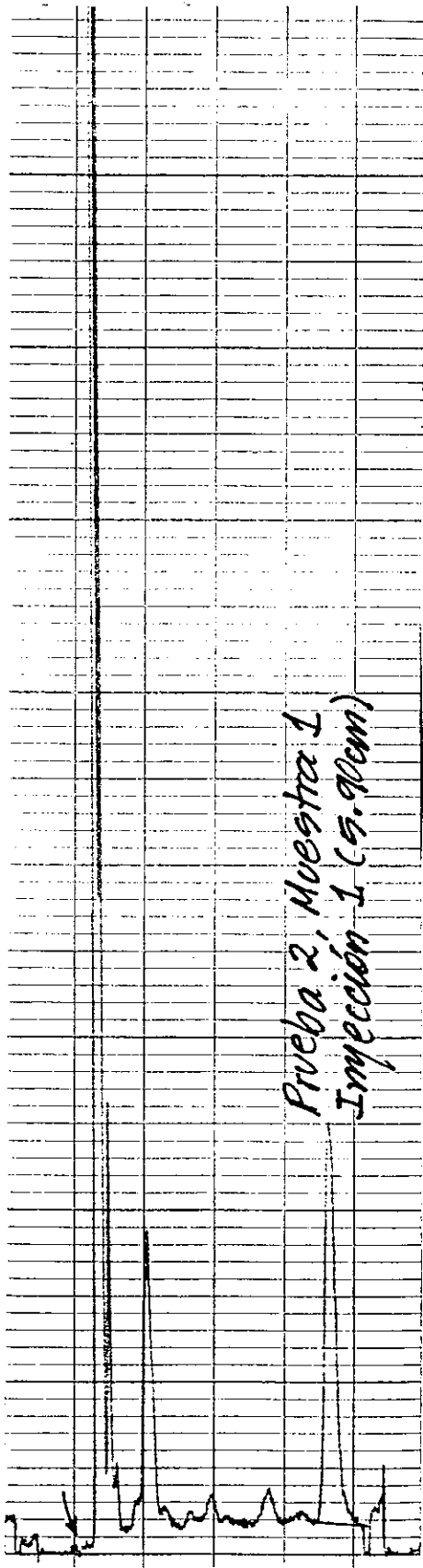
Cromatograma 4



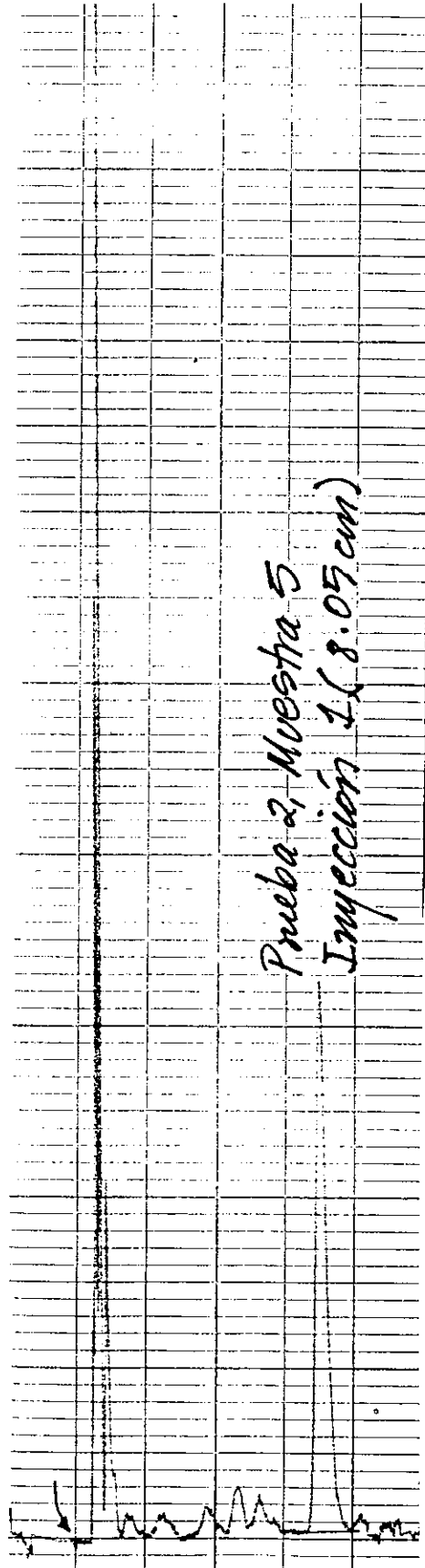
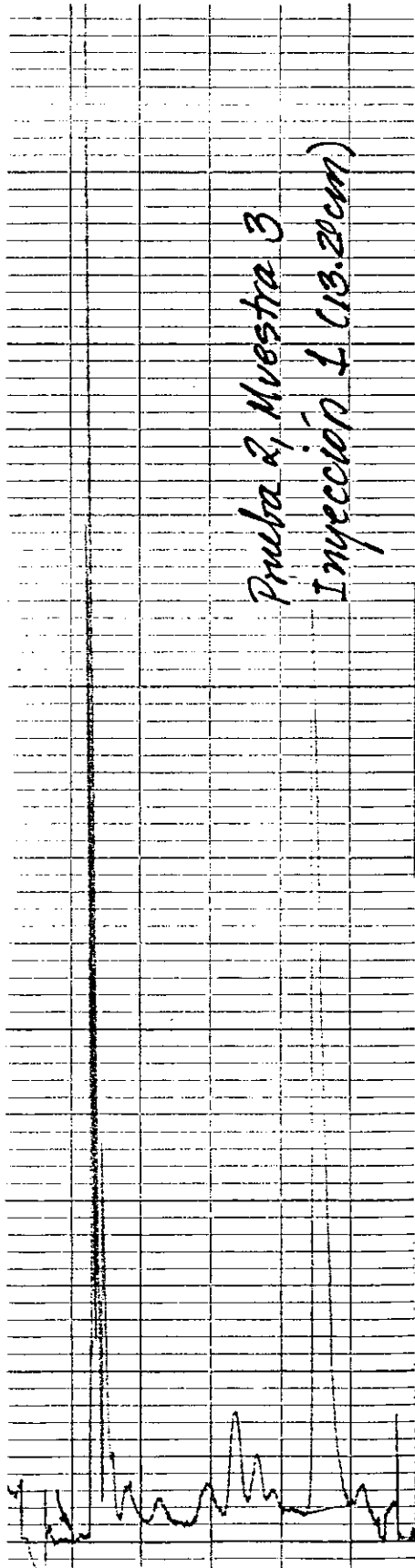
Cromatograma 5



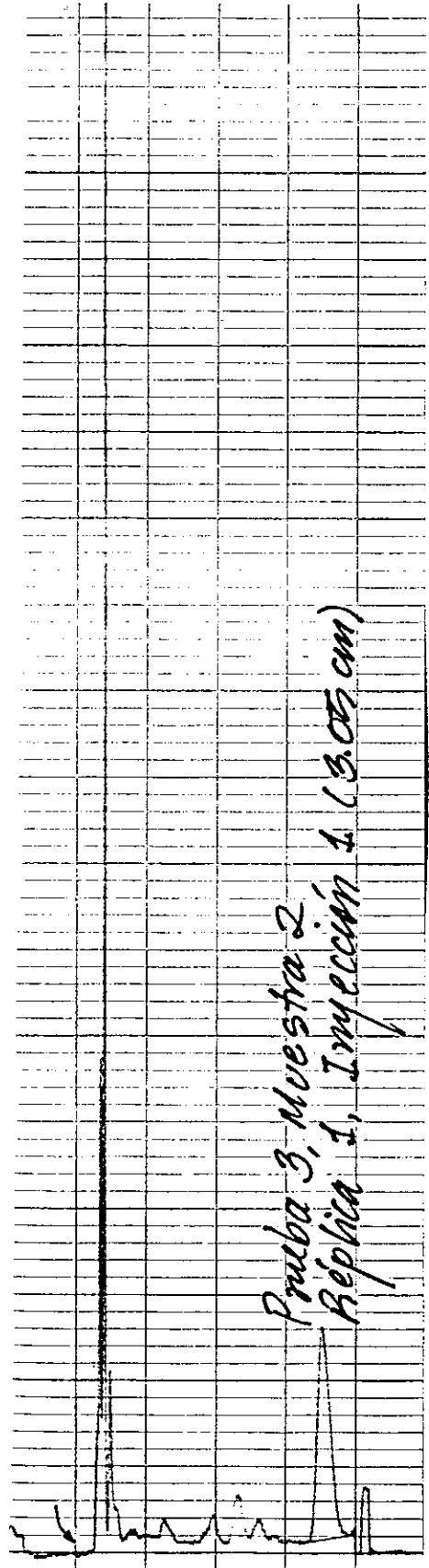
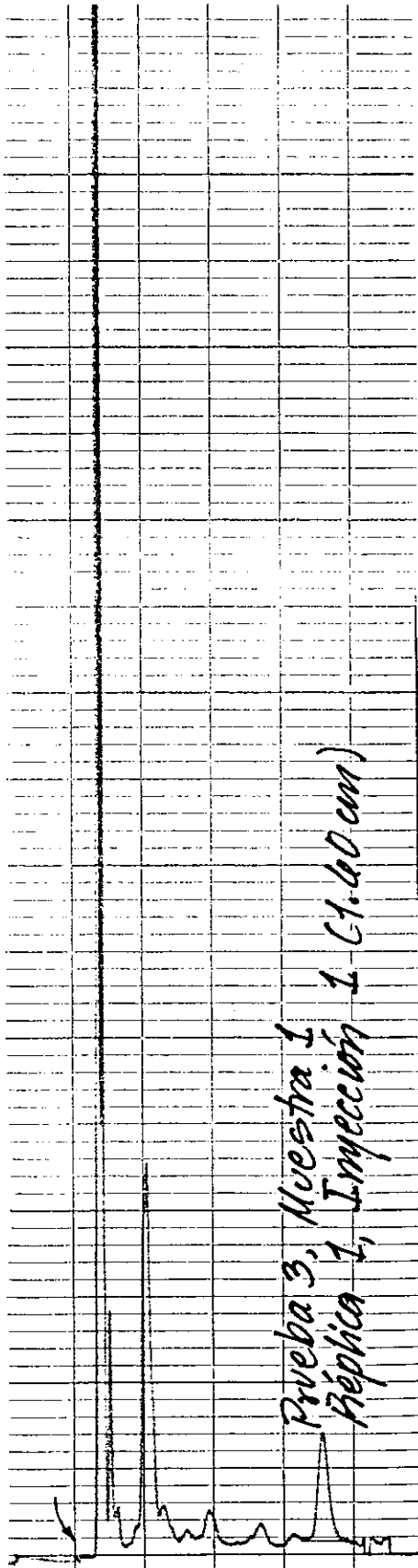
Cromatograma 6



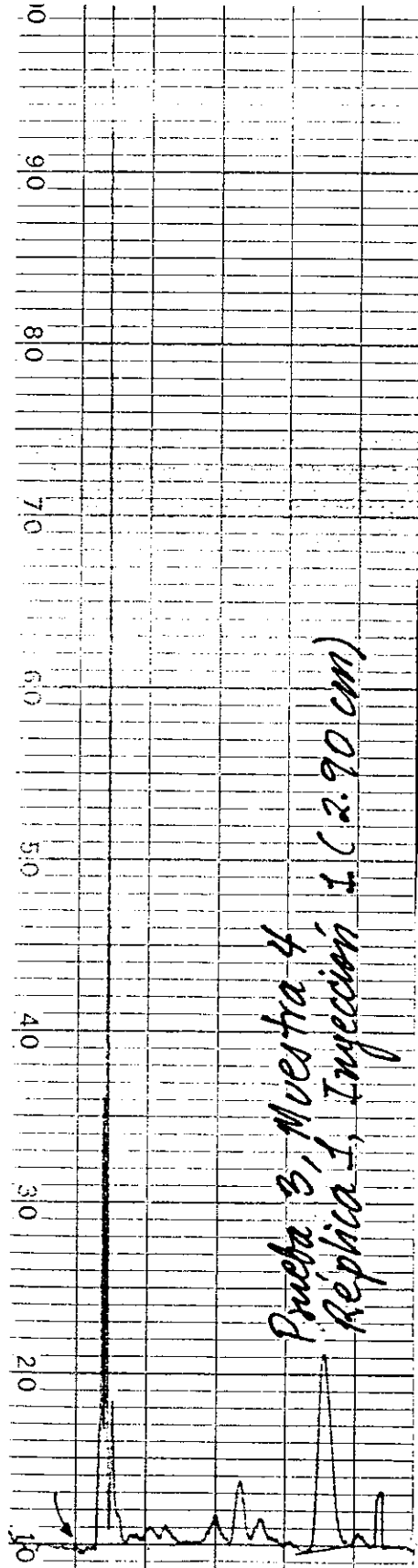
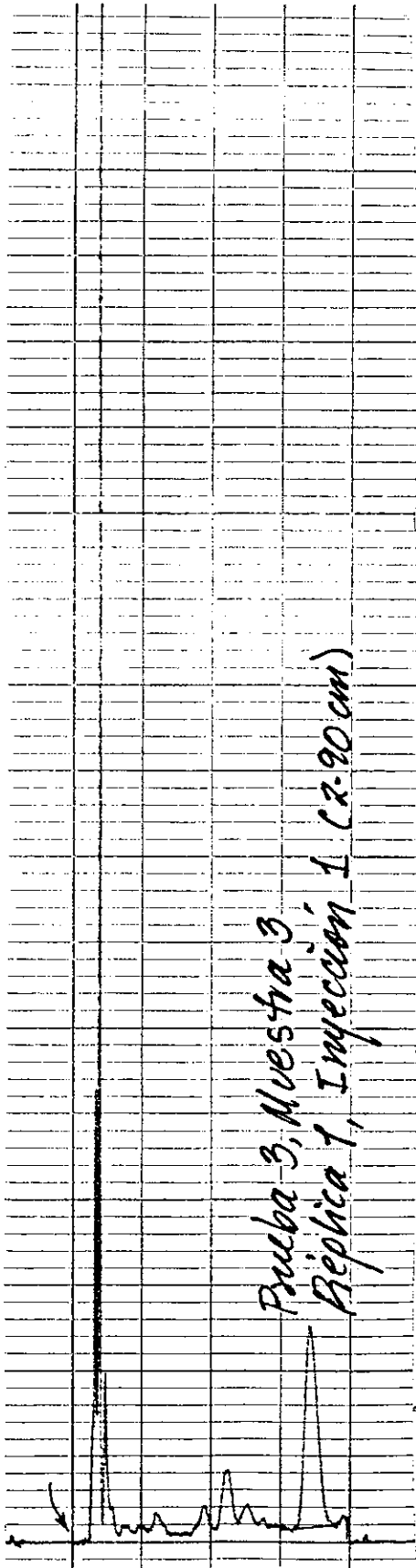
Cromatograma 6 (cont.)



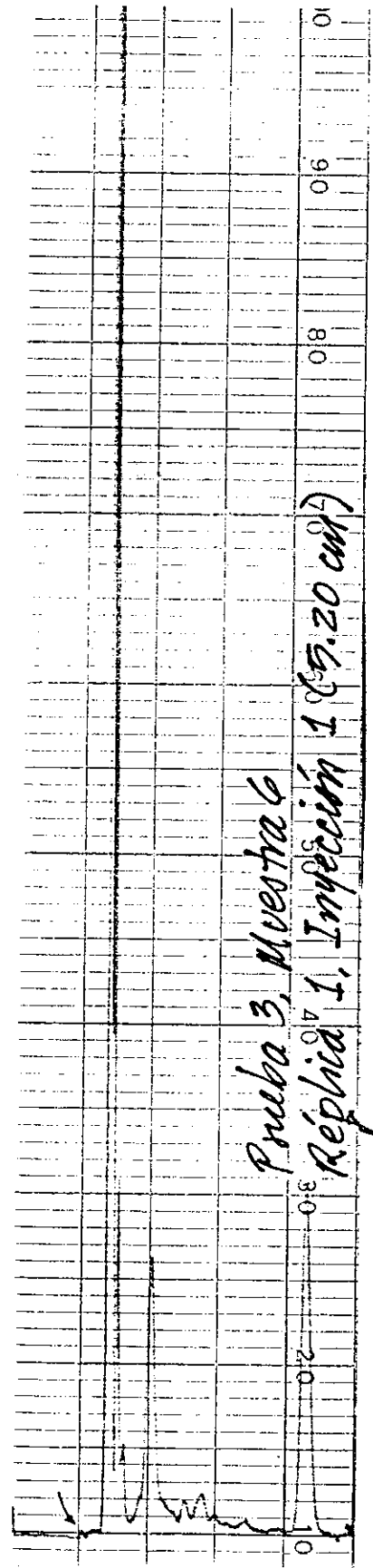
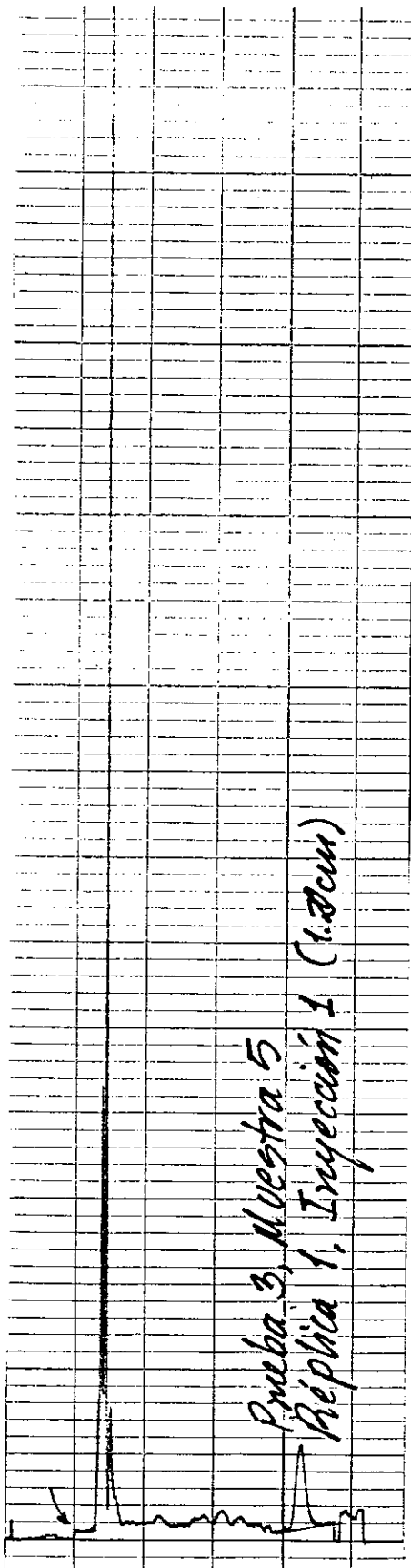
Cromatograma 7



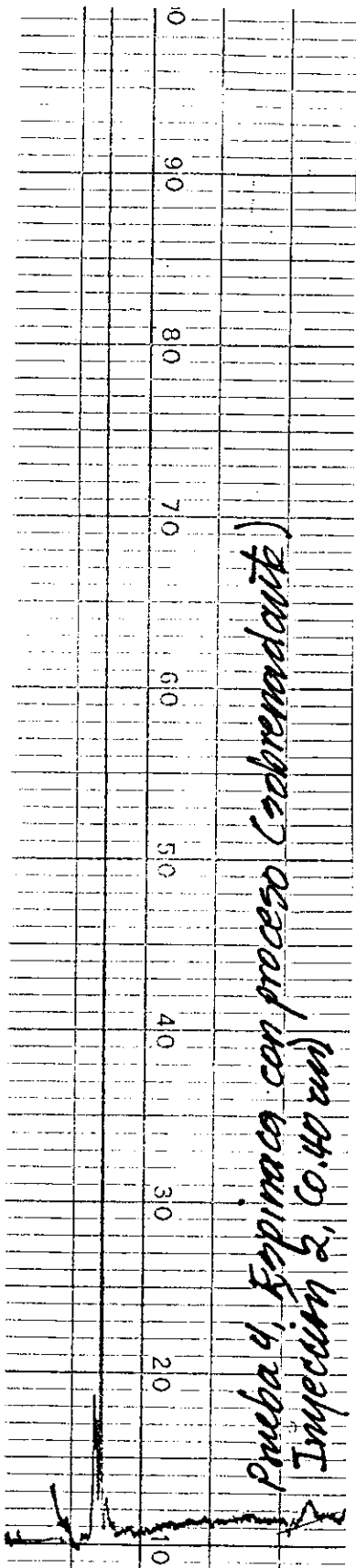
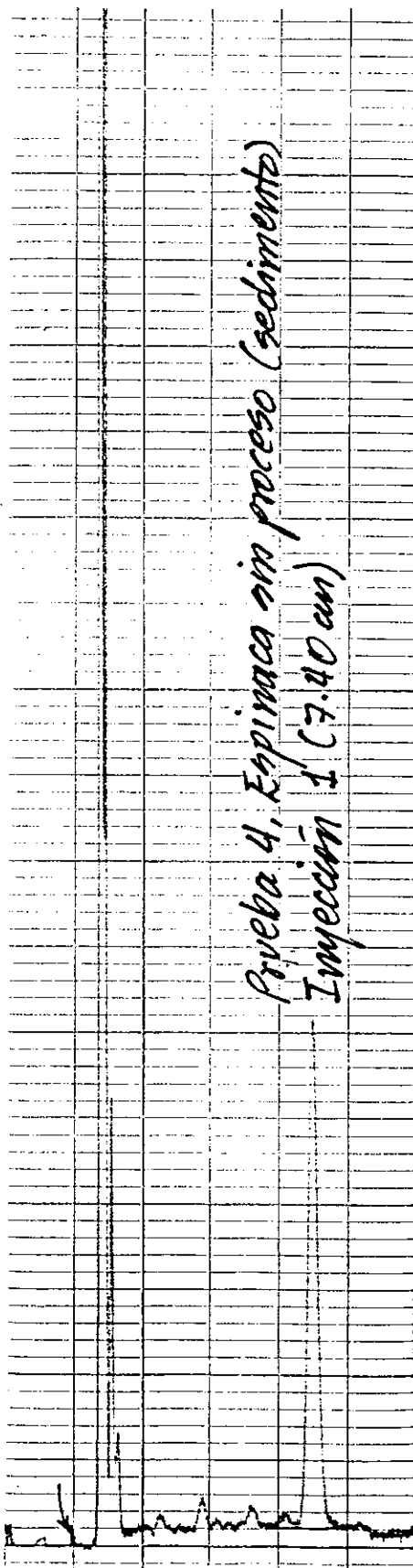
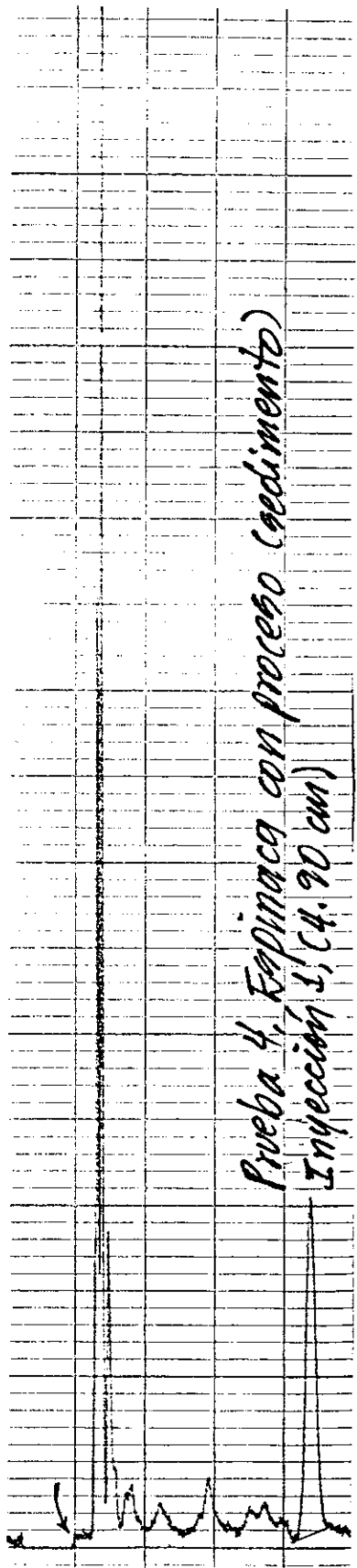
Cromatograma 7 (cont.)



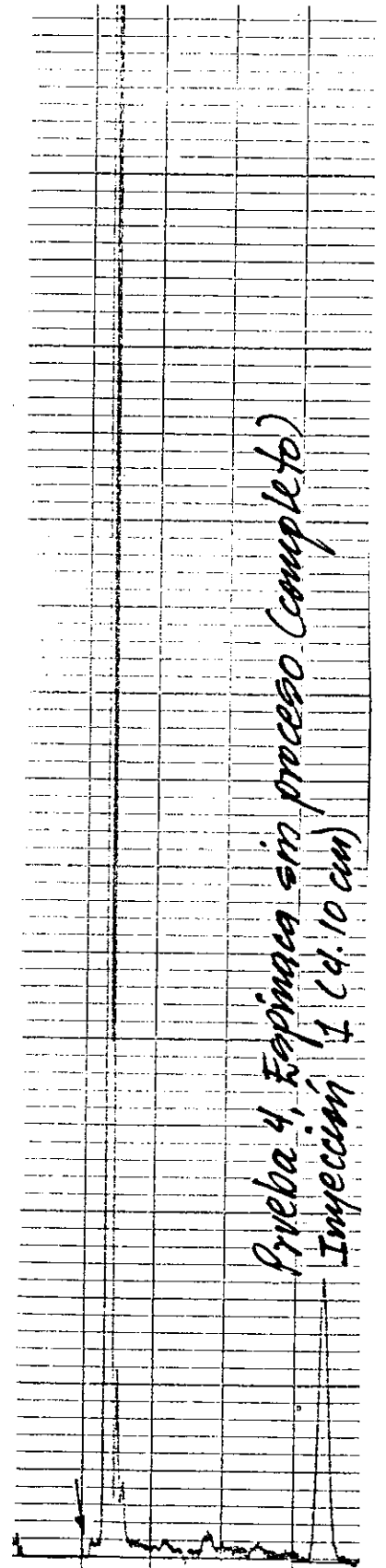
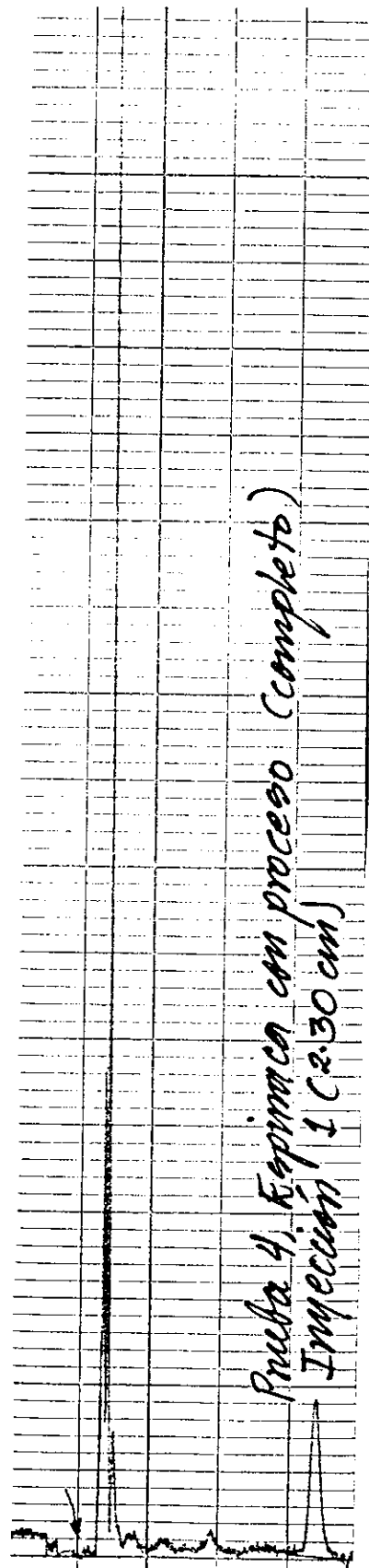
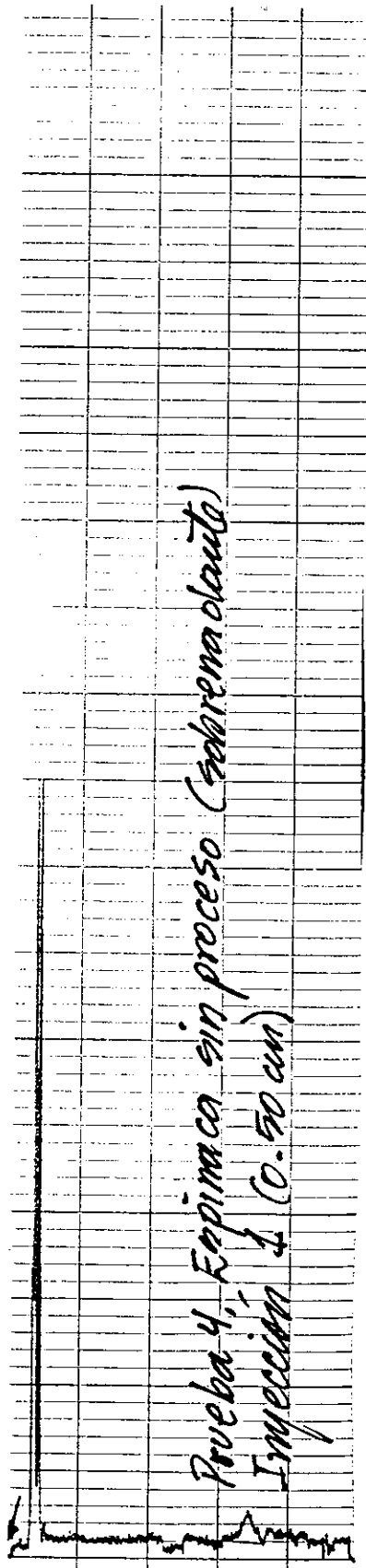
Cromatograma 7 (cont.)



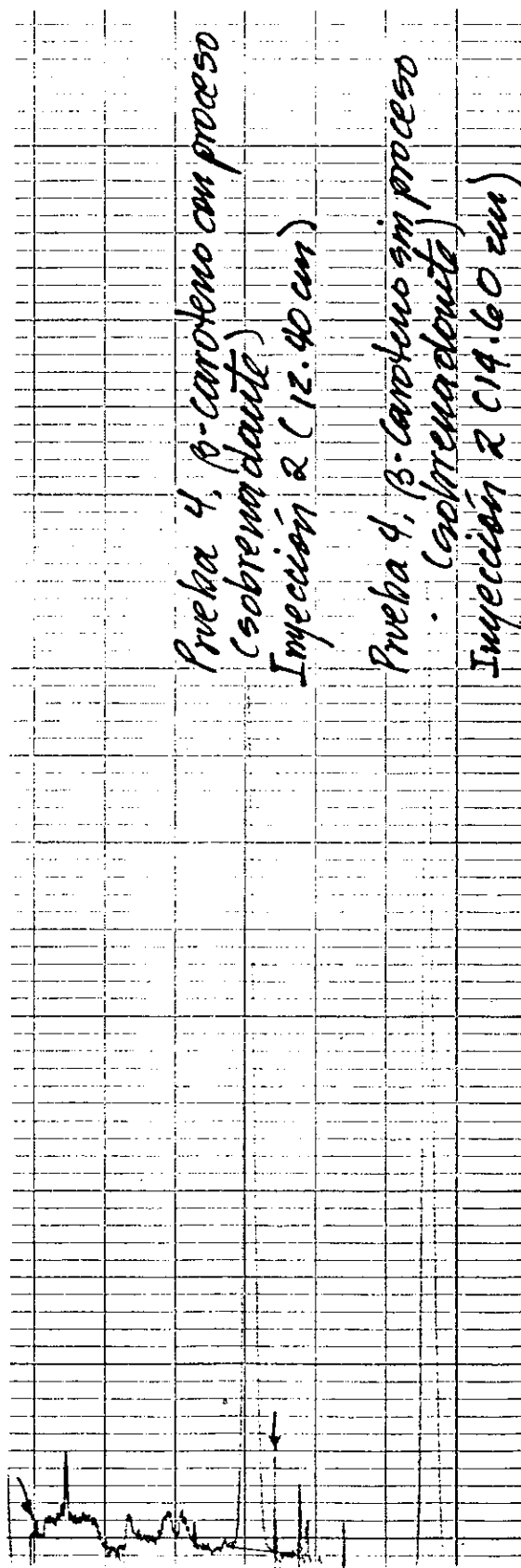
Cromatograma 8



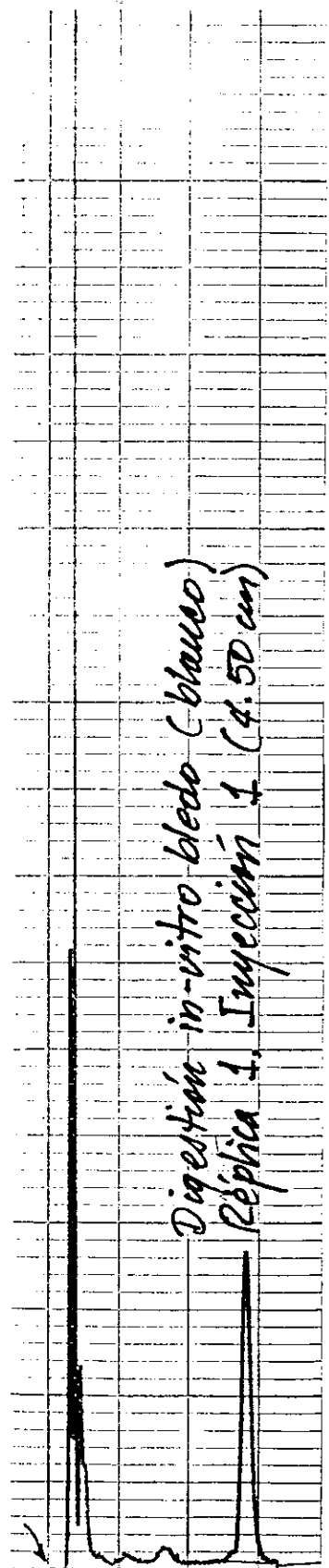
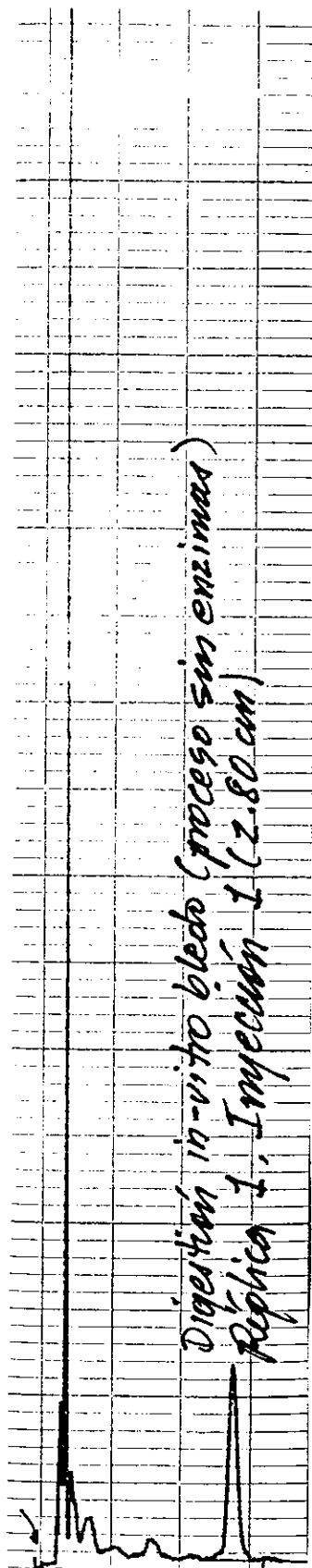
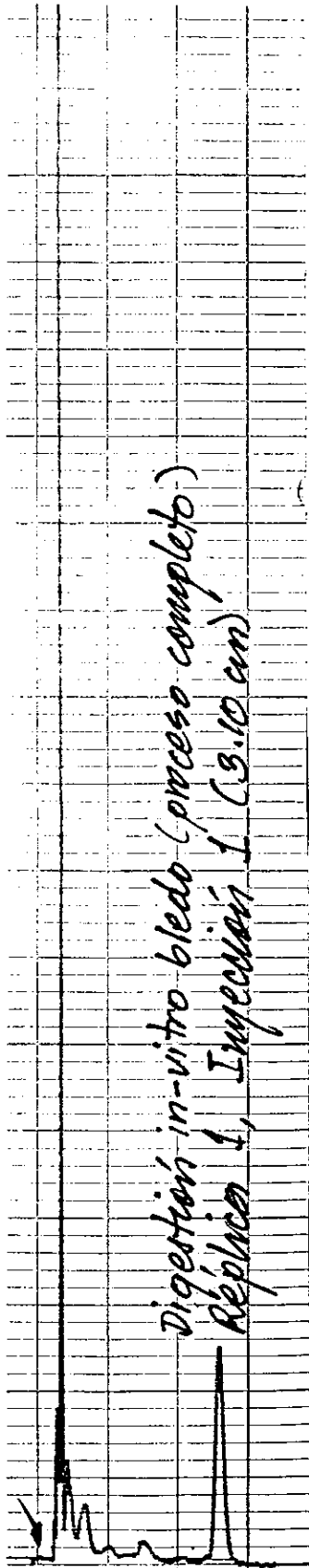
Cromatograma 8 (cont.)



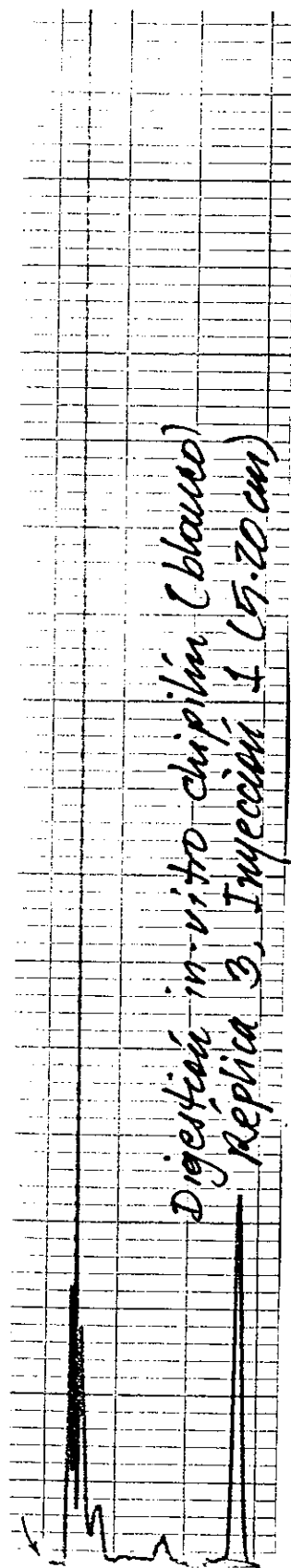
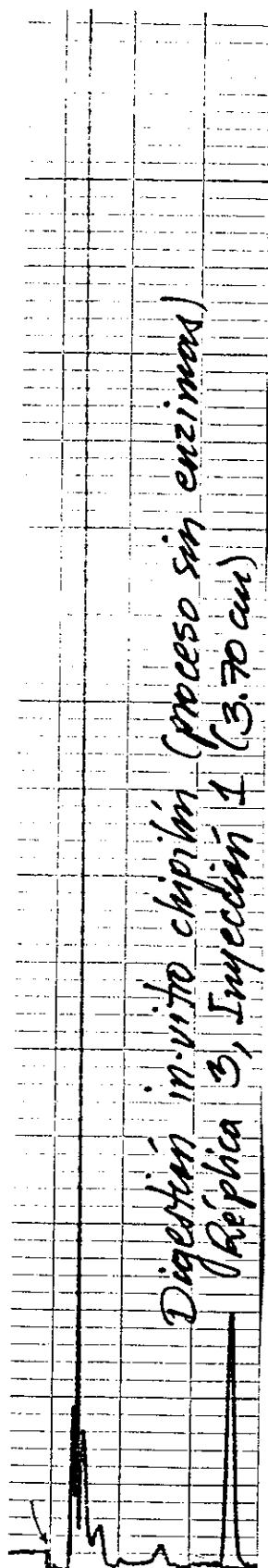
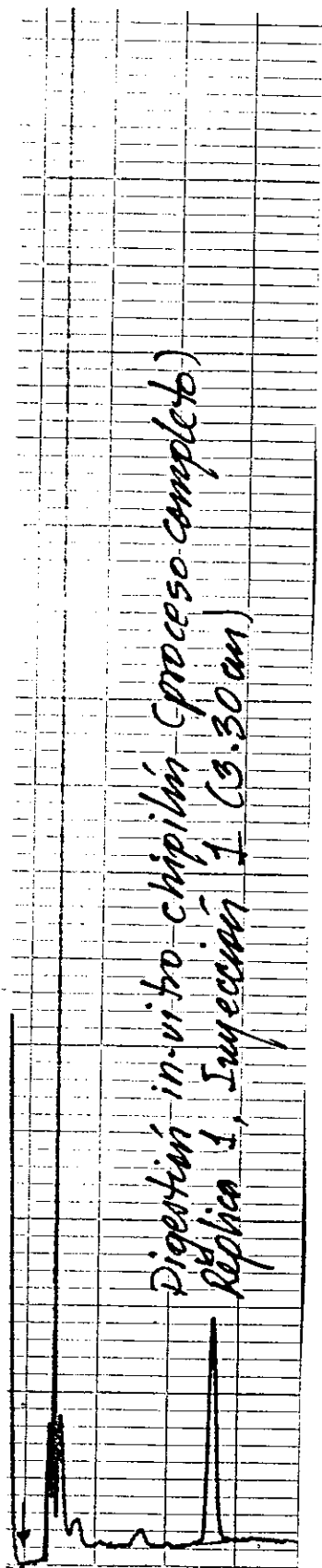
Cromatograma 8 (cont.)



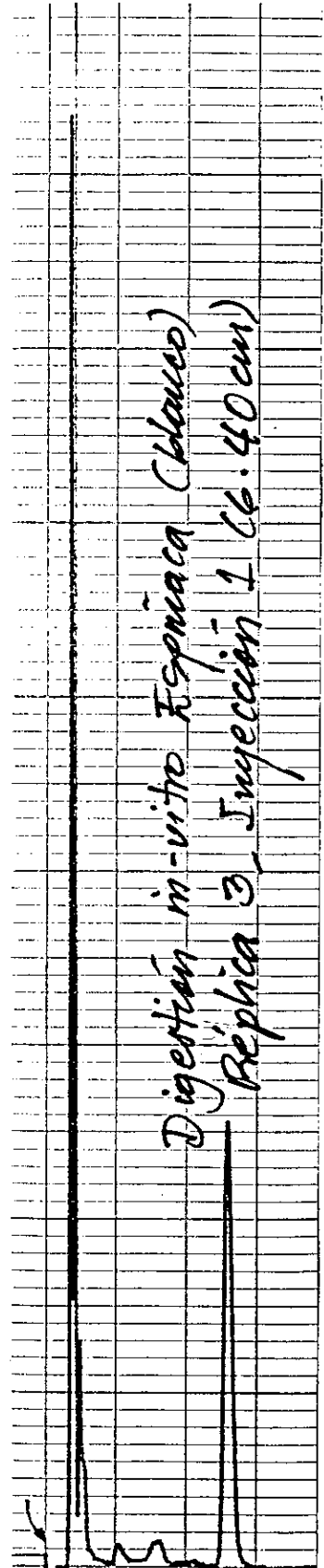
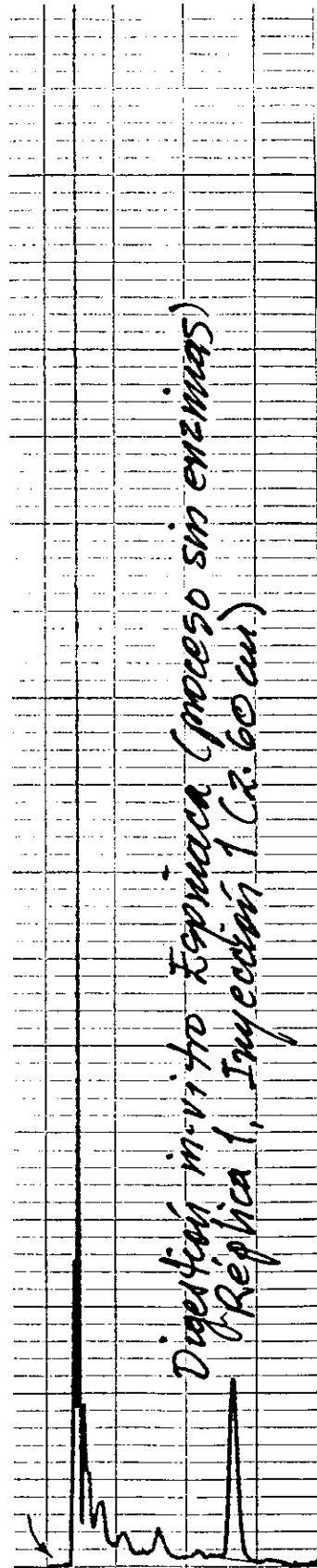
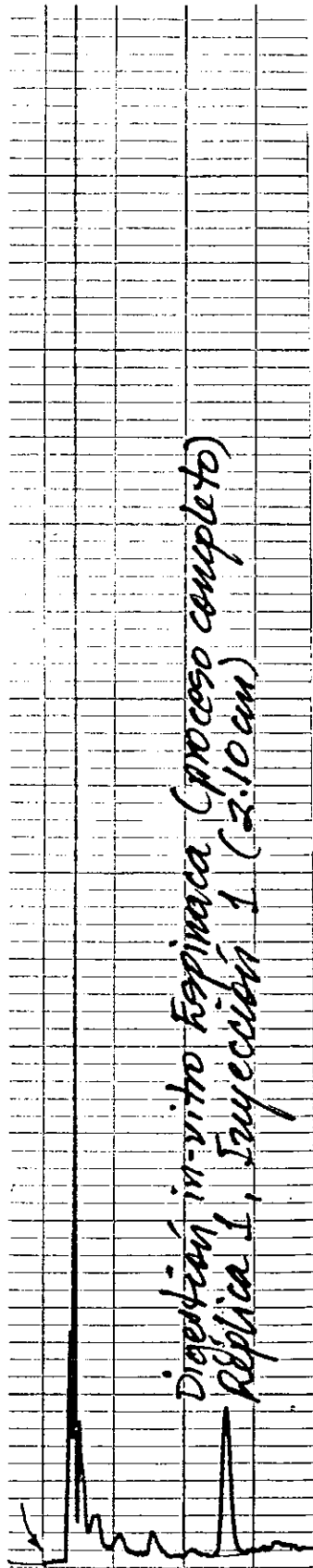
Cromatograma 9



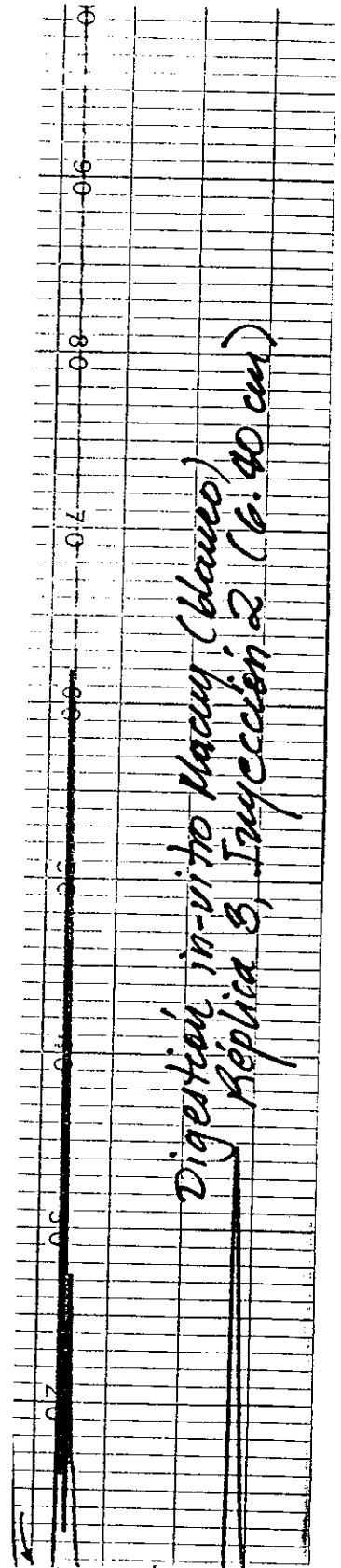
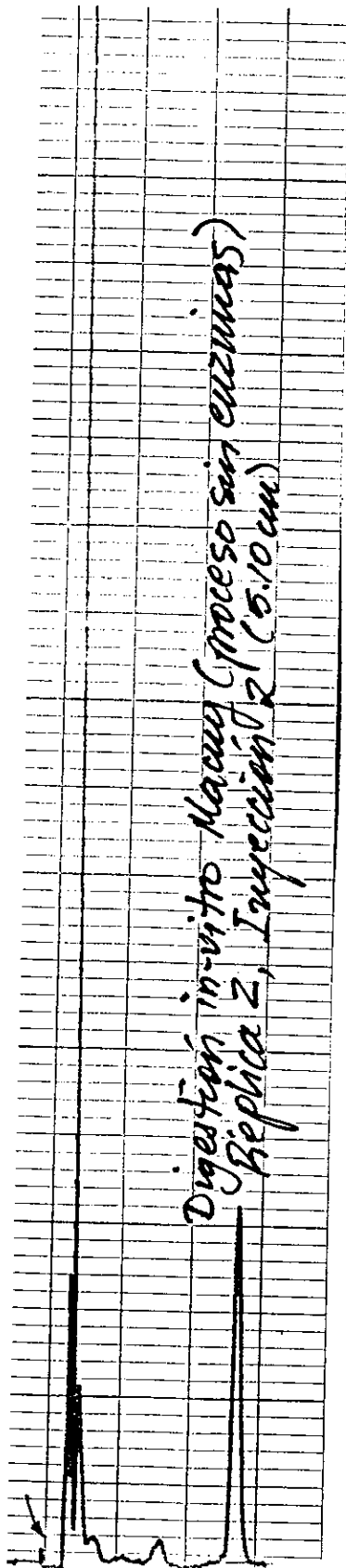
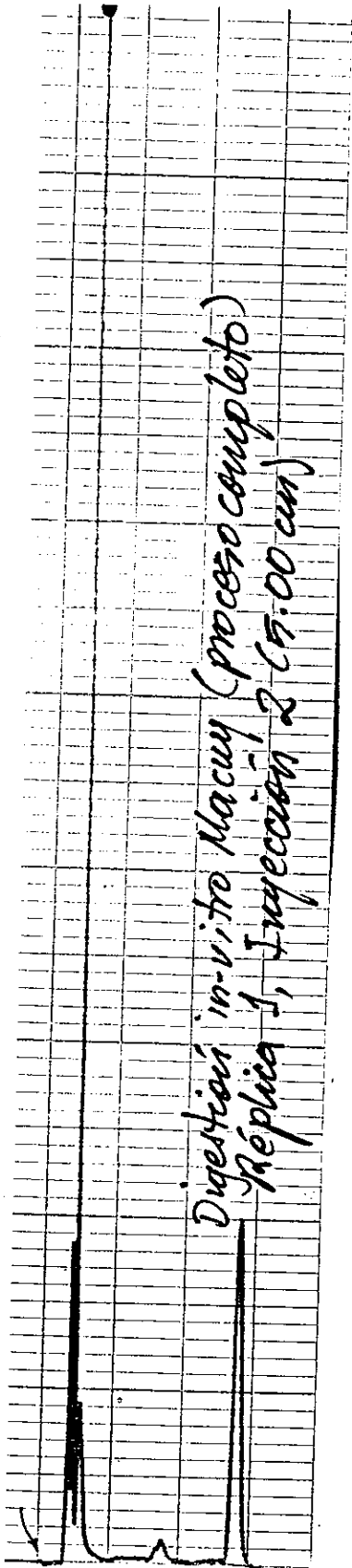
Cromatograma 9 (cont.)



Cromatograma 9 (cont.)



Cromatograma 9 (cont.)



APENDICE C

Resultados del análisis estadístico para la comparación de tratamientos de el método de digestión *in-vitro* de β -caroteno en las muestras vegetales

SAS

Analysis of Variance Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for variable: CAROTENO

NOTE: This test controls the type I experimentwise error rate, but generally has a higher type II error rate than REGWQ.

Alpha= 1.05 df= 24 MSE= 0.000212

Critical Value of Studentized Range= 3.532

Minimum Significant Difference= 0.0148

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRAT
A	0.23933	12	3
B	0.17425	12	2
B	0.17003	12	1