



IX CONGRESO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS y V FORO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Evaluación del Efecto Antihiper glucémico del Bagazo de Naranja (*Citrus sinensis* var. Valencia) en Estudios *in vitro*.

Hernández-González, Gilda ⁽¹⁾, Camacho-Reynoso, Rosalia ⁽²⁾, Castro-Rosas, Javier ⁽¹⁾ y Gómez-Aldapa, Carlos Alberto ^{(1)*}. ⁽¹⁾ Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. ⁽²⁾ Unidad de posgrado de Ciencia y Tecnología (PROPAC), Universidad Autónoma de Querétaro. *Autor de correspondencia: cgomeza@uaeh.edu.mx

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antihiper glucémico del bagazo de naranja (*Citrus sinensis* Var. Valencia), en estudios *in vitro*. Se trabajó con el bagazo de naranja, el cual fue deshidratado a 70 °C durante 7 h. Posteriormente, se cuantificó el contenido de fibra soluble e insoluble. En los estudios *in vitro* se evaluó la capacidad que tiene la fibra para atrapar glucosa en un sistema modelo (membrana de diálisis), la fibra se incubó con diferentes concentraciones de glucosa y se cuantificó el contenido de glucosa en el medio. Así mismo, se determinó la capacidad que tiene la fibra de inhibir la actividad de la enzima α -amilasa, utilizando como sustrato al almidón. Las tres harinas de bagazo deshidratado presentan un elevado porcentaje de fibra soluble que representa más del 55% y el porcentaje de fibra insoluble fue menor del 3%, así mismo se observó que los tres diferentes tipos de harina de bagazo deshidratado de naranja manejados en este estudio; absorben glucosa, retardan la difusión de la glucosa a través de una membrana de diálisis y tienen actividad para inhibir la actividad de la enzima α -amilasa.

Abstrac

The objective of the present work was evaluate the anti-hyperglycemic effect of the orange bagasse (*Citrus sinensis* Var. Valencia), with *in vitro* studies. The orange bagasse was dehydrated to 70 °C during 7 h. After, the soluble and insoluble fiber content was quantified. In the *in vitro* studies was evaluated the capacity that has the fiber to catch glucose in a model system (dialysis membrane). The fiber was incubated with different glucose concentrations, and glucose content of solutions was quantified. Also, the capacity that has the fiber to inhibit the activity of the α -amylase enzyme was determined, using starch like substrate. The three dehydrated bagasse flours display a high percentage of soluble fiber that represents more than 55% and the percentage of insoluble fiber was smaller of 3%. In the same way, was observed that the three different types of orange bagasse flour handled in



IX CONGRESO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS y V FORO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



this study; they absorb glucose, they slow down diffusion of glucose through a dialysis membrane and have activity to inhibit the activity of α -amylase.

Palabras clave: Bagazo de naranja, fibra dietética, efecto antihiper glucémico, diabetes.

Introducción.

La diabetes es una enfermedad crónico-no transmisible. Su prevalencia ha aumentado notablemente en los últimos años, debido a los cambios existentes tanto en los hábitos alimentarios y el carácter sedentario de las personas. Se caracteriza por niveles elevados de glucosa en la sangre, debido a la falta de secreción de insulina o una alteración en la respuesta a esta hormona. Por años, en México se han utilizado un sin número de plantas y frutas como apoyo en el tratamiento del control de la diabetes, tal es el caso del nopal, por su alto contenido de fibra a la cual se le han atribuido muchos de los efectos fisiológicos que se obtienen al consumir estos productos, por lo que han sido utilizados en la medicina tradicional, para la prevención y el control de algunas enfermedades, tales como: hipertensión, obesidad y diabetes tipo 2 (DM2).

Materiales y Métodos.

Material biológico: Naranja Var. Valencia adquirida en el mercado municipal de Pachuca de Soto, Hidalgo; en el mes de enero de 2006.

Obtención de la harina de bagazo de naranja: La naranja se lavó, se procedió a extraer el jugo con un extractor convencional domestico y una vez extraído, el bagazo de naranja se deshidrató en una estufa con circulación de aire forzado (Oven Series 900 marca Thermolyne) a 70 °C por 7 h; se molió en una licuadora domestica (Osterizer), obteniéndose así una harina de bagazo de naranja deshidratado (Gómez *et al.*, 2005). Con la finalidad de disminuir el tamaño de partícula se procedió a tamizar la harina de bagazo de naranja deshidratado (fibra total), la que pasó por la malla 100 (U.S. Number). Se denominó fibra tamiz y la harina de bagazo de naranja deshidratado retenida en la malla 100 se identificó como fibra residual.

Fibra dietética soluble: Se peso por triplicado 1 g de cada una de las muestra obtenidas, éstas fueron colocadas en matraces Erlenmeyer de 500 mL, se les adicionaron 50 mL del buffer de fosfatos pH 6.0 y 0.1 mL de α -amilasa termoestable (TDF100A, Sigma-Aldrich); la



IX CONGRESO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS y V FORO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



mezcla se colocó en un baño de agua hirviendo durante 30 min, con temperatura interna de 75-100°C y se agitó a intervalos de 5 min, posteriormente se enfrió y se ajustó el pH a 7.5, se agregaron 5 mg de proteasa (TDF100A, Sigma-Aldrich) y se incubó por 30 min a 60 °C con agitación continua. Nuevamente se enfrió a temperatura ambiente, se ajustó el pH entre 4.0-4.6 y se le adicionaron 0.3 mL de amiloglucosidasa (TDF100A, Sigma-Aldrich), repitiendo el proceso de incubación durante 30 min a 60 °C con agitación continua. Una vez finalizada las incubaciones indicadas, el residuo se enfrió y se filtró en papel Whatman No. 1, colocándolo en una estufa (Isotemp Oven marca Fisher Scientific) a 40 °C durante toda la noche, una vez que se obtuvo un peso constante en la muestra, se transfirió a un desecador y se pesó (AOAC, 1990).

Fibra dietética insoluble: Al filtrado y el agua de lavado obtenidos en la sección anterior, se adicionó un volumen de 298 mL de alcohol etílico al 95 % a 60 °C, mismo que se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente, para así poder determinar el porcentaje de fibra dietética insoluble. El residuo obtenido después de la filtración, se lavo dos veces con porciones de 15 mL de etanol al 78 %, dos veces más con 15 mL de etanol al 95 % y por último, en dos ocasiones con 15 mL de acetona. El residuo una vez seco, se pesó (AOAC, 1990) y se determino la cantidad de fibra dietética insoluble.

Capacidad de absorción de glucosa: Se colocó 1 g de cada una de las muestras en diferentes concentraciones de soluciones de glucosa (50, 100 y 200 $\mu\text{mol/L}$), éstas se incubaron en un baño María a 37 °C por 6 h en agitación continúa. Después se tomó una alícuota de la solución y se centrifugo en una centrifuga Centra GP8R marca IEC a 3500 X g por 15 min. El contenido de glucosa en el sobrenadante se midió usando un Kit de cuantificación de glucosa (GAGO20 Kit de Glucosa, Sigma-Aldrich) (Ou *et al.*, 2001; Chau *et al.*, 2003).

Índice de Retardación de Diálisis de Glucosa (GDRI): Se colocó en una membrana de diálisis 1 g de muestra con 25 mL de solución de glucosa (glucosa 6-fosfato, Sigma) a una concentración de 50 $\mu\text{mol/L}$, después se dializó contra 200 mL de agua destilada a 37 °C y se midió a diferentes tiempos (20, 30, 60, 120, y 180 min) el contenido de glucosa en el dializado, usando un kit de cuantificación de glucosa, mediante la siguiente ecuación se calculó el valor del GDRI:



$$\text{GDRI} = \frac{(100 - \text{contenido de glucosa con adición de fibra})}{\text{Contenido de glucosa en el control}} \times 100$$

Inhibición de la enzima α -amilasa: Para la realización de esta técnica se hizo una separación de los sólidos insolubles en alcohol (AIS) y los sólidos insolubles en agua (WIS) de acuerdo al método reportado por Chau y Huang (2003), AIS y WIS (por sus siglas en inglés) fueron separados de las tres diferentes harinas bajo estudio. Para obtener AIS se pesó una muestra de la harina (2 g) y se homogenizó en 40 mL de etanol al 85% en ebullición, empleando un homogenizador de laboratorio a 2500 rpm por 1 min se obtuvo una suspensión, ésta se mantuvo a 80 °C por 40 min, se filtró y lavó dos veces con etanol al 70 %, posteriormente se secó con un secador a vacío. Para realizar la extracción de WIS se puso agua destilada y se pesó 2 g de cada una de las tres harinas, la muestra se homogenizó de la misma manera que en la etapa anterior con la excepción de que en esta prueba se usaron 20 mL de agua fría para cada muestra, se filtró, se lavó con agua destilada e igualmente, se secó empleando un secador a vacío. Una vez obtenidas ambas fracciones, se preparó una solución de almidón, mezclando 10 g de almidón de papa con 200 mL de 0.05 M de buffer fosfato (pH 6.5), esta suspensión se calentó por 30 min a 65 °C, y se aforo a un volumen final de 250 mL. Una vez obtenidas las fracciones AIS y WIS y la suspensión de almidón gelatinizado, se peso por separado 1 g de muestra y de sus respectivas fracciones (AIS y WIS) con 4 mg de α -amilasa (Cat No. 100447, ICN Biomedicals) y 40 mL de la solución de almidón, se colocaron en baño María a 37 °C por 60 min, transcurrido este tiempo se adicionaron 80 mL de NaOH 0.1 M y se centrifugó la mezcla a 3500 x g por 15 min. Por otro lado, del sobrenadante se determinó el contenido de maltosa mediante colorimetría en espectrofotómetro con longitud de onda de 540 nm, usando 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Chau *et al*, 1998), de este modo. La actividad de inhibición de α -amilasa (%) fue definida como el porcentaje de decremento en el rango de producción de la maltosa comparado con el control (Chau, 1998; Chau *et al.*, 2003).

Resultados y Discusión.

Los resultados obtenidos muestran que las tres harinas de bagazo de naranja deshidratado tienen un elevado porcentaje de fibra soluble (tabla 1), correspondiendo el porcentaje más alto a fibra residual y el menor a fibra tamiz; mientras que la fibra total presenta un porcentaje



IX CONGRESO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS y V FORO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



intermedio. La fibra residual presentó el menor porcentaje de fibra insoluble, siendo más elevada para la fibra total y mostrando un valor intermedio en la fibra tamiz. Estos resultados se presentan contradictorios a lo publicado por Chau *et al.* (2003) y Chau y Huang (2003), pues estos investigadores reportaron que el bagazo de la naranja que ellos estudiaron es rico en fibra dietética insoluble, cabe mencionar que la variedad de naranja empleada en el trabajo de estos investigadores fue diferente a la utilizada en este estudio. No existen reportes previos donde se analice el porcentaje de estos componentes de la fibra en función del tamaño de partícula de la harina de bagazo de naranja.

En la tabla 2 se presentan los resultados de la capacidad de absorción de glucosa, en esta tabla se observa que la fibra tamiz y fibra residual presentaron las mejores características de retención de glucosa en solución, mostrando las menores concentraciones de glucosa, por debajo de la inicial, este resultado fue más evidente en la fibra tamiz, este resultado puede deberse a posibles diferencias en la viscosidad por efecto del tamaño de partícula. De acuerdo a los datos reportados por Chau *et al.* (2003), en estudios realizados con fibra insoluble proveniente de naranja, estas presentaron capacidades de absorción de glucosa menores que la celulosa, los resultados encontrados por estos investigadores no pueden ser comparados con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que la composición de las fracciones de fibra soluble e insoluble presentes en las naranjas utilizadas en ambos estudios no son comparables.

En la tabla 3 se muestran los resultados del índice de retardación de diálisis de la glucosa, de estos se puede apreciar que las tres harinas de bagazo de naranja disminuyeron la difusión de la glucosa durante los primeros 30 minutos y que la fibra residual la disminuyó incluso hasta los 60 min, presentando las tres harinas valores menores que la goma arábica a los 120 min. En este apartado se puede observar que la celulosa presenta las mejores características para inhibir la difusión de la glucosa al medio, esto debido a que este compuesto es principalmente una fibra insoluble, motivo por el cual inhibe de una mejor manera la difusión de la glucosa al medio en comparación con todas las otras fibras probadas y también explica porque las fibras de naranja presentan mejores características para inhibir la difusión de la glucosa que la goma arábica.



Los resultados de la inhibición de la acción de la enzima α -amilasa (tabla 4) revelaron que la fibra tamiz, presenta menor porcentaje de inhibición en la actividad de esta enzima comparada con fibra total y en mayor proporción con fibra residual, la cual presenta mayor actividad en la inhibición de dicha enzima. Chau et al (2003), reportaron que la inhibición de la actividad de la enzima α -amilasa estaba en función del origen y el tipo de fibra, lo cual puede explicar porque la fibra residual presento la mayor inhibición de esta enzima, ya que durante el proceso de molienda y tamizado se separaron diferentes fracciones y tipos de fibra soluble e insoluble. Concluyendo y tomando en cuenta lo reportado por Ou *et al.* (2001), que concluyo que la FD retarda la acción de la enzima α -amilasa a través de que encapsula al almidón y a la enzima.

TABLA 1: Contenido de fibra soluble e insoluble ^a.

Muestra	Soluble	Insoluble
Fibra total	59.84 % \pm 0.23 ^(Y)	3.12 % \pm 0.90 ^(Y)
Fibra tamiz	59.75 % \pm 1.30 ^(Y)	3.03 % \pm 0.30 ^(Y)
Fibra residual	64.53 % \pm 2.62 ^(W)	2.63 % \pm 1.37 ^(Y)

Tabla 2: Capacidad de Absorción de la Glucosa^a de Varias Fibras a Diferentes Concentraciones de Glucosa.

Muestra de Fibra	Absorción de Glucosa μ mol/L		
	50 mmol/L	100 mmol/L	200 mmol/L
Arábica	54.93 \pm 9.21 ^(Y)	74.42 \pm 0.82 ^(W)	152.47 \pm 2.77 ^(W)
Celulosa ^b	46.86 \pm 0.56 ^(Y)	94.23 \pm 3.30 ^(Y)	178.75 \pm 6.01 ^(W)
Fibra total	54.51 \pm 1.83 ^(Y)	90.16 \pm 1.71 ^(W)	205.33 \pm 14.20 ^(Y)
Fibra tamiz	43.58 \pm 0.85 ^(Y)	93.70 \pm 1.74 ^(Y)	173.42 \pm 6.08 ^(W)
Fibra residual	47.62 \pm 2.13 ^(Y)	84.02 \pm 4.19 ^(W)	176.87 \pm 8.01 ^(W)



TABLA 3: Efectos de Varias Fibras en la Difusión e Índice de Retardación de Diálisis de la Glucosa (GDRI).

Muestra de Fibra	Glucosa en Diálisis (Minutos).			
	20	30	60	120
Control	0.84 ± 0.01 ^(Y)	1.15 ± 0.04 ^(Y)	2.01 ± 0.03 ^(Y)	2.53 ± 0.01 ^(Y)
Arábiga	0.71 ± 0.01 ^(W)	1.12 ± 0.03 ^(Y)	1.91 ± 0.01 ^(W)	3.07 ± 0.01 ^(Y)
Celulosa	1.04 ± 0.01 ^(Y)	1.03 ± 0.00 ^(Y)	1.73 ± 0.03 ^(W)	1.94 ± 0.17 ^(W)
Fibra total	0.67 ± 0.04 ^(W)	0.97 ± 0.01 ^(W)	2.14 ± 0.05 ^(Y)	2.41 ± 0.03 ^(W)
Fibra tamiz	0.73 ± 0.01 ^(W)	0.94 ± 0.00 ^(W)	2.06 ± 0.03 ^(Y)	2.84 ± 0.01 ^(Y)
Fibra residual	0.73 ± 0.07 ^(W)	1.14 ± 0.05 ^(Y)	1.90 ± 0.03 ^(W)	2.63 ± 0.05 ^(Y)

Tabla 4: Inhibición de α -amilasa en fibras de harina de bagazo deshidratado de naranja^a

	α -Amilasa	%
Control	2.234±0.013 ^(Y)	
Fibra total	1.766±0.007 ^(W)	19.05
AIS	1.762±0.004 ^(W)	19.21
WIS	1.664±0.002 ^(W)	25.51
Fibra tamiz	1.786±0.002 ^(W)	18.03
AIS	1.719±0.002 ^(W)	21.20
WIS	1.686±0.002 ^(W)	24.51
Fibra residual	1.668±0.003 ^(W)	23.51
AIS	1.766±0.002 ^(W)	19.05
WIS	1.628±0.003 ^(W)	27.11

Conclusiones.

Las harinas del bagazo de naranja deshidratado presentaron altos contenidos de fibra dietética soluble, el cual representa más del 55% y el porcentaje de fibra insoluble es de menor del 3%. Asimismo, las tres harinas tiene características funcionales específicas para controlar la glucosa en sistemas modelo, de esta manera las harinas estudiadas tienen la capacidad de absorber glucosa, retardar la difusión de la glucosa a través de una membrana de diálisis y tienen actividad para inhibir la acción de la enzima α -amilasa.



IX CONGRESO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS y V FORO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Referencias.

- AOAC, 1990.** Oficial Methods Of Análisis of the Association Analytical Chemists. 15th Edition. Edited By Kenneth Helrich. Tomo 2. 1151-1152.
- Chau C. 1998.** Nutritional values of three leguminous seeds and functional properties of their protein and fiber fractions. Ph.d. Dissertation, The Chinese University Of Hong Kong, Hong Kong. 80-85.
- Chau C. y Huang L. 2003.** Comparison of the Chemical composition and physicochemical properties of dietary fibers prepared from the peel of *citrus sinensis* L. Cv. Liucheng. *J Agric. Food Chem.* 51: 2615-2618.
- Chau C., Huang L. y Lee M. 2003.** *In vitro* hypoglycemic effects of diferentes insoluble fiber-rich fractions prepared from the peel of *citrus sinensis* L. cv. Liucheng. *J Agric Food Chem.* 51: 6623-6626.
- Ou S., Kwok K., Li Y. y Fu L. 2001.** *In vitro* study of possible role of dietary fibre in lowering postprandial serum glucosa. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1026-1029.