

Conchas naturales como posibles compuestos contra la acidez estomacal.

Carlos F. Linares*, Milena Chang, Freddy Ocanto

Laboratorio de Catálisis y Metales de Transición, Departamento de Química, Facultad de Ciencias y Tecnología,
Universidad de Carabobo, Valencia, Edo. Carabobo, Venezuela.

Resumen.-

Se recolectaron conchas marinas perteneciente a las especies *Astraea caelata*, *Tivela mactroide* y *Crassostraea rhizophorae* de algunas islas venezolanas y cáscaras de huevo de gallinas de origen doméstico. Estas conchas se lavaron, molieron, secaron y finalmente se tamizaron antes de ser probadas, individualmente, como posibles agentes naturales contra la acidez estomacal. Algunas técnicas de caracterización, tales como difracción de rayos (DRX) y espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), determinaron la presencia de carbonato de calcio en estos residuos. Los resultados de los diferentes ensayos individuales con 25 mL de un jugo gástrico sintético, sugirieron que aproximadamente 40 mg de estos residuos eran suficiente para ajustar el pH del sistema entre 3 y 4, intervalo de pH considerado como ideal para los procesos de digestión. También se determinó que los residuos fueron más efectivos que un compuesto comercial antiácido utilizado como referencia, y adicionalmente, se estudió la interacción concha-pepsina con el fin de observar la actividad enzimática. Los resultados de este estudio indicaron que la actividad enzimática de la pepsina se preservó.

Palabras clave: Antiácidos, Cáscara de huevo, Carbonato de calcio, Conchas marinas, Pepsina.

Natural shells as possible compounds against stomach acid conditions.

Abstract.-

Marine shells from *Astraea caelata*, *Tivela mactroide* and *Crassostraea rhizophorae* species from Venezuela's islands and hen egg shells from domestic origin were washed, crushed, dried and sieved before being tested, individually, as antacid natural product. Several techniques such as: X-ray diffraction (XRD) and Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR) showed the presence of calcium carbonate in these residues. Results of the individual assays with 25 mL of a synthetic gastric juice, suggests that 40 mg of these residues were enough to adjust the pH of the system between 3 and 4 which is considered the ideal pH for the gastric digestion processes. Also, these residues were more active, as possible compounds against antacid, than a commercial compound used as reference. Additionally, the shell-pepsin interaction and the enzymatic activity of pepsin in presence of the shells were determined with the purpose of observe if the enzymatic activity was kept. Results showed that enzymatic activity was kept during the solid-pepsin contact.

Keywords: Antacid, Calcium carbonate, Egg's shell, Marine's shell, Pepsin.

Recibido: Enero 2013

Aceptado: Octubre 2013

1. Introducción.

Venezuela está estratégicamente ubicada en el norte de Suramérica y la explotación de moluscos con concha es apreciable. Dentro de estos moluscos, los más abundantes pertenecen a las especies: *Astraea caelata*, *Tivela mactroide*

* Autor para correspondencia

Correo-e: clinares@uc.edu.ve (Carlos F. Linares)

y *Crassostraea rhizophorae*; la primera especie es un gasterópodo y las otras dos especies son bivalvos.

Por lo general, las conchas procedentes de estos alimentos son descartadas sin un uso posterior.

Por otra parte, el consumo de huevos de gallina constituye una pieza fundamental en la dieta del venezolano, ya sea por su bajo precio o por su aporte proteico; más aún, el mercado de venta de los huevos de gallina se ha incrementado porque los componentes del huevo (clara y yema) se pueden vender de manera separada, para ser utilizados, según los requerimientos de la industria de alimento.

Estos residuos pudiesen ser de gran utilidad tomando en cuenta el alto contenido en carbonato de calcio, el cual es un componente ampliamente utilizado como antiácido.

Un antiácido es una sustancia capaz de incrementar de manera controlada el pH en el estómago [1]. Actualmente, diversos antiácidos son comúnmente utilizados pero algunos de ellos pueden ser tóxicos o mostrar efectos secundarios.

Hoy en día, las investigaciones han llevado al estudio de nuevos posibles antiácidos. En ese sentido, se ha estudiado la modificación de una serie de minerales naturales, tales como: arcillas [2, 3], carbones activados [4, 5] y zeolitas [6, 7], y se ha encontrado que estos compuestos naturales son más efectivos como antiácidos que un compuesto comercial usado como referencia.

En tal sentido, el objetivo de este trabajo fue estudiar la posibilidad de utilizar las conchas marinas de las especies *Astraea caelata*, *Tivela mactroide*, *Crassostraea rhizophorae* y cáscaras de huevo como antiácidos.

2. Metodología.

2.1. Recolección de conchas marinas y de cáscara de huevo.

Las conchas marinas identificadas como: *Astraea caelata*, *Tivela mactroide* y *Crassostraea rhizophorae* fueron colectadas en islas venezolanas del Estado Falcón, específicamente en la región de Chichiriviche y del estado Nueva Esparta (isla de Margarita). Las cáscaras de huevo

son de origen doméstico. Todas las conchas se lavaron previamente con abundante agua destilada, molidas, secadas a temperatura ambiente por una semana y tamizadas a 100 mesh. Los estudios fueron realizados *in vitro*. Asimismo, se utilizó un producto comercial basado en CaCO_3 .

2.2. Caracterización de las conchas.

Las conchas fueron caracterizadas por DRX y FT-IR. Los estudios de DRX se llevaron a cabo en un difractómetro Phillips PW 3442 con una radiación $\text{CuK}\alpha = 1,54060 \text{ \AA}$ en un intervalo de 4 a $80^\circ (2\theta)$, con el fin de identificar la fase cristalina. La presencia de los grupos funcionales y pureza de los sólidos se determinaron por FT-IR; los espectros se grabaron en un espectrómetro Perkin-Elmer 283 en el intervalo de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$. Las muestras se prepararon mezclando los sólidos con KBr con la finalidad de formar una pastilla fina.

2.3. Capacidad antiácida y su interacción con la pepsina.

La capacidad antiácida de estos residuos fue evaluada *in vitro* usando la metodología reportada por Rivera [8] y Linares [6]. Los sólidos fueron ensayados frente a un jugo gástrico sintético (1,6 g pepsina/L de solución de HCl, $\text{pH} \geq 1,5$) tomando una alícuota de 25 mL de este jugo y donde se dispersaron entre 30 a 80 mg de los conchas. Esta dispersión se agitó durante 1h a 37°C a fin de simular los movimientos peristálticos del estómago. La mezcla fue filtrada, y se determinó el pH usando un pH-metro Accumet AB15 con electrodo de vidrio y sensibilidad de $\pm 0,05$ unidades.

La interacción concha-pepsina fue evaluada mediante espectroscopía de UV-visible usando un equipo HP 8452A con arreglo de diodos. Para ello se utilizaron, para cada experimento, 35 mg de las conchas y 70 mg del compuesto comercial mezclados con 25 mL de jugo gástrico sintético capaces de incrementar el pH de la solución entre 3 y 4 unidades. Subsecuentemente, la mezcla fue centrifugada y el sobrenadante fue analizado por UV-visible. Los espectros fueron grabados entre 250 y 300 nm antes y después de poner en contacto los sólidos con el jugo gástrico sintético.

La actividad enzimática fue determinada también *in vitro* usando hemoglobina desnaturalizada. Para ello se mezclaron 35 mg de las conchas y 70 mg del compuesto comercial con la hemoglobina desnaturalizada y la pepsina [9]. Cada 5 min, una alícuota de 1 mL de esta reacción se trató con ácido tricloroacético a fin de detener la actividad enzimática y poder analizar los productos de reacción usando un equipo de UV-visible a una longitud de onda de 280 nm. Todos los reactivos empleados son de grado analítico.

3. Análisis y discusión de resultados.

3.1. Caracterización de las muestras.

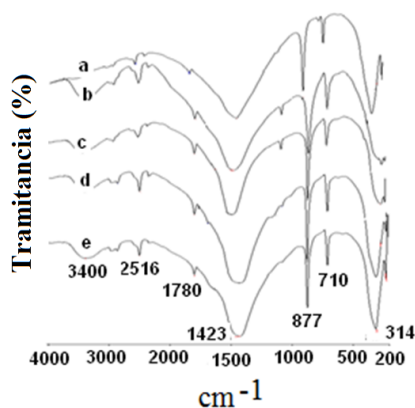


Figura 1: Espectro de FT-IR de: a) CaCO_3 b) *Astraea caelata* c) *Tivela mactroide* d) *Crassostrea rhizophorae* y e) Cáscara de huevo.

La Figura 1 muestra el espectro de FT-IR de las conchas utilizadas. Los espectros señalan, para las muestras b, c, d y e, que el espectro es muy similar a la muestra de CaCO_3 pura (muestra a).

Las bandas ubicadas a 2515-2525, 1420-1482, 859-879 y 708-710 cm^{-1} corresponden a las vibraciones simétricas y asimétricas del ión carbonato [10, 11]. Estas similitudes muestran que el CaCO_3 es el principal componente de estas muestras. Otras bandas ubicadas a 3426-3409 y 1661-1692 cm^{-1} revelan la presencia de moléculas de agua ocluidas en las muestras.

Los patrones de difracción de rayos X permitieron analizar la fase cristalina de las muestras. En la Figura 2 fueron identificados los picos de mayor intensidad de todas las muestras.

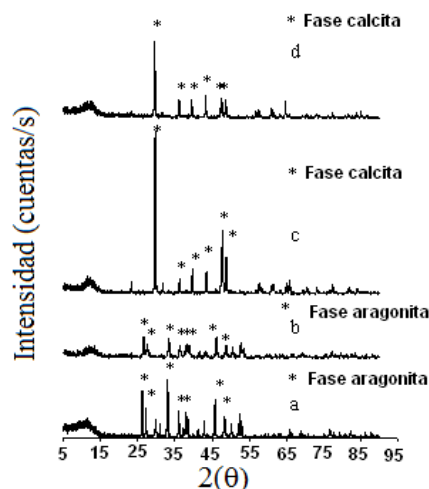


Figura 2: Espectro de DRX: a) *Astraea caelata* b) *Tivela mactroide* c) *Crassostrea rhizophorae* y d) Cáscara de huevo.

Para la cáscara de huevo y la *Crassostrea rhizophorae*, las distancias interplanares de los picos más intensos correspondieron a la fase calcita. Mientras que para la *Astraea caelata* y *Tivela mactroide*, los picos principales fueron identificados como aragonita. La fase calcita es más abundante en la naturaleza que la aragonita, y está presente en moluscos, rocas, concha de huevo y crustáceos. La fase aragonita se encuentra en el medio (ostracum) y partes internas (hipostracum) de las conchas de los moluscos. Las fases determinadas por DRX confirmaron los resultados obtenidos por FT-IR donde los iones carbonatos fueron determinados. Ambos minerales están compuestos por CaCO_3 pero la fase calcita cristaliza en forma romboédrica mientras la aragonita lo hace en forma rómbica.

3.2. Capacidad antiácida de las conchas marinas y cáscara de huevo, y su interacción con la pepsina.

Se determinó la capacidad antiácida de muestras seleccionadas de las conchas marinas y de la cáscara de huevo. La Figura 3 señala la relación entre el pH experimental y la cantidad de masa de las conchas.

La capacidad de neutralización de estos sólidos se relaciona con la cantidad de carbonato contenida en las muestras, el cual reacciona con

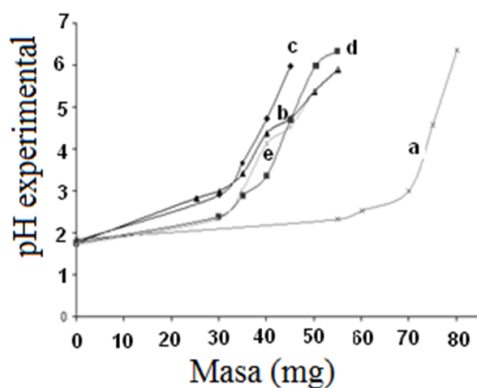


Figura 3: pH experimental versus diferentes cantidades de sólido: a) Producto comercial b) *Astraea caelata* c) *Tivela mactroide* d) *Crassostraea rhizophorae* y e) Cáscara de huevo.

el jugo gástrico sintético (ácido clorhídrico) para neutralizarlo. En general, el comportamiento de estos sólidos es similar: el pH experimental se eleva con el incremento de la masa del sólido.

Se obtuvieron valores de pH entre 3-5 cuando la cantidad de masa de las conchas estuvo alrededor de 40 mg; mientras que fue necesario usar 70 mg para que el compuesto comercial alcanzara los mismos valores de pH, lo cual demuestra que la capacidad antiácida de estas conchas es superior a la del compuesto comercial.

Entre las conchas utilizadas, la *Astraea caelata* mostró la mayor capacidad antiácida (30 mg). La capacidad antiácida se refiere a la cantidad de masa de sólido capaz de reducir la acidez del medio hasta alcanzar un pH entre 3 y 4. Un pH mucho mayor que 4,5 podría provocar el “efecto rebote” el cual está caracterizado por el incremento violento de la acidez del estómago. Por el contrario, un pH menor a 3,0 no es suficiente para controlar el pH del estómago. Por lo tanto, el intervalo de pH ideal debe estar entre 3,0 y 4,5 como se reportó en [7, 12].

Una vez determinada la cantidad de masa capaz de incrementar el pH entre 3-4,5 para neutralizar el jugo gástrico sintético, se decidió estudiar la interacción de estos sólidos con la pepsina. Para llevar a cabo este estudio, se añadieron cantidades de masas de estas conchas capaces de elevar el pH entre 3-4 del jugo gástrico que contenía la pepsina. Después de agitar por una hora a 37°C, el

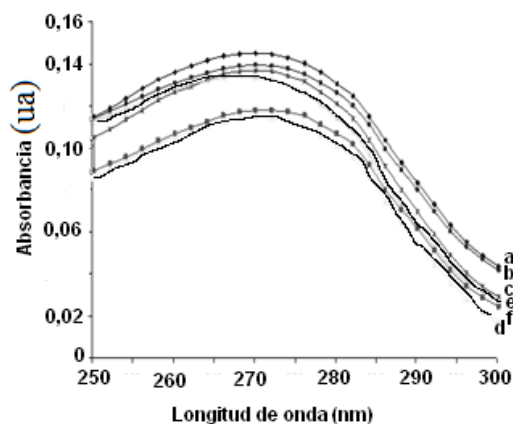


Figura 4: Espectro UV-visible de la pepsina antes y después de interacción: a) Pepsina b) Compuesto comercial c) *Astraea caelata* d) *Tivela mactroide* e) *Crassostraea rhizophorae* y f) Cáscara de huevo.

líquido centrifugado fue analizado por UV-visible. Los resultados son mostrados en la Figura 4.

Para la pepsina disuelta en HCl sin interacción con ningún sólido, se puede observar un valor máximo de absorbancia entre 270-280 nm el cual está típicamente asociado a la enzima. Para el resto de las soluciones donde existió el contacto con las conchas y la pepsina, los espectros son muy similares al observado para la pepsina sin interacción con sólido alguno. Esto podría señalar que no ocurrió reacción química entre la pepsina y las conchas marinas o la cáscara de huevo. Sin embargo, hay que hacer notar un pequeño descenso en la absorbancia del máximo ubicado entre los 270-280 nm para *Crassostraea rhizophorae* y *Tivela mactroide*. Este ligero descenso podría estar asociado a la adsorción de la pepsina sobre la superficie de las conchas [6, 8].

Aunque los resultados demuestran una aparente ausencia de interacción entre las conchas y la pepsina, esto no descarta un efecto sobre la actividad de la enzima, por lo cual, se realizó un nuevo ensayo a fin de determinar la actividad de la pepsina. Esta fue medida mediante la reacción de proteólisis de una solución de hemoglobina en presencia de la pepsina y de las conchas utilizadas desnaturalizada a diferentes tiempos. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 5.

La actividad enzimática (expresada como absor-

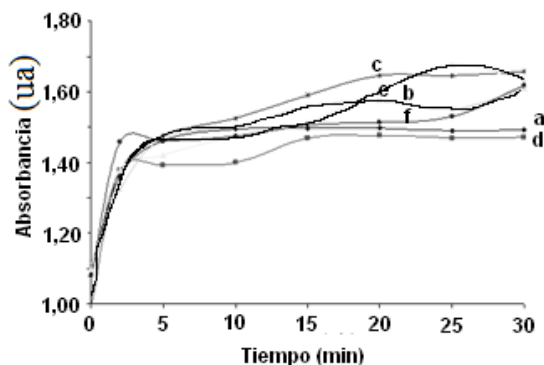


Figura 5: Actividad enzimática de la reacción de proteólisis de una solución de hemoglobina después del contacto con: a) Pepsina b) Compuesto comercial c) *Astraea caelata* d) *Tivela mactroide* e) *Crassostraea rhizophorae* y f) cáscara de huevo.

bancia) en presencia de los sólidos estuvo muy cercana a la de la pepsina sin contacto con ningún sólido. Estos resultados señalan que la actividad enzimática de la pepsina no se pierde en presencia de estos sólidos, por lo tanto, la caída en la absorbancia observada en la Figura 4, es producto de la adsorción de la pepsina sobre la superficie de las conchas, y no producto de alguna reacción química que desnaturalice.

Estos resultados señalan que las conchas marinas estudiadas y la cáscara de huevo podrían ser usadas como agentes antiácidos efectivos para controlar la hiperacidez estomacal.

4. Conclusiones.

Los espectros de DRX y FT-IR confirmaron la presencia en conchas marinas y cáscaras de huevo de carbonato de calcio, componente efectivo para controlar el pH del estómago. Las pruebas de neutralización de acidez indicaron que estas conchas naturales fueron más efectivas que un compuesto comercial analizado. La actividad enzimática de la pepsina se preservó cuando los sólidos ensayados estuvieron en contacto con la pepsina. Finalmente, estas conchas marinas y la cáscara de huevo podrían ser efectivamente usadas como antiácidos

Agradecimientos.

Los autores agradecen al FONACIT F-2001000774, FONACIT. Lab. 2001001442 y al CDCH-UC por soporte financiero.

Referencias

- [1] Beers M. R. and Berkow R. (1999). The Merk Manual. 10th Ed, Madrid.
- [2] Linares C. F., Afonso L. and Brussini M. R. (2004). "Modified Venezuelan kaolin as possible antacid drug". J. App. Scien, Vol. 4, No. 3, pp. 472-476.
- [3] Linares C. F. and Torres A. (2005). "Modified bentonite with Na₂CO₃ as possible antacid medicament". Stud. Surf. Sci. Catal. Vol. 158, pp. 2073-2079.
- [4] Linares C. F., Palencia A., Rodríguez K. and Goldwasser M. R. (2005). "Study of activated carbon modified with sodium carbonate as a possible antacid drug". Mater. Letters. Vol. 60, pp. 439-441.
- [5] Linares C. F., Quintero J., Martínez L., and González G. (2006). "A new antacid drug from activated carbon modified with calcium carbonate". Mater. Letters. Vol. 61, pp. 2362-2364.
- [6] Linares C. F., Sánchez S., Urbina de Navarro C., Rodríguez K. and Goldwasser M. R. (2005). "A novel method for the synthesis of cancrinite-type zeolites". Micro. Meso. Mater. Vol. 77, PP. 215-221.
- [7] Ocampo F., Salas N, Urbina de Navarro C., and Linares C. F. (2008). "Study of the antacid properties of carbonated disordered cancrinite and its intermediate phase". Stud. Surf. Sci. Catal. Vol. 174, pp. 897-905.
- [8] Rivera A., Rodríguez-Fuentes G., and Altshuler E. (1998). "Characterization and neutralizing properties of a natural zeolite/Na₂CO₃ composite material". Micro. Meso. Mater. Vol. 24, pp. 51-58.
- [9] Anso M. L., and Mirsky A. E. (1931). "The reversibility of protein coagulation". J. Phys. Chem. Vol. 35, pp. 185-193.
- [10] Silverstein R., Webster F., and Kiemlees D. (2005). "Spectrometric identification of organic compounds". 7th Ed. United America State.
- [11] Udomkan N., and Limsuwan P. (2008). "Temperature effects on freshwater snail shells: Pomacea canaliculata Lamarck as investigated by XRD, EDX, SEM and FT-IR techniques". Mater. Scie. Engi. C. Vol. 28, pp. 316-319.
- [12] Fordtran J. S., Morawski S. and Trichardson C. (1973). "In vivo and in vitro evaluation of liquids antacids" New. Engl. J. Med. Vol. 288, pp. 923-928.