

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Organo Oficial de la
Sociedad Latinoamericana de Nutrición

VOL 52

JUNIO 2002

Nº 2

Contenido

ARTICULOS GENERALES

Creatina: o suplemento nutricional para a atividade física – Conceitos atuais
Renata Rebello Mendes e Julio Tirapegui 117

TRABAJOS DE INVESTIGACION

Nutrición Humana

Adiposidad y patrón de grasa en jóvenes venezolanos por estrato social
Maritza Landaeta- Jiménez, Betty M. Pérez, Ynay Escalante 128

Nutrición Experimental

**Escalas de satisfacción alimentaria-nutricional para representantes y madres cuidadoras de niños
atendidos en multihogares de cuidado diario**
Jennifer Bernal, Paulina Lorenzana 137

Bioquímica Nutricional

**Modificaciones de las lipoproteínas del plasma después del uso dietético de la oleína de palma en
adultos sanos**
Virgilio Bosch, Ada Aular, José Medina, Neptalí Ortiz, Rafael Apitz 145

Bioquímica de Alimentos

**Efecto de la adición de una pectinasa y una celulasa sobre la digestibilidad *in vitro* del frijol común
(*Phaseolus vulgaris* L.)**
Floribeth Viquez Rodríguez, Ana Ruth Bonilla Leiva 151

Microbiología de Alimentos	
<i>Clostridium perfringens</i> en carnes crudas y cocidas y su relación con el ambiente en Costa Rica	
Evelyn Rodríguez, María del Mar Gamboa y Pablo Vargas	155
Purificación y caracterización de proteasas de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y sus efectos sobre las proteínas de la leche	
Marcia Costa L., M. Francisca Gómez S., Luz H. Molina C., Ricardo Simpson R. y Alejandro Romero M.	160
Ciencias de Alimentos	
Distribución de la proteína en fracciones físicas de la molienda y tamizado del grano de amaranto	
María Ester Búcaro Segura y Ricardo Bressani	167
Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México	
Patricia Pérez Herrera, Gilberto Esquivel Esquivel, Rigoberto Rosales Serna, Acosta-Gallegos Jorge A.	172
Estabilidad de antocianinas en jugos pasteurizados de mora (<i>Rubus glaucus</i> Benth)	
Mario José Moreno-Alvarez, Alfredo Vilorio Matos, Eliezer López, Douglas Belén C.	181
Tecnología de Alimentos	
Efecto del escaldado y recubrimiento higroscópico sobre la calidad de zanahorias (<i>Daucus carota</i> var. <i>Chantenay</i>) pre-cortadas durante el almacenamiento	
Edgar Uquiche Carrasco, Luis Cisneros-Zevallos	187
Aminoácidos esenciales y no esenciales de harinas de cereales infantiles en distintas fases de procesado industrial y su relación con índices químicos de la calidad proteica	
Darío Pérez Conesa, Gaspar Ros Berruezo, María Jesús Periago Castón	193
LatinFoods. Composición de Alimentos	
Cholesterol and fatty acids profile of Brazilian commercial chicken giblets	
Nádia Rosa Pereira, Edvani Curti Muniz, Makoto Matsushita & Nilson Evelázio de Souza	203
Caracterização da fração lipídica de amostras comerciais de camarão-rosa	
Andréa Figueiredo Procópio de Moura, Rosângela Pavan Torres, Jorge Mancini-Filho, Alfredo Tenuta Filho	207
INFORMACION PARA LOS AUTORES	212

FUNDACION BENGOA
para la Alimentación y Nutrición
CENTRO DE DOCUMENTACION

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the
Latin American Society of Nutrition

VOL 52

JUNE 2002

Nº 2

Contents

Pages

GENERAL ARTICLES

- Creatine: the nutritional supplement for exercise – current concepts**
Renata Rebello Mendes and Julio Tirapegui 117

RESEARCH PAPERS

Human Nutrition

- Fatness and fat distribution by social stratum in Venezuelan youths**
Maritza Landaeta- Jiménez, Betty M. Pérez, Ynay Escalante 128

Experimental Nutrition

- Scales to measure parents' and caretakers' satisfaction with the food and nutrition component of Child-care Centers**
Jennifer Bernal, Paulina Lorenzana 137

Nutritional Biochemistry

- Modifications of plasma lipoproteins after use of palm olein in the diet of a group healthy adults**
Virgilio Bosch, Ada Aular, José Medina, Neptalí Ortiz, Rafael Apitz 145

Food Biochemistry

- Effect of pectinase and cellulase addition on *in vitro* digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris*)**
Floribeth Viquez Rodríguez, Ana Ruth Bonilla Leiva 151

Food Microbiology

- Clostridium perfringens* in raw and cooked meats and its relation with the environment in Costa Rica**
Evelyn Rodríguez, María del Mar Gamboa y Pablo Vargas 155

Purification and characterization of proteases from *Pseudomonas fluorescens* and their effects on milk proteins

- Marcia Costa L., M. Francisca Gómez S., Luz H. Molina C., Ricardo Simpson R. y Alejandro Romero M. 160

Food Science

Protein fraction distribution in milling and screened physical fractions of Grain amaranth

- María Ester Búcaro Segura and Ricardo Bressani 167

Physical, culinary and nutritional characterization in dry bean from the semiarid highlands of Mexico

- Patricia Pérez Herrera, Gilberto Esquivel Esquivel, Rigoberto Rosales Serna, Acosta-Gallegos Jorge A. 172

Stability of anthocyanins in pasteurized juice of blackberry (*Rubus glaucus* Benth)

- Mario José Moreno-Alvarez, Alfredo Viloria Matos, Eliezer López, Douglas Belén C. 181

Food Technology

Effect of blanching and hygroscopic coating on quality of fresh-cut carrots (*Daucus carota* var. *c hantenay*) during storage

- Edgar Uquiche Carrasco, Luis Cisneros-Zevallos 187

Essential and non-essential amino acid content of infant cereals in different stages of industrial processing and its relationship with chemical scores of protein quality

- Darío Pérez Conesa, Gaspar Ros Berruezo, María Jesús Periago Castón 193

LatinFoods. Food Composition

Cholesterol and fatty acids profile of Brazilian commercial chicken giblets

- Nádia Rosa Pereira, Edvani Curti Muniz, Makoto Matsushita & Nilson Evelázio de Souza 203

Characterization of the lipid portion of pink shrimp commercial samples

- Andréa Figueiredo Procópio de Moura, Rosângela Pavan Torres, Jorge Mancini-Filho, Alfredo Tenuta Filho 207

- INFORMATION FOR AUTHORS** 212

Creatina: o suplemento nutricional para a atividade física – Conceitos atuais

Renata Rebello Mendes e Julio Tirapegui

Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental - Laboratório de Nutrição - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo. SP. Brasil

RESUMO. A creatina, um composto naturalmente encontrado em alimentos de origem animal, tem sido considerada um suplemento nutricional efetivo na otimização do desempenho de atividades físicas. Podendo também ser sintetizada no fígado, rins e pâncreas, a creatina é estocada no músculo esquelético, onde pode se manter na forma livre (40%) ou fosforilada (60%). A creatina fosforilada exerce importante papel na contração muscular, pois se comporta como importante reservatório de energia, utilizado em atividades de curta duração e alta intensidade. São encontrados estoques de aproximadamente 120 g de creatina em um homem de 70 kg, sendo que 95% se encontram no músculo esquelético. Apesar da função energética da creatina na atividade física ser conhecida há décadas, apenas recentemente tem-se dispensado atenção aos possíveis efeitos ergogênicos da suplementação oral desse composto. Essa suplementação parece aumentar os estoques musculares de creatina. Muitos, mas não todos, os estudos disponíveis sugerem que a suplementação de creatina otimizará o desempenho de atividades de curta duração e alta intensidade, particularmente em exercícios intermitentes com limitados intervalos para repouso. A suplementação aguda de creatina parece provocar aumento de massa magra, porém, esse aumento parece ser conseqüente de um maior acúmulo de água corpórea. A ingestão crônica de suplementos de creatina, em associação com o treinamento de força, poderia aumentar a massa muscular, porém, ainda são necessários mais estudos para confirmar essa hipótese. A ingestão de doses elevadas de creatina por períodos de até 8 semanas, bem como a ingestão de baixas doses por até 5 anos tem sido considerada saudável, não apresentando efeitos colaterais indesejáveis. A decisão de se utilizar a suplementação de creatina como um método de se otimizar o desempenho esportivo deve ser tomada com ponderação, de acordo com a consciência e necessidade de cada indivíduo.

Palavras chaves: Creatina, suplementação, exercício, nutrição.

SUMMARY. Creatine: the nutritional supplement for exercise – current concepts. Creatine, a natural nutrient found in animal foods, is alleged to be an effective nutritional ergogenic aid to enhance sport or exercise performance. It may be formed in kidney and liver from arginine and glycine. Creatine may be delivered to the muscle, where it may combine readily with phosphate to form creatine phosphate, a high-energy phosphagen in the ATP-CP system, and is stored. The ATP-CP energy system is important for rapid energy production, such as in speed and power events. Approximately 120 g of creatine is found in a 70 kg male, 95% in the skeletal muscle. Total creatine exists in muscle as both free creatine (40%) and phosphocreatine (60%). It is only recently that a concerted effort has been undertaken to investigate its potential ergogenic effect relative to sport or exercise performance. It does appear that oral creatine monohydrate may increase muscle total creatine, including both free and phosphocreatine. Many, but not all studies suggest that creatine supplementation may enhance performance in high intensity, short-term exercise task that are dependent primarily on the ATP-CP energy system, particularly on laboratory test involving repeated exercise bouts with limited recovery time between repetitions. Short-term creatine supplementation appears to increase body mass, although the initial increase is most likely water associated with the osmotic effect of increased intramuscular total creatine. Chronic creatine supplementation in conjunction with physical training involving resistance exercise may increase muscle mass. However, confirmatory research data are needed. Creatine supplementation up to 8 weeks, with high doses, has not been associated with major health risks; with low doses, it was demonstrated that in 5 years period supplementation, there are no adverse effects. The decision to use creatine as a mean to enhance sport performance is left to the description to the individual athlete.

Key words: Creatine, supplementation, exercise, nutrition.

INTRODUÇÃO

No início da era esportiva, a vantagem obtida pelos atletas de ponta era considerada uma barreira intransponível. Atualmente, a distância entre atletas de elite tem sido tão mínima, que um pequeno aperfeiçoamento na performance pode resultar num grande salto na classificação geral. Este

fato tem induzido atletas, técnicos e cientistas a buscar diferentes métodos de se otimizar o desempenho, complementando o efeito do treinamento. Tais métodos, também conhecidos como *ergogenic aids*, podem ser classificados em diversas categorias, dentre elas, a suplementação nutricional (1-3).

Dados recentemente publicados sugerem que o uso destes

INTRODUÇÃO

No início da era esportiva, a vantagem obtida pelos atletas de ponta era considerada uma barreira intransponível. Atualmente, a distância entre atletas de elite tem sido tão mínima, que um pequeno aperfeiçoamento na performance pode resultar num grande salto na classificação geral. Este fato tem induzido atletas, técnicos e cientistas a buscar diferentes métodos de se otimizar o desempenho, complementando o efeito do treinamento. Tais métodos, também conhecidos como *ergogenic aids*, podem ser classificados em diversas categorias, dentre elas, a suplementação nutricional (1-3).

Dados recentemente publicados sugerem que o uso destes suplementos chega a atingir 46% dos atletas competitivos (4). No início surgiram compostos como o pólen de abelhas, a geléia real, a colina, sendo seguidos pelos carboidratos, os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), e atualmente, a creatina (1,5-7).

Segundo Maughan(4), nos últimos sete anos o estudo da fisiologia do exercício tem dispensado considerável atenção aos efeitos da suplementação de creatina sobre a performance esportiva. Conseqüentemente, esse tipo de suplementação tem despertado particular atenção entre os principais órgãos da imprensa mundial, tornando-se cada vez mais popular (8). Já no ano de 1992, nas Olimpíadas de Barcelona, foram coletados inúmeros depoimentos informais entre os atletas, onde foi detectado o uso de creatina por diversos deles, inclusive pelo vencedor da prova de 100 metros rasos, Lindford Christie, e pela campeã dos 400 metros com barreiras, Sally Gunnell.

Um pesquisador da “Pennsylvania State University” estimou que 80% dos atletas participantes dos Jogos Olímpicos de Atlanta, realizados em 1996, utilizaram a creatina com finalidade ergogênica (9).

A justificativa para o freqüente consumo de creatina tem sido a evidência de que a disponibilidade desse composto seja uma das principais limitações para o desempenho muscular durante atividades de curta duração e alta intensidade, pois sua depleção resulta na incapacidade de se ressintetizar ATP nas quantidades necessárias (10-12).

De acordo com essa justificativa, inúmeros estudos têm demonstrado que a suplementação de creatina é capaz de otimizar o desempenho esportivo e retardar o início da sensação de fadiga em exercícios de alta intensidade e curta duração. Porém, tais estudos vêm sendo realizados com indivíduos não treinados ou moderadamente treinados. Em contrapartida, os poucos estudos realizados com atletas altamente treinados têm apresentado resultados controversos; a grande maioria apresenta dificuldades em demonstrar melhoras significativas no desempenho em decorrência desse tipo de suplementação (13).

A prática da “sobrecarga” de creatina em atletas de elite durante períodos de treinamento intenso, com a finalidade de se aumentar a capacidade de realização de exercícios repetitivos de alta intensidade e curta duração nas sessões de treinamento, ou durante competições em modalidades esportivas em que se realiza esforços repetitivos pode ser interessante, porém, é apenas uma hipótese a ser confirmada cientificamente (13).

Diante de tais informações acredita-se que a ação da suplementação de creatina possa tomar diferentes proporções de acordo com o tipo de população à que se destina, e que a realização de estudos envolvendo indivíduos treinados deva ser estimulada.

Um efeito secundário da suplementação de creatina vem sendo observado em grande parte dos estudos disponíveis na literatura. Trata-se do ganho de massa corpórea, determinado por um aumento de massa magra (8). Alguns estudos sugerem que esse aumento de massa magra se deva a um ganho de massa muscular (14); em contrapartida, diversos estudos têm demonstrado que o aumento de massa magra é uma conseqüência de um acúmulo hídrico no meio intramuscular, conseqüente do alto poder osmótico da creatina (15). Tais divergências geram incertezas sobre a real causa do ganho de massa magra observado entre indivíduos submetidos à suplementação de creatina, justificando a importância da realização de estudos que avaliem mais especificamente os efeitos deste tipo de suplementação sobre a composição corporal.

Histórico

A creatina foi identificada pelo cientista francês Michel Chevreu, em 1835, quando este relatou ter encontrado um novo constituinte orgânico nas carnes. Este constituinte foi então denominado creatina. Devido a problemas técnicos, apenas em 1847, outro cientista, Justus Liebig, foi capaz de confirmar a presença de creatina como um constituinte regular das carnes. Liebig também observou que a carne de raposas selvagens que sobreviviam da caça continha 10 vezes mais creatina em comparação às raposas em cativeiro, concluindo que o *trabalho muscular resultaria* em acúmulo dessa substância. Na mesma época, os pesquisadores Heitz e Pettenkoffer descobriram uma nova substância presente na urina, mais tarde identificada por Liebig como creatinina, um subproduto da creatina (16).

No início do século 20, as pesquisas sobre creatina começaram a ganhar espaço. Estudos relatavam que nem toda a creatina ingerida era encontrada na urina, indicando que o organismo armazenava uma parte. A partir dessa constatação, novas descobertas foram realizadas, tais como a influência da ingestão de creatina sobre seu conteúdo muscular, a concentração total de creatina em seres humanos, e até a existências de formas diferenciadas da creatina, como

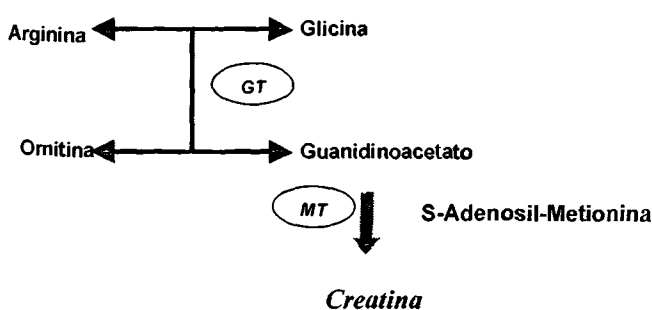
creatina livre e creatina fosforilada.

Embora o envolvimento da creatina no metabolismo muscular não seja uma descoberta recente, seu potencial ergogênico, via suplementação, tem sido um dos mais atuais enfoques das pesquisas sobre *ergogenics aids* (16). Através da reintrodução das técnicas de biópsia e da invenção de técnicas de ressonância magnética nuclear, pesquisadores têm sido capazes de estudar a “quebra” e a ressíntese de compostos como a adenosina trifosfato (ATP) e a fosfocreatina (CP) no músculo esquelético, bem como determinar a função da fosfocreatina neste processo. Desta forma, intensifica-se cada vez mais a contribuição dos estudos para a compreensão do quebra-cabeça que é a regulação do metabolismo muscular (16).

Metabolismo da creatina

A síntese de creatina é realizada no fígado, rins e pâncreas, tendo como precursores três aminoácidos distintos: arginina, glicina e metionina. Esse processo de síntese tem início a partir da arginina, da seguinte maneira: o grupo amino da arginina é transferido para glicina, formando guanidinoacetato e ornitina, através de uma reação mediada pela enzima glicina transaminase (GT). Em seguida, o guanidinoacetato é metilado pela s-adenosil-metionina, através da ação da enzima guanidinoacetato N-metil transferase (MT), derivando, finalmente, a creatina (8).

FIGURA 1
Síntese de creatina a partir da arginina.
Fonte: Mendes e Tirapegui, (70)



Além da síntese de creatina no organismo, ou seja, da creatina endógena, a alimentação fornece cerca de 1 grama de creatina/dia, principalmente através do consumo de produtos de origem animal, tais como carnes bovinas e peixes (17,18).

TABELA 1
Concentrações de creatina em alimentos considerados fonte

Alimento	Concentração de creatina (g/kg)
Arenque	6,5 – 10,0
Carne suína	5,0
Carne bovina	4,5
Salmão	4,5
Atum	4,0
Bacalhau	4,0

A ingestão de creatina parece exercer uma função no controle de sua síntese, através de um mecanismo de retroalimentação negativa, ou “feed-back” (1).

De acordo com Ontiveros et al, (19), a distribuição corpórea da creatina indica que este composto é transportado dos lugares de síntese até os locais de utilização através da corrente sanguínea. Segundo Clark et al (20), esse transporte é realizado por uma substância específica, conhecida por CreaT.

A concentração celular de creatina é determinada pela habilidade da célula em assimilar o nutriente a partir do plasma, uma vez que não há síntese muscular da mesma. Sabe-se que a captação da creatina circulante na corrente sanguínea pelo músculo é realizada através de um processo altamente específico, sódio-dependente, saturável e de alta afinidade, capaz de transportar a creatina contra um gradiente de concentração. Para cada 2 moléculas de sódio, 1 molécula de creatina é captada pela célula muscular, através da ação da enzima Na⁺-K⁺-ATPase, também conhecida como bomba de sódio-potássio (19).

Estudos recentes vêm demonstrando a existência de diversos fatores capazes de influenciar a captação de creatina pelas células, destacando-se entre eles o limite intramuscular de armazenamento de creatina e a insulinemia (21,19,22).

Acredita-se que o músculo humano apresente um limite máximo de acúmulo de creatina entre 150 e 160 mmol/kg de músculo seco (19,10). Esse fato sugere que a ingestão crônica de creatina promova uma diminuição da síntese de CreaT, a fim de se evitar um armazenamento excessivo de Cr intramuscular. Desta forma, esta regulação “negativa” da CreaT pode ser interpretada como um indesejável efeito adverso da suplementação prolongada de creatina (19).

Utiliza-se o termo músculo seco como unidade de medida da concentração muscular de creatina devido aos procedimentos empregados para a dosagem neste tecido; ou seja, quando amostras de biópsia muscular são utilizadas para determinar as concentrações de creatina, o músculo usualmente é congelado em nitrogênio líquido, seco e macerado. Então o conteúdo é analisado e expresso creatina

por quilograma de peso seco. Como aproximadamente 75% do músculo são constituídos por água, a concentração limite de creatina no músculo úmido representaria aproximadamente 37,5-40,0 mmol/kg.

De acordo com o fato de existir um limite de armazenamento muscular de creatina, indivíduos que, por razões diversas, apresentam originalmente concentrações musculares de creatina elevadas respondem menos intensamente à suplementação de creatina, quando comparados a indivíduos com níveis normais de creatina (2). Isso se deve ao fato de que os indivíduos que apresentam concentrações intramusculares mais elevadas encontram-se mais próximos da chamada concentração limite.

Segundo Feldman (8) e Williams (2), a captação máxima de creatina é dada nos primeiros dias de suplementação com *altas doses*.

Odom et al (22) identificaram uma série de hormônios que influenciam a captação de creatina pelas células musculares. Os autores observaram que as catecolaminas podem estimular a captação de creatina, principalmente através dos β receptores, provavelmente via mecanismo dependente de AMP cíclico. Esses autores também demonstraram que a insulina, em concentrações supra-fisiológicas, e o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina) também podem estimular a captação de creatina.

Ao hipotetizar a influência da insulina sobre a captação celular de creatina, Green et al (21) investigaram os efeitos da ingestão de carboidratos no acúmulo de creatina durante o período de sua suplementação em indivíduos cujos níveis deste composto encontravam-se dentro do normal. A administração de creatina e carboidratos associados resultou em um aumento do transporte de creatina até o músculo, aumentando assim a retenção muscular deste nutriente. Os autores sugerem que a insulina estimule a enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, promovendo o co-transporte de $\text{Na}^+\text{-Cr}$, o que provocaria os resultados observados no estudo. Outros estudos têm apontado resultados semelhantes, contribuindo para a hipótese de que a ingestão de carboidratos pode otimizar a captação muscular de creatina (1).

Recentemente vêm-se sugerindo que a atividade física possa estar indiretamente relacionada com esse mecanismo, considerando-se que uma das conseqüências benéficas do exercício consiste no aumento da sensibilidade à insulina (1).

Filinska (23) comparou o efeito da creatina isoladamente com o efeito desta mesma suplementação associada a estímulos elétricos em ratos, e observou que esta associação teve como resultados um maior acúmulo de creatina muscular, níveis séricos inalterados e menor taxa de síntese hepática.

Assim como existem fatores capazes de otimizar a captação de creatina, possivelmente existam fatores prejudiciais a esse processo. A cafeína tem sido avaliada como um possível inibidor dos efeitos da suplementação de creatina

(24), porém, os mecanismos responsáveis por essa inibição ainda não estão totalmente esclarecidos.

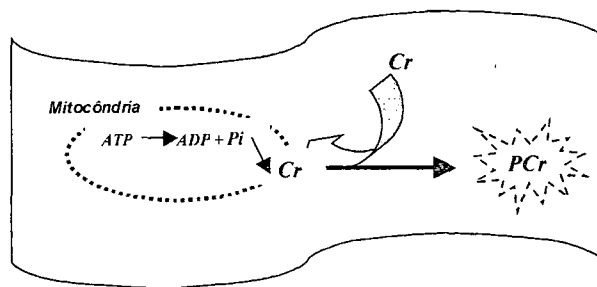
O “turnover” diário da creatina em um homem de 70 kg é de aproximadamente 2 gramas. Sua concentração plasmática apresenta-se entre 40 e 100 $\mu\text{mol/litro}$. Com o início dos procedimentos de biópsia, em 1968, permitiu-se que se obtivessem dados que quantificassem o conteúdo de creatina no músculo. Verificou-se que existe um pool de 120-140 gramas no organismo humano, onde 95% estão estocados no músculo. Além do músculo esquelético, destacam-se como “armazenadores” de creatina o coração, os testículos, a retina e o cérebro (17).

No músculo, parte da creatina captada é fosforilada através de uma reação mediada pela enzima creatinaquinase (CPK). Em repouso, aproximadamente 60% da creatina total presente no músculo encontram-se na forma fosforilada (17,19).

Existe um equilíbrio entre as concentrações de creatina livre e creatina fosfato, obtido através de um processo conhecido como “*phosphorylcreatine shuttle*” (Figura 2). Este processo demonstra a difusão da creatina por três locais: área de utilização, área de transição e área de fosforilação da creatina. No local de utilização, ou seja, na miosina, a molécula de PCr é “quebrada”, através da ação da enzima CPK, liberando energia (íons fosfato) para a ressíntese de ATP. A creatina livre, resultante desta “quebra”, é levada por difusão até a membrana da mitocôndria, onde é novamente fosforilada, utilizando a energia proveniente da quebra de ATP em ADP. Em seguida, a creatina fosforilada retorna, por difusão, ao seu local de utilização, onde novamente será utilizada como fonte de energia para a ressíntese de ATP (16).

FIGURA 2
“*Phosphorylcreatine shuttle*”. Adaptado de Rhodes e Demant, (16)

Célula Muscular



De acordo com Mujika et al (1), as concentrações de Cr e PCr estão diretamente relacionadas com os tipos de fibras musculares, observando-se maiores concentrações nas fibras de contração rápida (IIa e IIf) em relação às fibras de contração lenta (I).

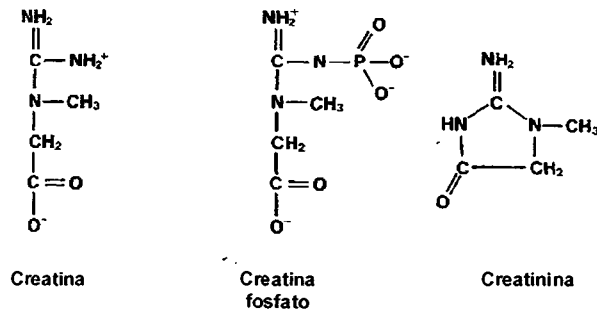
Existem discussões sobre outros fatores possivelmente relacionados com a concentração muscular de creatina, tais como idade, gênero sexual, doenças, treinamento físico e hábitos alimentares. Há evidências de que indivíduos mais jovens, do sexo feminino, saudáveis, treinados e de hábito alimentar vegetariano apresentem concentrações mais elevadas de creatina intramuscular. Porém, tais discussões ainda apresentam-se pouco conclusivas (25-27).

A creatina é excretada em forma de creatinina. No músculo, tanto a creatina livre quanto a creatina fosfato sofrem reações irreversíveis de ciclização e desidratação, formando aproximadamente 2 gramas de creatinina por dia. Em seguida, a creatinina sintetizada é transportada através da água corpórea e rapidamente excretada pelos rins. Segundo Feldman (8), não existe um limiar para a excreção renal de creatinina.

A excreção renal diária de creatinina aproxima-se de 2 gramas, podendo variar de acordo com a massa muscular total de um indivíduo.

FIGURA 3

Estruturas moleculares da creatina, fosfocreatina e creatinina



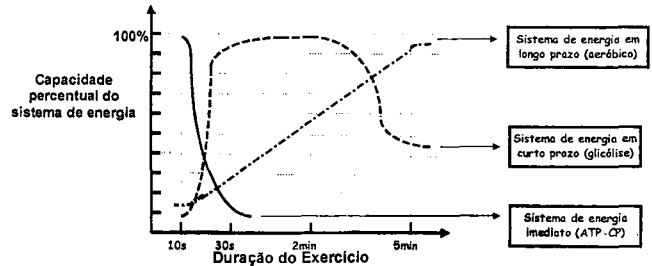
Creatina e atividade física

A energia utilizada durante o exercício físico pode ser obtida através de três sistemas metabólicos, denominados "Sistema ATP-CP", também conhecido como anaeróbio alático, "Sistema do glicogênio-ácido lático", também conhecido como anaeróbio lático, e o "Sistema aeróbio", que pode se subdividir entre glicólise oxidativa e lipólise (28).

Durante uma atividade física, esses três sistemas de energia operam simultaneamente, porém, a contribuição relativa de cada um deles às exigências totais de energia pode diferir de acordo com a duração e a intensidade do exercício (29).

FIGURA 4

Fontes de energia utilizadas nas diferentes etapas do exercício físico*

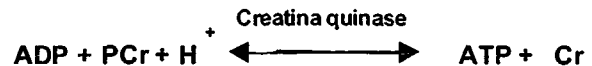


Adaptado de McArdle et al, (29)

A participação da creatina em um dos sistemas metabólicos utilizados como fonte de energia durante o exercício, o sistema ATP-CP, é conhecida há décadas e pode ser resumida da seguinte forma: cerca de 85 gramas de ATP são estocados no organismo, porém, esta concentração não pode diminuir a menos de 30%. Por esse motivo é preciso que o ATP seja constantemente ressintetizado, a fim de fornecer a energia necessária para o trabalho biológico. Uma parte da energia necessária para a sua ressíntese é obtida diretamente e rapidamente através de um outro composto rico em energia; a creatina fosfato. Em termos energéticos, esse composto é similar ao ATP, pois com seu rompimento, quantidades significativas de energia são liberadas, formando creatina livre e fosfato. Portanto, a mobilização de energia proveniente de ATP e CP é fundamental na determinação da habilidade de um indivíduo em gerar e sustentar o exercício de máxima intensidade com duração de até 30 segundos (29,30).

FIGURA 5

Ação da creatina quinase



De acordo com Mujika et al (1), a fosfocreatina intramuscular exerce funções relevantes de regulação do metabolismo energético durante a contração do músculo esquelético e repouso. Ou seja, ela é parcialmente responsável pela síntese de ATP a partir de ADP durante exercícios de alta intensidade e curta duração, via reação mediada pela enzima creatina quinase.

Segundo Clark (20), a creatina fosfato é capaz de agir como um depósito de energia, regulando a concentração de

ATP. Desta forma, mantendo-se os nucleotídeos musculares, otimiza-se a performance durante o exercício e seus intervalos. O mesmo autor relata que a fosfocreatina protege a célula contra prejuízos isquêmicos, e diminui a perda de nucleotídeos através da estabilização da membrana celular.

Atualmente vem sendo proposto que tal composto funcione como uma "lançadeira" para o transporte de fosfatos de alta-energia da mitocôndria para os diferentes locais de utilização, ou seja, dentro das células do músculo esquelético (1).

Recentemente, outras propriedades têm sido atribuídas à creatina, principalmente com relação ao tamponamento de compostos como o ADP e íons hidrogênio. Relata-se que concentrações elevadas de ADP no meio intracelular provocam, indiretamente, efeito inibitório em algumas reações mediadas pelas enzimas denominadas ATPases, o que prejudicaria a contração muscular. Além disso, sabe-se que o aumento dos íons hidrogênio, com conseqüente diminuição do pH muscular, contribui para o início do processo de fadiga. Portanto, aumentar a capacidade de tamponamento da célula através da creatina fosfato poderia atrasar a fadiga (9).

A princípio, o estudo da suplementação de creatina tinha como principal enfoque a necessidade de se aumentar a produção de energia através do sistema ATP-CP (10). Atualmente, sabe-se que a ingestão de creatina pode aumentar significativamente a quantidade de trabalho a ser produzida durante exercícios repetitivos de supramáximo (31).

Acredita-se que os efeitos ergogênicos provocados pela suplementação de creatina sejam atribuídos ao aumento do conteúdo total de creatina intramuscular, acelerando a ressíntese de fosfocreatina no intervalo dos exercícios. Como resultado, a taxa de refosforilação de ADP requerida pode ser mantida durante o exercício, aumentando a capacidade de contração muscular (32).

A disponibilidade de fosfocreatina (PCr) é provavelmente uma das maiores limitações para a performance muscular durante exercícios curtos de alta intensidade, visto que a depleção deste composto resulta na inabilidade de se ressintetizar adenosina trifosfato nas quantidades necessárias (10-12,32,33).

Quando os estoques de PCr são depletados, observa-se uma redução da capacidade de ressíntese de ATP e, conseqüentemente, da produção de energia. Isso leva a crer que um aumento na concentração total de creatina no músculo possa amenizar a depleção de estoques de PCr durante exercícios intensos, limitando também a diminuição da taxa de ressíntese de ATP, através do aumento da taxa de fosforilação do ADP (1,34-36).

Segundo Williams e Branch (10), para que a suplementação de creatina tenha efeito sobre o desempenho esportivo, é preciso que esta seja capaz de aumentar os estoques intramusculares de creatina. Esses estoques aumentados são os grandes responsáveis pela regulação da

produção de ATP durante o exercício físico. Por isso a importância de se conhecer os fatores capazes de otimizar a captação muscular de creatina.

Conforme Smith et al (37), diversos estudos têm demonstrado que a suplementação oral de creatina monohidratada aumenta o estoque muscular desse composto, relacionando este aumento à otimização do desempenho em exercícios intermitentes de alta intensidade.

Acredita-se que o caminho mais rápido para se aumentar a concentração intramuscular de creatina consiste na ingestão de 20 gramas de tal composto por dia, em período de 5 a 8 dias (38).

Com o objetivo de avaliar possíveis alterações da concentração intramuscular de fosfocreatina em conseqüência da suplementação, diversos estudos têm analisado amostras de tecidos musculares obtidas através de técnicas de biópsia. Os resultados destes estudos (15,39-41) geralmente com um protocolo de 5 a 8 dias de suplementação com doses de 20 gramas/dia, têm demonstrado que a suplementação de creatina realmente é um potente meio de se aumentar o conteúdo total de Cr e PCr, chegando a alcançar aumentos de até 50% da concentração total de creatina intramuscular.

Os tipos de exercícios beneficiados pela suplementação de creatina têm sido alvo freqüente de estudos. O artigo de revisão de Williams e Branch (10) traz uma tabulação de resultados obtidos através de 71 estudos publicados entre 1993 e 1997. Todos esses estudos avaliavam o efeito da suplementação de creatina sobre a performance esportiva. De acordo com os dados tabulados, os autores concluíram que os resultados dos diversos estudos apresentavam-se controversos no que diz respeito ao exercício de curta duração e alta intensidade (43 estudos), apontando uma melhora da performance em 53.5% dos casos, e resultados menos satisfatórios nos 46.5% restantes. Nessa tabulação, estudos realizados com testes de atividade aeróbia (sistema oxidativo) demonstraram não haver otimização do desempenho após a suplementação de creatina, e, em alguns casos, apontaram efeitos prejudiciais da suplementação sobre o desempenho dessas atividades. Finalmente, trabalhos realizados especificamente com nadadores (5 publicações) demonstraram não haver melhora do desempenho em função da suplementação de creatina.

Após a revisão feita por Williams e Branch (10), outros estudos sobre a suplementação de creatina e performance esportiva foram publicados, minimizando as incertezas do passado; porém, ainda permanecem muitas controvérsias a serem desvendadas (8).

Diversos estudos realizados com indivíduos não treinados vêm demonstrando que a suplementação de creatina é capaz de otimizar a performance em exercícios de alta intensidade e curta duração (34,41-46).

Em contrapartida, os poucos estudos realizados com atletas treinados têm demonstrado resultados controversos (47-51); a grande maioria apresenta dificuldades em demonstrar melhoras significativas no desempenho em consequência de tal suplementação. Portanto, parece que os efeitos ergogênicos freqüentemente observados em indivíduos não treinados não são encontrados em atletas altamente treinados (1,13,52-55).

Segundo Snow et al (56), alguns dados conflitantes encontrados entre tantos estudos podem ser explicados pelos diferentes incrementos do estoque muscular de creatina, obtidos através da suplementação desse composto. Acredita-se que a melhora da performance esteja diretamente relacionada ao aumento do conteúdo muscular de creatina, porém, apenas poucos estudos têm determinado simultaneamente as alterações na performance esportiva e o incremento do conteúdo de creatina no meio intramuscular após o período de suplementação. Portanto, a realização desse tipo de estudos poderia contribuir significativamente para a interpretação do real efeito da suplementação de creatina sobre o desempenho esportivo.

Creatina e composição corporal

Os efeitos da suplementação de creatina sobre a massa corpórea vêm sendo muito discutidos em diferentes estudos. Freqüentemente menciona-se que a ingestão de creatina, em curto prazo, é acompanhada de um aumento da massa corpórea, principalmente em atletas do sexo masculino, cujo ganho gira em torno de 0,7 a 2,0 kg de peso após 1 a 2 semanas de suplementação com altas doses (20-25 g/d) (8,57-60). Este ganho de peso tem sido justificado através de duas hipóteses; a primeira consiste na retenção hídrica decorrente do alto poder osmótico da creatina; a segunda seria um aumento da taxa de síntese de proteínas contráteis (4).

A primeira hipótese tem sido mais aceita e demonstrada mais freqüentemente por diversos autores. Segundo Febbraio et al, (61) e Hultman et al, (15), recentemente tem sido demonstrado que o tempo para "eliminação" da creatina captada pelo músculo durante o período de suplementação clássica é de no mínimo 28 dias. Este período não é suficiente para induzir significativamente um crescimento de massa muscular, considerando-se que o processo de hipertrofia seja relativamente lento. A excreção de um menor volume urinário pelos indivíduos suplementados com creatina, e a constatação de que um período de apenas 5 a 8 dias de suplementação seria insuficiente para provocar ganhos de massa muscular tão significativos, são fatos que têm auxiliado na tentativa de confirmação da hipótese de retenção hídrica (4).

Em contrapartida, a creatina também vem sendo apontada como um estimulador da biossíntese de proteínas miofibrilares e da captação de aminoácidos pelas proteínas contráteis, haja vista que, ratos induzidos à depleção de creatina sofrem

anormalidades em suas estruturas musculares, como perda de miofilamentos e hipotrofia das fibras tipo II e de massa magra. Porém, outras investigações não têm demonstrado efeito algum da creatina sobre a síntese protéica (62,14).

Acredita-se que a realização de estudos que avaliem mais especificamente a composição corporal de indivíduos suplementados com creatina, através da utilização de metodologias que permitam a diferenciação da massa magra entre massa muscular e água corpórea, possa contribuir fundamentalmente para a interpretação desta controvérsia (70,71,73).

É importante ressaltar ainda que os efeitos da suplementação crônica de creatina sobre a composição corporal podem ser distintos daqueles observados em estudos de suplementação aguda, devido a mecanismos metabólicos diferenciados. Ou seja, sabe-se que uma maior hidratação celular, fenômeno este supostamente consequente de uma suplementação aguda, consiste em um potente estimulador da síntese protéica (63). Portanto, acredita-se que com a manutenção da suplementação de creatina por períodos prolongados, supostamente manter-se-ia uma maior hidratação da célula muscular, que por sua vez poderia atuar como um estímulo de síntese protéica, havendo então um ganho de massa muscular. Porém, esta é uma hipótese a espera de ser confirmada.

Creatina x aspectos de saúde

Uma vez que o uso disseminado da suplementação de creatina entre atletas consiste em um fenômeno relativamente novo, tem surgido interesse quanto aos possíveis riscos à saúde associados a essa suplementação (9).

De acordo com o conhecimento do metabolismo da creatina e com relatos informais (65,66), foram surgindo preocupações com relação a alguns possíveis efeitos adversos, tais como, danos renais e hepáticos, desidratação, aumento de pressão arterial, mal estar gastrointestinal, câibras musculares e lesões musculares severas durante o treinamento. Porém, a avaliação minuciosa das pesquisas científicas realizadas até o presente momento indica que o único efeito colateral reportado por essa suplementação é o ganho de peso (67,8).

Uma vez que o armazenamento de creatina no músculo ocorre essencialmente nos primeiros dias de suplementação, e nos dias subsequentes o excesso de creatina é excretado pela urina, um dos possíveis efeitos adversos mais discutidos no meio científico consiste na suspeita de que a suplementação de creatina poderia provocar um estresse renal. Porém, estudos disponíveis na literatura indicam que o uso agudo ou crônico (até 10 semanas) desse composto, em doses diárias de até 30 gramas não alterara a função renal de indivíduos saudáveis. Adicionalmente, a suplementação diária com doses baixas (1,5 grama) durante até 5 anos também não têm provocado efeitos quaisquer sobre a função renal (68,69).

TABELA 2
Estudos envolvendo suplementação de creatina e avaliação de ganho de peso

Estudo	Ano	Gênero sexual	População	Dosagem (g/dia)	Número de dias	Efeito massa corpórea (%)
Suplementação <10 dias						
Balsom et al	1993	M	Ativa	24	6	+1,5
Balsom et al	1993	M	Treinada	20	6	+1,2
Greenhaff et al	1994	M	Ativa	20	5	+1,0
Stroud et al	1994	M	Ativa	20	5	+1,3
Balsom et al	1995	M	Ativa	20	6	+1,4
Dawson et al	1995	M	Ativa	20	5	+1,0
Green et al	1996	M	Sedentários	20	5	+1,1
Mujika et al	1996	M/F	Nadadores	20	5	+1,0
Vanderberghe et al	1996	F	Ativa	0,5 g/kg	6	Estável
Becque et al	1997	M	Levantadores peso	20	5	+2,3
Godly e lates	1997	M/F	Ciclistas	20	5	Estável
Grinstaff et al	1997	M/F	Nadadores	21	9	Estável
Hamilton-Ward et al	1997	F	Atletas	25	7	Estável
Prevost et al	1997	M/F	Estudantes	18,8	5	Estável
Stout et al	1997	M	Futebol	21	5	Estável
Terrilion et al	1997	F	Corredores	20	5	Estável
Vanderberghe et al	1997	F	Estudantes	20	4	Estável
Bermon et al	1998	M/F	Ativa	20	5	Estável
Maganaris e Maughan	1998	M	Ativa	11,4	5	+2,3
Oopik et al	1998	M	Karatecas	20	5	+1,3
Snow et al	1998	M	Ativa	30	5	+1,3
Robinson et al	1999	M	Ativa	20	5	+1,4
Volek et al	1999	M	Treinada	25	7	+2,1
Oopik et al	1999	M		20	5	+1,3
Urbanski et al	1999	M	Ativa	20	5	+1,0
Suplementação >10 dias						
Earnest et al	1995	M	Levantadores Peso	20	14	+1,9
Thompson et al	1996	F	Nadadores	2	42	Estável
Goldberg e Bechtel	1997	M	Futebol	3	14	+0,8
Kirskey et al	1997	M/F	Atletas	0,3g/dia	42	+2,0
Stout et al	1997	M	Futebol	10,5	51	Estável
Vanderberghe et al	1997	F	Estudantes	5	60	Estável
Volek et al	1997	M	Treinada	3	47	+1,8
Bermon et al	1998	M/F	Ativa	3	47	Estável
Kreider et al	1998	M	Futebol	16	28	+1,0
Francaux e Poortmans	1999	M	Ativa	3	63	+2,9
Leenders et al	1999	M/F	Nadadores	10	14	Estável
Stone et al	1999	M	Futebol	8	35	+1,4
Volek et al	1999	M	Treinada	5	77	+6,3
Rawson et al	1999	M	Idosos	20	30	+0,6
Francaux et al	2000	M	Ativa	21	14	Estável

Adaptado de Poortmans e Francaux. (64).

Portanto, até o presente momento, não há evidências científicas de a suplementação de creatina possa causar danos à saúde de indivíduos saudáveis.

Formas de creatina disponíveis no mercado

Nas primeiras pesquisas envolvendo a suplementação de creatina, utilizava-se tal composto extraído de carne animal. Porém, o processo de extração apresentava-se extremamente oneroso, o que levou os pesquisadores a buscar uma nova forma de obter a creatina: a síntese química.

O monidrato de creatina é a forma mais comum disponível no mercado, sendo conseqüentemente a forma mais utilizada nos estudos de pesquisa. Outras formas menos difundidas são vendidas em pequenas quantidades, como a creatina fosfato e o citrato de creatina.

A creatina fosfato disponível para o consumidor consiste em um produto extremamente caro, que possui propriedades equivalentes a aquelas encontradas no monidrato de creatina. Os fabricantes dessa forma de creatina costumam justificar sua venda pelo fato do produto se apresentar exatamente da forma que é utilizada pelo músculo durante a contração muscular, ou seja, na forma fosforilada. Porém, tal justificativa não tem a menor fundamentação científica, pois, quando ingerida oralmente, a porção fosfato da molécula é prontamente clivada por enzimas denominadas fosfatases, presentes tanto no intestino como na corrente sanguínea, resultando em creatina livre e fosfato. Em seguida, após ser captada pelo músculo, essa molécula de creatina livre deverá ser fosforilada, assim como o monidrato de creatina, para que seja utilizada como fonte de energia em atividades de curta duração (9).

Os estados físicos dos produtos disponíveis são os mais variados possíveis, ou seja, pode-se encontrar creatina na forma de pó, gel, líquido, barras e goma de mascar. Atualmente encontra-se no mercado a creatina micronizada, uma forma capaz de se dissolver melhor em líquidos, o que implica em um melhor aproveitamento do produto.

Alguns produtos misturam o monidrato de creatina a outros compostos, como carboidratos, proteínas, aminoácidos, vitaminas e até extratos herbais e fitoquímicos, o que dificulta a interpretação dos resultados obtidos com sua suplementação.

Os suplementos nutricionais contendo creatina devem listar os ingredientes no rótulo, juntamente com a dosagem diária recomendada.

CONSIDERAÇÕES

A eficácia da suplementação de creatina continua sendo atualmente alvo de inúmeras discussões, devido ao seu caráter controverso. Porém, para a obtenção de melhores resultados, aconselha-se uma detalhada avaliação de critérios

fundamentais para a prescrição de tal suplementação, tais como tipo de atividade física a ser praticada, população a ser submetida ao tratamento ergogênico, dosagem e duração da suplementação.

A decisão de se utilizar a creatina como suplemento ergogênico deve ser tomada com ponderação, devendo existir, indispensavelmente, o acompanhamento de profissionais especializados, tais como nutricionistas e treinadores.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo Auxílio à Pesquisa e Bolsa de Mestrado (RRM) outorgados.

REFERÊNCIAS

1. Mujika I, Padilla S. "Creatine supplementation as an ergogenic aid for sports performance in highly trained athletes: A critical review". *Int J Sports Nut*. 1997;18:491-496.
2. Williams MH. "Ergogenic and ergolytic substances. *Med Sci Sports Exerc* 1992;24:S 344 - S 348.
3. Williams MH. "Nutritional ergogenics in athletics." *J Sports Sci* 1995;13 (Special Issue): S63-S74.
4. Maughan RJ. Nutritional ergogenic aids and exercise performance. *Nut Res Rev* 1999;12:255-280.
5. Maughan RJ. "Creatine Supplementation and Exercise Performance". *Int J Sports Nut* 1995;5:94-101.
6. Rossi L, Tirapegui J. "Aminoácidos: bases atuais para a suplementação na atividade física". *Rev Bras Cien Farm* 2000;36:37-51.
7. Gomes M, Tirapegui J. Relação de alguns suplementos nutricionais e desempenho físico. *Arch Latinoamer Nutr* 2001; 51: 317-329.
8. Feldman EB. "Creatine: a dietary supplement and ergogenic aid." *Nutr Rev* 1999; 57: 45-50.
9. Williams MH, Kreider R, Branch JD."Creatina". São Paulo, Ed Manole, 2000, p.13-28.
10. Williams MH, Branch JD." Creatine supplementation and exercise performance : an update." *J Am Coll Nutr* 1998;17:216-34.
11. Greenhaff PL. "Creatine and Its application as an ergogenic aid." *Int J Sports Nut* 1995; 5: S101-S110.
12. Brannon TA, Adams GR, Conniff CL, Baldwin KM. " Effects of creatine loading and training on running performance and biochemical properties of rat skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 1997; 29: 489-495.
13. Mujika I, Chatard JC, Lacoste L, Barale F, Geysant A. "Creatine supplementation does not improve sprint performance in competitive swimmers." *Med Sci Sports Exercise* 1996;28:1435-1440.
14. Fry DM, Morales M. " A reexamination of the effects of creatine on muscle protein synthesis in tissue culture. *Acta Physiol Scand* 1995;153:207-209.
15. Hultman E, Soderlund K, Timmons J, Cederblad G, Greenhaff PL. "Muscle creatine loading in men". *J Appl Physiol*

- 1996;81:232-237.
16. DemanT TW, Rhodes EC. Effects of creatine supplementation on exercise performance. *Sports Med* 1999;28:49-60.
 17. Engelhardt M, Neumann G, Berbalk A, Reuter I. "Creatine supplementation in endurance sports". *Med Sci Sports Exercise* 1998;30:1123-1129.
 18. Greenhaff PL., Bodin K., Soderlund K, Hultman. "Effect of oral creatine supplementation on skeletal muscle phosphocreatine resynthesis." *Am J Physiol* 1994; 266: E725-30.
 19. Ontiveros ML, Wallimann T. "Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: Down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle." *Mol Cell Biochem* 1998; 184: 427-437.
 20. Clark JF. "Creatine and phosphocreatine: a review of their use in exercise and sport." *J Athletic training* 1997;32:45-51.
 21. Green AL, Simpson E, Littlewood J, MacDonald I, Greenhaff PL. "Carbohydrate ingestion augments skeletal muscle creatine accumulation during creatine supplementation in man. *Am J Physiol* 1996; 271: E821-E826.
 22. Odoom JE. et al "The regulation of total content in a myoblast cell line. *Mol Cell Biochem* 1996; 158: 179-188.
 23. Flisinska Bojanowska A. " Effects of oral creatine administration on skeletal muscle protein and creatine levels." *Biol Sport* 1996;13:39-46.
 24. Vanderberghe K, Gillis N, Leempute V, Hecke V. Caffeine counteracts the ergogenic action of muscle creatine loading. *J Appl Physiol.* 1996; 80: 452-457.
 25. Forsberg AM, Nilsson E, Werneman J, Bergstrom J, Hultman E. Muscle composition in relation to age and Sex. *Clin Sci* 1991; 81: 249-256.
 26. Smith AS, Montain SJ, Mattot RP, Zientara GP, Jolesz FA, Fielding RA. Creatine supplementation and age influence muscle metabolism during exercise. *J Appl Physiol* 1998; 85:1349-1356.
 27. Geary F & Donne B. Department of Physiology, Trinity College Dublin, Ireland, 2000 (Comunicação pessoal).
 28. Gomes M, Tirapegui J. Nutrição e Atividade física. In: Nutrição: Fundamentos e aspectos atuais. Julio Tirapegui ed, São Paulo, Ed Atheneu, 2000, p: 141-160.
 29. McArdle, Katch, Katch. "Exercise physiology". Lea & Febiger, 1994, p.345-370.
 30. Guyton A. "Tratado de Fisiologia Médica". Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1992, p.740-770.
 31. Balsom PD, Soderlund K, Ekblom B "Creatine in humans with special reference to creatine supplementation" *Sports Med* 1994; 18: 268-280.
 32. Greenhaff P. The nutritional biochemistry of creatine. *Nut Biochem* 1997; 8: 610-618.
 33. Edwards M, Rhodes E, McKenzie D, Belcastro A. The effect of creatine supplementation on anaerobic performance in moderately men. *J Strength Cond Res* 2000; 14: 75-79.
 34. Aaserud P, Gramvik P, Olsen SR; Jensen J. "Creatine supplementation delays onset of fatigue during repeated bouts of sprint running." *Scand J Med Sci Sports* 1998;8: 247-251.
 35. Balsom PD, Ekblom B, Soderlund K, Sjodin B, Hultman E. "Creatine supplementation and dynamic high-intensity intermittent exercise." *Scand J Med Sci Sports* 1993; 3: 143-149.
 36. Casey A, Constantin-Teodosiu, Howell S, Hultman E, Greenhaff PL. " Creatine ingestion favorably effects performance and muscle metabolism during maximal exercise in humans. *Am J Physiol* 1996; 271: E31-E37.
 37. Smith JC, Sthephens DP, Hall EL, Jackson AW, Earnest CP. Effect of oral creatine ingestion on parameters of the work rate-time relationship and time to exhaustion in high-intensity cyclin. *Eur J Appl Physiol* 1998; 77:300-365.
 38. Greenhaff P. Creatine supplementation: recent developments. *Br J Sports Med* 1996; 30: 276-281.
 39. Harris RC, Soderlund K, Hultman E. "Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation." *Clin Sci* 1992; 83: 367-374.
 40. Vanderberhe K, Van Hecke P, Leemputte MV, Vantapel F, Hespel P. Phosphocreatine resynthesis is not affected by creatine loading. *Med Sci Sport Exerc* 1999; 31:236-242.
 41. Francaux M, Demeure R, Goudemant JF, Poortmans JR. Effect of exogenous creatine supplementation on muscle PCr metabolism. *Int J Sports Med* 2000; 21:139-45.
 42. Earnest CP, Almada AL, Mitchell TL. "Effects of creatine monohydrate ingestion on intermediate duration anaerobic treadmill running to exhaustion." *J Streng Cond Res* 1997; 11: 234-238.
 43. Jacobs I, Bleue S, Goodman J. " Creatine ingestion increases anaerobic capacity and maximum accumulated oxygen deficit." *Can J Appl Physiol* 1997; 22: 231-243.
 44. Prevost MC, Nelson AG, Morris GS. "Creatine supplementation enhances intermittent work performance." *Res Quart Exerc Sport* 1997; 68: 233-240.
 45. Vanderberghe K, Goris M, Van-Hecke P, Van-Leemputte M, Vangerven L, Hespel P. "Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training ." *J. Appl. Physiol* 1997; 83: 2055-2063.
 46. Becque MD, Lochman JD, Melrose DR. "Effects of oral creatine supplementation on muscular strength and body composition". *Med Sci Sports* 2000; 32: 654-58.
 47. Peyrebrune MC, Nevill ME, Donaldson FJ, Cosford DJ. "The effects of oral creatine supplementation on performance in single and repeated sprint swimming." *J Sports Sci* 1998; 16: 271-279.
 48. Leenders N, Sherman M, Lamb D, Nelson T. Creatine supplementation and swimming performance. *Int J Sport Nut* 1999; 9: 251-262.
 49. Rossouw F, Kruger PE, Rossouw J. The effect of creatine monohydrate loading on maximal intermittent exercise and sport specific strength in well trained power lifters. *Nut Res* 2000; 20: 505-14.
 50. Sanz-Rico M, MTM. Creatine enhances oxygen uptake and performance during alternating intensity exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: 379-85.
 51. Mujika I, Padilla S, Ibanez J, Izquierdo M, Gorostiaga E. "Creatine supplementation and sprint performance in soccer players". *Med Sci Sports Med* 2000; 32: 518-25.

52. Burke L, Pyne LD, Telford R. Effect of oral creatine supplementation on single-effort sprint performance in elite swimmers. *Int J Sport Nut* 1996; 6: 222-233.
53. Grindstaff PD, Kreider R, Bishop R, Wilson M, Wood Alexander C, Almada A. Effects of creatine supplementation on repetitive sprint performance and body composition in competitive swimmers. *Int J Sport Nut* 1997;330-346.
54. Thompson CH, Kemp GJ, Sanderson AL, Dixon RM, Styles P, Taylor DJ, Radda GK. Effect of creatine on aerobic and anaerobic metabolism in skeletal muscle in swimmers. *Br J Sports Med* 1996; 30:222-225.
55. Deutekom M, Beltman JG, Ruiter CJ, Koning JJ, Haan A. "No acute effects of short term creatine supplementation on muscle properties and sprint performance". *Eur J Appl Physiol* 2000; 82: 223-29.
56. Snow RJ, McKenna MJ, Selig SE, Kemp J, Stathis CG, Zhao S. Effect of creatine supplementation on sprint exercise performance and muscle metabolism. *J Appl Physiol* 1998; 84:1667-1673.
57. Haff GG, Kirksey B, Stone M, Proulx C. The effect of creatine monohydrate supplementation on dynamic rate of force development. *J Strength Cond Res* 2000;14: 426-33.
58. Terjung RL, Clarkson Eichner ER, Greenhaff PL, Hespel PJ, Israel RG, Kraemer WJ, Meyer RA, Spriet LL, Tarnopolsky MA, Wagenmakers AJ, Williams MH. The American college of sports medicine roundtable on the physiological and health effects of oral creatine supplementation. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32:706-17.
59. Staton R, ABT, G. Creatine monohydrate among elite Australian power lifters. *J Strength Cond Res* 2000; 14: 322-327.
60. Mihic S, MacDonald J, McKenzie S, Tarnopolsky M. Acute creatine loading increases fat-free mass, but does not affect blood pressure, plasma creatinina or CK activity in men and women. *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: 291-96.
61. Febbraio MA, Flanagan TR, Snow R, Zhao S, Carey MF. "Effect of creatine supplementation on intramuscular TCr, metabolism, and performance during intermittent supramaximal exercise in humans. *Acta Physiol Scand* 1995; 155: 387-395.
62. Maganaris CN, Maughan RJ. Creatine supplementation enhances maximum voluntary isometric force and endurance capacity in resistance trained man. *Acta Physiol Scand* 1998; 163: 279-287.
63. Berneis K, Ninnis R, Haussinger D, Keller U. Effects of hyper and hypoosmolality on whole protein and glucose kinetics in humans. *Am J Physiol*, 1999; 276: E188-95.
64. Poortmans JR, Francaux M. Adverse effects of creatine supplementation: fact or fiction? *Sports Med*, 2000; 30: 155-70.
65. Russel LB. "Interstitial Nephritis in a Patient Taking Creatine." *New Engl J Med* 1999; 340: 814-815.
66. Pritchard NR, Kaira PA. "Renal dysfunction accompanying oral creatine supplements." *The Lancet* 1998; 351:1252-1253.
67. Earnest CP, Almada AL, Mitchell TL "Influence of chronic creatine supplementation on hepatorenal function." *FASEB J* 1996; 10: A790.
68. Almada A, Mitchell T, Earnest C. " Impact of chronic creatine supplementation on serum enzyme concentrations." *FASEB J* 1996; 10: A791.
69. Williams MH. I Congresso Internacional de Ciências do Esporte. São Paulo, 04 e 05 de maio de 2001 (Comunicação pessoal).
70. Mendes M, Tirapegui J. Considerações sobre exercício físico, creatina e nutrição. *Rev Bras Cien Farm* 1999; 35: 195-209.
71. Stout J, Eckerson J, Noonan D, Moore G, Cullen D. Effect of 8 weeks of creatine supplementation on exercise performance and fat free weight in football players during training. *Nut Res* 1999; 19:217-225.
72. Mendes M, Gomes MR, Rossi L, Tirapegui J. Suplementos ergogênicos e atividade física. In: *Nutrição: Fundamentos e aspectos atuais*. Julio Tirapegui ed, São Paulo, Ed Atheneu, 2000, p.161-178.
73. Almada A. Effects of creatine supplementation on repetitive sprint performance and body composition in competitive swimmers. *Int J Sport Nut* 1997;7:330-346.

Recibido: 21-05-2001

Aceptado: 07-02-2002

Adiposidad y patrón de grasa en jóvenes venezolanos por estrato social

Maritza Landaeta- Jiménez, Betty M. Pérez, Ynay Escalante

Fundacredesa - Instituto de Investigaciones Económicas y Sociales. FACES.UCV. Caracas, Venezuela.

RESUMEN. La adiposidad y el patrón de grasa son indicadores de riesgo importantes en la identificación temprana de las enfermedades crónicas. Ambos se exploraron en 836 jóvenes de 11, 13 y 15 años del Estudio Condiciones de Vida, Fundacredesa 1996. Con la estratificación de Graffar- Méndez Castellano, se estableció el Grupo A mejores condiciones (estratos III+IV) y el Grupo B malas condiciones (estrato V). Se seleccionaron las variables: peso, talla, circunferencias: muslo, cintura y cadera; pliegues: tríceps, bíceps, subescapular y supraíliaco y las relaciones: Índice de Masa Corporal (IMC), índice de centripetalidad (IC), cintura/ cadera (C/C), cintura/ muslo (C/M) y sumatoria de pliegues (SP). Se comparó por sexo (t-Student) y estrato (ANOVA y componentes principales). Se controló el efecto de la adiposidad, IMC y edad sobre la distribución de grasa mediante una regresión lineal simple. La adiposidad total, está bien definida en ambos sexos, se estableció en la adolescencia temprana, privilegiando la periférica en las niñas y la central en el varón. Las niñas presentaron pliegues significativamente más altos que los varones ($p < .05$) y las diferencias se incrementaron con la edad. Los niños en mejores condiciones (Grupo A) presentaron pliegues más gruesos en tronco y extremidades y distribución más periférica de la grasa que en los del Grupo B. El primer componente tronco/extremidad y el segundo grasa del tronco superior/inferior explicaron 40,2% y 32,7% de la variabilidad. El IC y la C/C resultaron dependientes del IMC mientras que la C/M fue independiente del IMC, significativa por estrato y reflejó el predominio de una distribución central en varones y niñas del Grupo B. Los jóvenes del Grupo A presentan mayor adiposidad y una distribución más periférica. La relación cintura-muslo resulta el indicador de elección para caracterizar la distribución de grasa, por su independencia de la masa corporal total durante el crecimiento.

Palabras clave: Adiposidad, pliegues de grasa, cintura-cadera, cintura-muslo, índice de centripetalidad, estrato social, Venezuela.

INTRODUCCION

La variación en la distribución anatómica de la grasa, mejor conocida como patrón de grasa, es un tema de interés para el biólogo humano y para el clínico, en especial el comportamiento de la grasa que se distribuye en el tronco y como grasa subcutánea en las extremidades. La distribución central independiente de la cantidad de grasa, se asocia con

SUMMARY. Fatness and fat distribution by social stratum in Venezuelan youths. Adiposity and distribution of body fat are important issues in the prediction of degenerative diseases. Measurements of weight, height, circumferences of thigh, waist and hip; triceps, biceps, subscapular and suprailiac skinfolds; body mass index (BMI), centripetal index (CI), waist/hip (WHR), waist/thigh (WTR) ratios and Σ skinfold thickness (Σ SK) were performed in 836 youths (373 males, 463 females) aged 11, 13 and 15 years. Analysis method included Student t test, ANOVA, Principal Component Analysis and simple linear regression model, with Σ skinfold thickness as independent variable. The sample was divided in two groups (A and B) according with Graffar-Méndez Castellano methodology. Sexual dimorphism in adiposity and differences in body fat distribution were found with a tendency towards peripheral distribution for girls and centripetal for boys. Group A (higher stratum) showed higher values of skinfolds in both trunk and extremities, and a more peripheral distribution than his peers from group B. First component from extremity/trunk and second component from upper/inferior trunk distribution explained 40.2% and 32.7% of the variability respectively. CI and WHR appear dependent from BMI, WHR showed independence from BMI, although significant differences was found by social stratum, reflecting differences in fat topography in boys and girls from group B. These results confirm more adiposity in group A and a tendency towards central distribution in group B. Studies of body fat distribution during these age should include waist/thigh ratio.

Key words: Adiposity, fat skinfolds, waist/ hip ratio, waist/ thigh ratio, centripetal index, social strata, Venezuela.

mayor riesgo de algunas enfermedades metabólicas y endocrinas, especialmente diabetes no insulino dependiente, aterosclerosis e hipertensión (1-3).

Para definir y estimar el patrón de grasa, se utilizan diversas variables, entre ellas las circunferencias, los pliegues y combinaciones de variables tales como peso, talla y circunferencias (4-6), con las cuales se establecen aproximaciones de la grasa corporal. El análisis multivariante,

ha permitido identificar distintos patrones de distribución de grasa: tronco/extremidad, tronco superior/inferior, periférico, central, entre otros, que parecen ser comunes al género humano (7,4,8). Estos patrones varían de acuerdo a la maduración sexual, raza y factores ambientales (9, 5,10).

Con el análisis de componentes principales, se ha encontrado que el primer componente se relaciona con la grasa total y el segundo contrasta la grasa del tronco con la de las extremidades, esto se modifica con la edad y con la maduración en especial en los varones, mientras que, el tercer componente contrasta la grasa superior e inferior de las extremidades (6,4,10). Los resultados de los componentes van a depender de los pliegues que se utilicen en el análisis (8).

En las relaciones de los pliegues, circunferencias y en el índice de conicidad, se ha observado, que a medida que avanza la edad se incrementa la grasa central en los adolescentes masculinos, mientras que, en las niñas aumenta la grasa periférica (5,10-16). El cambio con la edad en las relaciones de los pliegues, demuestra que los niños tienen una distribución de grasa más periférica que los adolescentes (17,12).

El patrón de grasa, aunque básicamente de naturaleza genética (18), se encuentra condicionado por factores socioculturales y ambientales. Los niños y jóvenes de estratos más pobres presentan una distribución de grasa más central que sus homólogos de estratos altos y por consiguiente un mayor riesgo epidemiológico (16,10).

Por otra parte, se ha encontrado una relación positiva entre la emigración rural-urbana y el desarrollo de un patrón centralizado de la grasa (19). En adultos se ha descrito una relación inversa entre distribución central de la adiposidad y estrato socioeconómico, especialmente en mujeres (20).

En relación al grupo étnico, en los niños mexicano-americanos se ha descrito una distribución de grasa más central que en los niños blancos, aún cuando, el nivel de adiposidad es semejante para ambos grupos (21). Este comportamiento que se atribuye a la conjunción de factores genéticos y ambientales, también se encuentra en otras poblaciones amerindias de Guatemala (22).

En atención a la importancia que estas características tienen, en la identificación temprana de factores de riesgo de algunas enfermedades crónicas, se consideró de interés explorar el patrón de distribución y la adiposidad en un grupo de jóvenes venezolanos de 11,13 y 15 años, de acuerdo al sexo y a la condición social.

MATERIALES Y METODOS

La muestra proviene del "Estudio Condiciones de Vida", realizado por Fundacredesa en 1995-1996 en 14 ciudades de Venezuela (23). Se seleccionaron los individuos de 11,13

y 15 años. La muestra fue de 836 individuos 373 niños (44,6%) y 463 niñas (55,4%). La muestra se estratificó con el método Graffar-Méndez Castellano (24) que utiliza la profesión del jefe de familia, principal fuente de ingreso, condiciones de la vivienda y nivel de instrucción de la madre, para clasificar a los individuos en cinco estratos sociales. La proporción de los estratos fue la siguiente: Estrato III 11% (n=106), Estrato IV 45% (n= 366) y Estrato V 44% (n= 364) (Tabla 1).

TABLE 1
Distribución de la muestra de jóvenes venezolanos por edad, sexo y estrato social

Edad (años)	Varones			Niñas		
	Estratos Sociales			Estratos Sociales		
	III	IV	V	III	IV	V
11	21	68	54	22	93	59
13	15	50	65	21	72	76
15	12	45	43	15	38	67
Total	48	163	162	58	203	202

Las variables que se utilizaron fueron: peso, talla, circunferencias de muslo, cintura y cadera y cuatro pliegues de tejido adiposo: tríceps, bíceps, subescapular y suprailíaco. Para el análisis se derivaron las relaciones: Índice de Masa Corporal (IMC), índice de centripetalidad (IC), circunferencia cintura/circunferencia cadera (C/C), circunferencia cintura/circunferencia muslo (C/M) y la sumatoria de cuatro pliegues (SP).

Los individuos se midieron en ropa interior y descalzos, por dos antropometristas, debidamente entrenados en Fundacredesa, de acuerdo a las técnicas recomendadas por el Programa Biológico Internacional y el Centro Internacional de la Infancia (25). Para el peso se utilizó una balanza Detecto, para la talla se empleó el estadiómetro de Harpenden, las circunferencias se midieron con una cinta metálica flexible y los pliegues con un calibrador Holtain.

Para el análisis de la adiposidad se tomó, el valor individual de los pliegues, la sumatoria de los cuatro pliegues (SP) y el índice de masa corporal (IMC). El patrón de grasa se analizó con las relaciones índice de centripetalidad (IC), cintura/cadera (C/C) y cintura/muslo (C/M), que se calcularon con las fórmulas siguientes:

SP = tríceps + bíceps + subescapular + suprailíaco

$$IMC = \frac{\text{peso}}{\text{talla}^2}$$

$$\text{Índice de Centripetalidad (IC)} = \left(\frac{\text{subescapular}}{\text{Subescapular} + \text{tríceps}} \right) * 100$$

$$C/C = \left(\frac{\text{circunf. cintura}}{\text{Circunf. cadera}} \right) * 100$$

$$C/M = \left(\frac{\text{circunf. cintura}}{\text{Circunf. muslo}} \right) * 100$$

Análisis estadístico

Para efectos del análisis, se establecieron dos grupos: uno conformado por los niños de la muestra que viven en mejores condiciones que se denominó Grupo A (Graffar Estratos III+IV), estos dos estratos se unieron al no encontrarse diferencias significativas entre ellos con el test de Scheffé ($p > .05$) en las variables seleccionadas para este trabajo. El otro grupo denominado Grupo B (Graffar Estrato V) lo integraron los niños en condiciones socioeconómicas desfavorables (Tabla 2).

TABLA 2

Valores medios de las variables antropométricas de jóvenes venezolanos según sexo, edad y estrato

Edad (años)	n	IC	C/MX100	C/CX100	SP	IMC	Peso	Talla
Varones								
Estrato A								
11	89	44,3	140,9	93,9	28,7	17,3	36,3	144,5
13	65	46,9	140,7	93,2	27,8	18,2	44,1	155,1
15	57	50,8	136,7	93,5	27,0	19,6	55,6	168,2
Estrato B								
11	54	45,5	147,1	94,9	22,2	16,3	32,2	140,3
13	65	47,3	141,4	94,1	27,8	17,8	41,9	152,8
15	43	51,6	142,2	93,8	24,6	19,1	51,8	164,1
Niñas								
Estrato A								
11	115	45,5	133,1	88,7	36,1	18,3	40,5	148,2
13	93	47,9	127,7	87,6	40,9	19,7	47,1	154,5
15	53	47,5	123,1	86,9	45,3	20,5	51,9	159,1
Estrato B								
11	59	46,3	132,7	89,3	36,5	18,3	39,8	146,5
13	76	46,3	129,5	87,9	35,9	18,8	44,0	152,7
15	67	47,9	128,1	86,4	42,8	20,2	49,1	155,8

IC: Índice de Centripetalidad; C/M 100* (circunferencia cintura / circunferencia muslo) C/C 100* (Circunferencia cintura/ Circunferencia cadera) SP: sumatoria cuatros pliegues, IMC: Índice de masa corporal. Estrato A= Graffar III y IV. Estrato B= Graffar V.

Se analizó el valor medio de las variables peso, talla, relaciones de grasa centripeta, cintura/ cadera y cintura/muslo, sumatoria de los cuatros pliegues e índice de masa corporal y la mediana de los cuatro pliegues (tríceps, bíceps, subescapular y supraíliaco), de acuerdo a la edad, sexo y estrato.

Las variables se compararon por sexo (t-Student) y por estrato (ANOVA), previamente se verificó la homogeneidad de la varianza, mediante la prueba de Levene ($p > 0.05$), para lo cual fue necesario hacer transformaciones (X^{-1}) en los varones para los pliegues de tríceps, bíceps y supraíliaco, (X^{-2}) para el pliegue subescapular en varones y logarítmica en el pliegue subescapular en niñas (26).

El comportamiento de cada pliegue, se exploró con un análisis de componentes principales (ACP), para esto previamente se controló el efecto de la grasa total medida por la suma de los cuatro pliegues mediante una regresión lineal simple sobre cada pliegue y se tomó como variable independiente la sumatoria de los pliegues.

Los residuos obtenidos de cada regresión, se consideraron como nuevas variables en el análisis de componentes principales, en las cuales, el efecto de la grasa total fue controlado de modo que los componentes reflejaron las combinaciones de los pliegues. Se tomaron sólo aquellos factores con autovalores superiores a 1.0. El análisis se hizo sin discriminar por edad y sexo y en forma separada por edad y sexo. Posteriormente se estimaron los valores medios estandarizados de los componentes según sexo y grupos según estratos.

El peso, la talla y los cuatro pliegues se normalizaron con una Z-Score y se analizaron las medias de todas las variables, según sexo, edad y grupos según estratos.

El patrón de grasa se evaluó con el índice de centripetalidad, cintura/cadera y cintura/muslo, a los cuales se les controló los efectos del IMC y la edad con una regresión lineal, cuyas variables independientes fueron el IMC y la edad. Después se tomaron los residuos obtenidos en cada regresión como variables ajustadas, cuyos efectos antes descritos estaban controlados. Finalmente, para determinar diferencias por estratos entre las variables originales y las nuevas variables producto de la regresión (ajustadas), se aplicó el contraste de razón de varianza para un nivel de significación de 5%.

RESULTADOS

El peso y talla, tanto en varones como en las niñas en ambos grupos, se incrementaron con la edad, pero las diferencias en las niñas son menores. El índice de masa corporal se incrementó con la edad en ambos sexos y estratos, mientras que, la sumatoria de pliegues se incrementó en las niñas en ambos grupos y en los varones del grupo B. Por el contrario en los varones del grupo A la sumatoria de pliegues se redujo con la edad.

El valor medio de la relación cintura/muslo en ambos sexos y estratos, disminuyó con la edad. Los valores medios de la relación cintura/cadera en los varones fueron semejantes por edad en ambos estratos, por el contrario, en las niñas los

valores disminuyeron con la edad. El índice de centripetalidad también se incrementó con la edad en los dos sexos y grupos (Tabla 2).

Los pliegues individuales en general se incrementaron con la edad en las niñas, con algunas diferencias en magnitud de acuerdo a su localización, edad, sexo y estrato. En los varones los pliegues de tríceps y bíceps disminuyeron con la edad, por el contrario aumentaron los pliegues subescapular y suprailiaco, con algunas variaciones de acuerdo al grupo social, localización y edad (Tabla 3).

TABLA 3
Mediana de los pliegues según sexo, edad y estratos

Edad (años)	Tríceps	Bíceps	Subescapular	Suprailiaco
Varones				
Grupo A	8,1	4,7	6,0	4,9
11	7,8	4,6	6,0	4,7
13	6,8	4,1	7,0	5,1
15				
Grupo B				
11	6,6	4,3	5,4	4,0
13	6,9	4,1	6,1	4,8
15	6,4	3,8	6,4	4,7
Niñas				
Grupo A				
11	10,7	5,9	7,7	7,2
13	11,5	6,2	9,9	8,8
15	13,7	6,5	12,7	9,5
Grupo B				
11	10,4	6,2	8,9	7,3
13	10,1	5,6	8,6	7,3
15	13,1	6,2	11,1	10,2

Grupo A= Graffar Estratos III y IV. Grupo B= Graffar Estrato V

Dimorfismo sexual

El dimorfismo sexual en el índice de masa corporal a favor de las niñas se encontró en casi todas las edades a excepción de los 15 años en ambos grupos y en el peso a los 13 y 15 años en el grupo B. Las niñas de 11 y 13 años de ambos grupos presentaron el peso y una masa corporal superior a la de los varones, mientras que en el peso, los varones de 15 años del grupo A superaron a las niñas (Tabla 2).

Las relaciones cintura/muslo y cintura/cadera, presentaron dimorfismo sexual por edad en ambos estratos; con valores significativamente ($p < .05$) más altos en los varones que en las niñas, por el contrario, en los pliegues (bíceps, tríceps, subescapular y suprailiaco y en la sumatoria de pliegues, predominaron los valores de las niñas. El índice de centripetalidad sólo resultó significativamente ($p < .05$) más alto en los varones de 15 años que en las niñas de esta edad (datos no mostrados). Finalmente las niñas de 11 años resultaron significativamente más altas que los varones, mientras que, a los 15 años los varones las superan (Tablas 2 y 3).

Componentes principales

En los componentes principales se utilizaron los residuos derivados de la matriz de correlación. Las correlaciones entre los residuos de los pliegues por edad y sexo juntos, aún cuando bajas ($r = -0.103$, $r = -0.422$), resultaron estadísticamente significativas ($p < .05$). La Tabla 4 presenta los resultados para los componentes principales. Los dos primeros componentes explicaron 72,9% de la variabilidad total. El primer componente tronco/extremidad contrastó los pliegues del tronco superior e inferior con los de la extremidad superior, de manera que el subescapular y el suprailiaco se opusieron al tríceps y bíceps y explicaron 40,2% de la variabilidad. El segundo componente, grasa del tronco superior/ inferior, el pliegue subescapular se opuso al suprailiaco y explicó 32,7% de la variabilidad.

TABLA 4
Medias y desviaciones estándar del Índice de Centripetalidad, Cintura/muslo y Cintura/cadera con y sin ajustes según Índice de Masa Corporal en ambos grupos

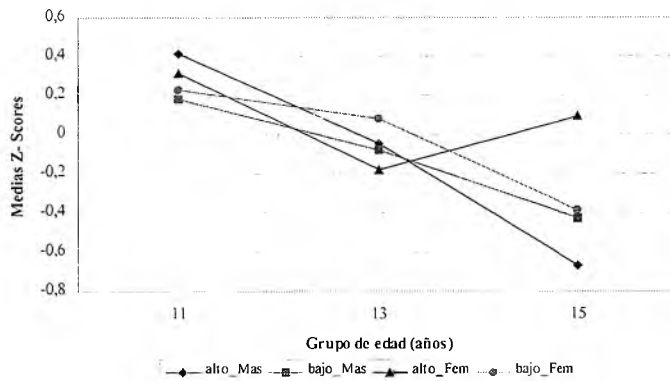
Grupos	n	IC				C/M				C/C			
		Sin ajuste		Con Ajuste		Sin ajuste		Con Ajuste		Sin ajuste		Con Ajuste	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Varones													
Grupo A	211	46,86	5,29	46,86	2,72*	139,72	7,09	139,72	3,00	93,62	2,90	93,62	0,76*
Grupo B	162	47,82	5,30	47,82	2,32*	143,51	7,12	143,51	3,13	94,28	3,21	94,28	2,79*
Niñas													
Estrato A	261	46,78	5,03	46,78	1,53	129,18	9,70*	129,18	4,28*	87,92	4,16	87,92	1,15
Estrato B	202	46,84	5,58	46,84	1,93	129,98	7,07*	129,98	2,44*	87,81	3,76	87,81	1,19

Grupo A= Graffar Estratos III y IV. Grupo B= Graffar Estrato V. IC: Índice de Centripetalidad. C/M: Cintura /muslo C/C: Cintura /Cadera. DE: Desviación Estándar. Razón de varianza (F nivel de significación 5%). * Diferencias significativas.

La Figura 1 presenta las medias estandarizadas del primer componente (tronco/extremidad) por edad, sexo y grupos por estrato. En los varones en ambos grupos y en las niñas del grupo B el valor disminuyó gradualmente al aumentar la edad, mientras que en las niñas del grupo A disminuyó hasta los 13 años y se incrementó a los 15 años.

FIGURA 1

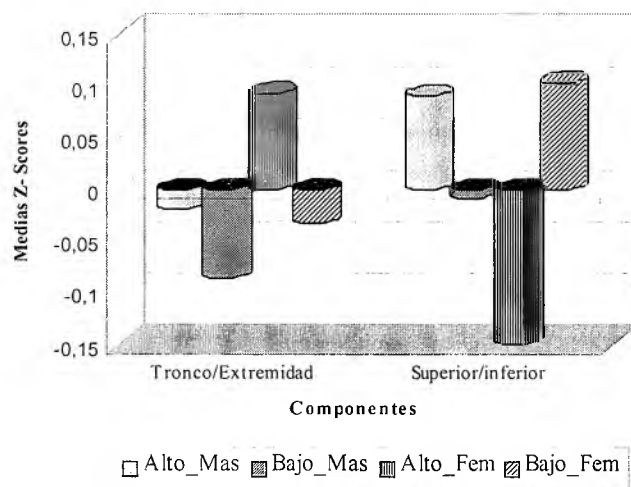
Medias estandarizadas del primer componente (tronco/extremidad) por grupo de edad, estrato y sexo



En la Figura 2, los valores más bajos en el componente tronco/ extremidad se encontraron en varones y niñas del grupo B, mientras que, las niñas y varones del grupo A resultaron con más grasa en el tronco. Los varones del B y las niñas del A presentaron las medias más bajas en el segundo componente (superior/inferior).

FIGURA 2

Medias estandarizadas de los componentes: tronco/extremidad (componente 1) y superior/inferior (componente 2), por estrato y sexo



Los valores estandarizados de los dos componentes principales por sexo y edad, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre grupos, con excepción de las niñas de 15 años en el segundo componente. Los jóvenes de este estudio presentaron marcada independencia por edad y estrato en estos componentes.

Diferencias por grupos según estratos

Las niñas presentaron valores de pliegues más altos que los varones en ambos grupos. En los varones del grupo A los pliegues tríceps y bíceps disminuyeron con la edad, por el contrario, las niñas en casi todos los pliegues aumentaron sus valores con la edad.

Los pliegues individuales y la sumatoria de los pliegues presentaron diferencias por grupos según estratos solamente en los varones de 11 años. En las niñas las diferencias se presentaron a los 13 y 15 años en los pliegues subescapular y tríceps respectivamente, valores que disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) en el grupo B con condiciones más desfavorables (Tablas 2 y 3).

En el peso y la talla se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) a favor del grupo A, para el peso en los varones de 11 años y en las niñas de 13 años y para la talla en los varones de 11 y 15 años así como en las niñas de 15 años respectivamente.

El índice de masa corporal, únicamente presentó diferencias por estrato en los varones de 11 años, los cuales en el grupo A presentaron una masa corporal mayor, mientras que, en las niñas prácticamente no se modificó. Por último, en los varones de 11 y 15 años y en las niñas de 15 años, la relación cintura/muslo fue significativamente más alta en el grupo B. El peso, talla y los cuatro pliegues en los dos sexos resultaron más bajos en el grupo B y las diferencias en los pliegues bíceps y suprailiaco fueron menos pronunciadas (Figuras 3 y 4).

FIGURA 3

Medias Z-Score: Variables antropométricas en varones por estrato

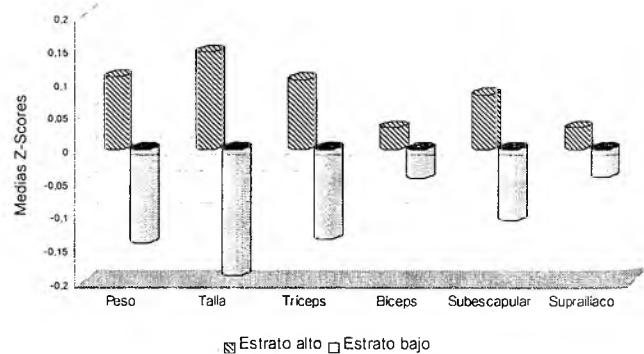
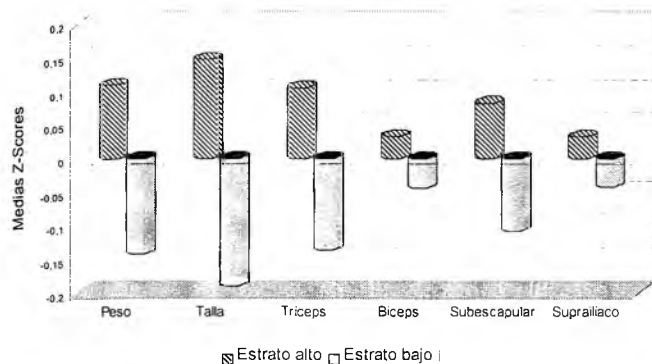


FIGURA 4

Medias Z-Score: Variables antropométricas en niñas por estrato



Los valores medios estandarizados de los pliegues del tronco y extremidad (subescapular y tríceps) fueron semejantes dentro de cada grupo y para cada edad (Figuras 5 y 6).

FIGURA 5

Media Z-Scores de subescapular y tríceps de varones, por edad y estrato

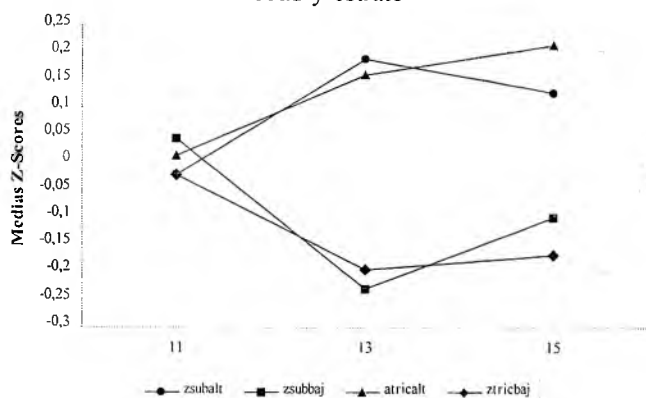
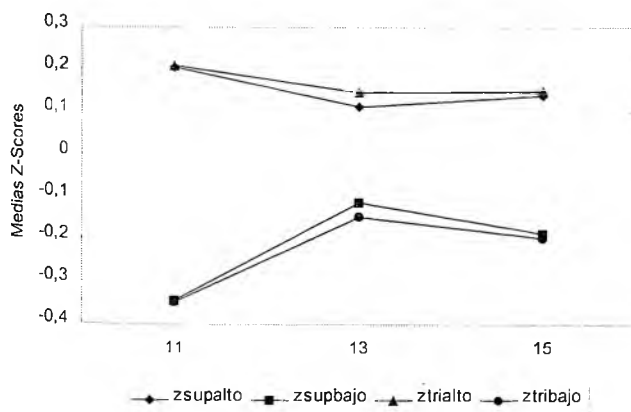


FIGURA 6

Media Z-Scores de subescapular y tríceps en niñas y varones, por edad y estrato



Los niños del grupo A resultaron con pliegues más gruesos en el tórax y en la extremidad superior que los del B. Los valores más bajos de los pliegues subescapular y tríceps se encontraron en los varones a los 13 años y en las niñas a los 11 años del grupo B (Figuras 5 y 6).

Los valores medios estandarizados de los pliegues subescapular y tríceps en los varones de 11 años fueron semejantes en los dos estratos. A los 13 años los varones del grupo A presentaron un incremento en ambos pliegues (Figura 5). Por otra parte, en las niñas del B, la grasa central (subescapular) y el pliegue tríceps presentaron valores más altos a los 13 años, mientras que los valores disminuyeron a los 15 años (Figura 6).

En la relación tronco inferior y extremidad (suprailíaco y tríceps), en los varones, los valores medios resultaron semejantes para cada estrato y edad. Los niños y niñas con mejores condiciones sociales presentaron pliegues más altos, con excepción en las niñas de 15 años las cuales presentaron más grasa central en el grupo B. En los varones del B en ambos pliegues, se encontraron valores más bajos a los 11 y 13 años, pero a los 15 años fueron más altos que en el grupo A.

Las medias de las relaciones índice de centripetalidad, cintura/cadera y cintura/muslo, no se modificaron al eliminar el efecto del IMC y de la edad, solamente las desviaciones estándar resultaron más bajas con el ajuste (Tabla 4). En los varones se encontraron diferencias significativas por grupos, en los valores ajustados del IC y C/C, confirmando la tendencia a una distribución central de la grasa en los niños del grupo B del estrato más bajo.

En las niñas las diferencias significativas se presentaron en la relación C/M en ambos casos (originales y derivadas del ajuste), con predominio de la distribución central de la grasa en el grupo B. Las diferencias en la relación C/M resultaron independientes del ajuste por el índice de masa corporal y la edad.

DISCUSION

Se confirma una asociación positiva entre la presencia de un patrón de grasa central y condiciones socioeconómicas desfavorables, tal como fue señalado en otros estudios (10,22,16). En los varones el patrón de grasa central tiene su expresión en los valores altos de las relaciones cintura/muslo, cintura/cadera y en el índice de centripetalidad. Por otra parte, las niñas presentaron pliegues más gruesos, mayor grasa total y un patrón de distribución más periférico, semejante en ambos estratos. En los pliegues de las extremidades la diferencia entre estratos fue mayor.

El predominio en la adiposidad total de los niños con mejores condiciones, se debió a los pliegues de tríceps y subescapular más gruesos. En este grupo social, se ha descrito

una canalización alta en el pliegue subescapular, con tendencia en la pubertad a una mayor centripetalidad en los varones y un patrón de canalización temprano, después de los doce años (14).

La relación C/C no reflejó la distribución de grasa, hallazgo que coincide con los resultados de otros autores, quienes consideran que no es un indicador apropiado en esta etapa del crecimiento, debido a su pobre correlación con otras medidas de grasa, tales como los pliegues de tejido adiposo (27,5,28). Durante el crecimiento la C/C está muy relacionada con la maduración, fenómeno biológico que influye en los valores del índice durante la adolescencia (29). El índice de masa corporal tampoco identificó diferencias entre grupos sociales.

Otros autores señalan a la relación C/C como un buen indicador de distribución de grasa en los adolescentes, útil en estudios epidemiológicos para identificar el patrón de distribución central, que junto a otros factores, se asocia a una mayor predisposición a enfermedades crónicas en los adultos (28,30). En niños obesos, algunos estudios recomiendan a la relación C/C como un buen indicador de grasa centrípeta (8,30).

La relación C/M reflejó con mayor precisión la distribución de grasa en estos niños durante el crecimiento, hallazgo que coincide con otros estudios que promueven su uso en niños y jóvenes, debido a la relativa independencia del crecimiento (6). Esto la convierte en un buen indicador, ya que, está menos influenciada que la C/C, por la variabilidad en el crecimiento de la masa corporal total y por la maduración (28,29,6,31).

Los varones del estrato bajo resultaron con menor crecimiento físico, adiposidad total y grasa en el tórax, medido por los pliegues, pero con una distribución más central según los valores de la relación C/M. En el origen de estas diferencias intervienen además de los factores genéticos, factores ambientales que determinan el crecimiento más armónico de los niños en los estratos altos, tanto en los indicadores de masa corporal, corpulencia, como en la cantidad y distribución de grasa (10,31,32).

El patrón de distribución de grasa en los varones se establece durante la adolescencia y se asocia con las hormonas sexuales. Además está condicionado por varios factores, tales como, el aumento de los depósitos interno de grasa, mayor masa muscular y mayor masa ósea y presenta diferencias por sexo, raza y estadios de maduración (4,17).

Otras investigaciones, han sugerido que el patrón de grasa central se asocia con malas condiciones ambientales y pobreza, pero ninguno es determinante de cómo la pobreza puede influir condicionando el proceso (4,2,21,10). En este estudio, los jóvenes del grupo A presentan mayor adiposidad, mientras que los del grupo B presentan un patrón de distribución de grasa más central.

Algunos autores (2,3), en poblaciones mexicana americana encuentran mayores niveles de grasa y un patrón de grasa más central que en los blancos y negros de USA (21). Igualmente las niñas pobres mexicano americanas presentan pliegues más altos que las no pobres. Bogin y Sullivan (22) encuentran con valores ajustados por niveles de grasa, que la reducción por estrato en el pliegue subescapular fue mayor que en el tríceps, coincidiendo con una distribución más central de la grasa en los estratos altos. Así mismo no consiguen diferencias entre los ladinos y los niños de estratos altos de Guatemala.

Se encontraron diferencias en el patrón tronco extremidades y en los niveles de grasa, caracterizado por que los niños de estratos altos presentan un patrón con predominio de la grasa en las extremidades y los del estrato bajo con más grasa central.

El índice de masa corporal en las niñas fue semejante en ambos grupos, mientras que, en los varones fue más alto en el estrato con mejores condiciones. Esta situación puede estar relacionada con las diferencias en el crecimiento y composición corporal entre los varones, así como también, con la definición más tardía en el patrón de grasa y posiblemente con la mayor vulnerabilidad del varón ante las agresiones ambientales (13,16).

En los niños con menores recursos, la capacidad de respuesta disminuida, es decir, el riesgo más alto a las agresiones ambientales, en especial en los jóvenes, es una consecuencia de las bajas reservas calóricas y de una mayor demanda para suplir los requerimientos impuestos, tanto por los ambientes insalubres donde crecen estos niños, como por el brote puberal en los distintos componentes (33,34,13,32).

Se han identificado algunas variables cuyos niveles pueden estar asociados a enfermedades en los adultos, entre ellas, el índice de masa corporal en ambos sexos, pliegues del tronco en el varones y en las niñas la relación subescapular/ pliegues del brazo, las circunferencias y sus relaciones (7,1,35). El IMC alto se asocia especialmente con pliegues del tronco altos en varones y con una relación alta en los pliegues del tronco/extremidad en niñas, que podría incrementar el riesgo de obesidad centralizada en el adulto (5).

En niños con grasa central alta se encuentra buena asociación con la respuesta a la insulina, independiente de la raza y maduración, por lo tanto, la localización de la grasa puede ayudar a identificar en edades tempranas, individuos más susceptibles a hiperinsulinemia (1,36). La topografía de la grasa junto al estudio de la adiposidad total, es útil para identificar riesgos durante el crecimiento.

Estos resultados coinciden con los hallazgos de otros estudios, sobre el comportamiento de la adiposidad, del patrón de distribución de grasa y la utilización de los pliegues y del IMC en la detección temprana del incremento de riesgo

de obesidad centralizada en los adultos (1,5,37).

La utilidad de los componentes principales en la caracterización del patrón de grasa, se probó una vez más, sin embargo, se ha señalado que los errores de medida en los pliegues así como las diferencias biológicas, pueden interferir los resultados (31). Los componentes principales, identifican dos patrones tronco/extremidad y tronco superior/ inferior, y como se ha señalado anteriormente, en ellos- son determinantes las variables que participan en dichos componentes (8,10,6).

El patrón de grasa centrípeta es una característica masculina asociada a los niveles de hormona sexuales, mientras que la distribución central de la grasa subcutánea puede estar asociada con el incremento de los depósitos internos del tejido adiposo y con una masa muscular y ósea grandes. Este patrón presenta gran variabilidad debido al sexo, características étnicas, estadio de maduración y estrato social (4,10,37). El cambio en la distribución de grasa durante el crecimiento, es difícil de predecir, debido a la poca consistencia de las correlaciones en los niños seguidos en forma longitudinal, las cuales son bajas al inicio del seguimiento y a los catorce años (3,14).

El patrón de distribución presenta diferencias entre estratos, los niños del estrato bajo tienen más grasa en el tórax. En los varones, la edad y el índice de masa corporal son determinantes en el establecimiento del patrón de grasa, mientras que, en las niñas es independiente de estos factores.

La relación cintura - muslo refleja con mayor precisión la distribución de grasa durante el crecimiento. Independiente de la masa corporal total, en especial en las niñas. Estos resultados coinciden con otros estudios que promueven su uso, debido a que está menos influenciada que la relación cintura /cadera, por la variabilidad en el crecimiento y la maduración.

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento a los niños que participaron en el estudio y a Edgar Vásquez y Omaira Gollo por todo el apoyo en la transcripción y revisión de los datos.

REFERENCIAS

1. Freedman D, Shrivastava S, Burke G, Shear C, Smoak C, Harsha D, Webber L, Berenson G. Relation of body fat distribution to hiperinsulinemia in children and adolescents: the Bogalusa Hearts Study. *Am J Clin Nutr* 1987; 46:403-410.
2. Kaplowitz H, Martorell R, Mendoza FS. Fatness and fat distribution in Mexican American children from the Hispanic Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hum Biol* 1989; 1:631-648.
3. Baumgartner RN, Roche AF, Guo S, Chumlea C, Ryan AS. Fat patterning and centralized obesity in Mexican-American children in the Hispanic Health and Nutrition Examination Survey.(HHANES 1982-1984). *Am J Clin Nutr* 1990; 51:936S-943S.
4. Baumgartner R N, Roche AF, Guo S, Lohman T, Boileau RA, Slaughter MH. Adipose tissue distribution: The stability of principal components by sex, ethnicity and maturation stage. *Hum Biol* 1986;58(5):719-735.
5. Rolland - Cachera M F, Bellisle F, Deheeger M, Pequionot F, Sempe M. Influence of body fat distribution during childhood on body fat distribution in adulthood: a two decade follow-up study. *Int J Obesity* 1990;14:473-481.
6. Mueller WH, Marbella A, Harrits RB, Kaplowitz HJ, Grunbaum JA, Labarthe DR. Body circumferences as measures of body fat distribution in 10-14 year-old schoolchildren. *Am J Hum Biol* 1990;2:117-124.
7. Deutsch MI, Mueller WH, Malina RM. Androgyny in fat patterning is associated with obesity in adolescents and young adults. *Ann Hum Biol* 1985;(12)3:275-286.
8. Hattori K, Becque MD, Katch VL, Rocchini AP. Fat patterning of adolescents. *Ann Hum Biol* 1987;14: 23-28.
9. Malina R, Bouchard C. Subcutaneous fat distribution during growth. In *Fat distribution during growth and later health outcomes*. R Malina y C Bouchard (ed). Alan Liss. 1998; pp: 63-84.
10. Johnston F E, Sanjeev, Jit I, Indech GD. Fatness and fat patterning in 12-17 year-old youth from the Candigarh zone of northwest India. *Am J Hum Biol* 1991;3:587-597.
11. Martinez E, Bacallao J, Devesa M, Amador M. Relationship between frame size and fatness in children and adolescents. *Am J Hum Biol* 1995; 7:1-6.
12. Moreno L, Fleta J, Mur L, Feja C, Sarría A, Bueno M. Indices of body distribution in Spanish children aged 4.0 to 14.9 years. *J Paediatr Gastroentol Nutr* 1997; 25(2):175-181.
13. López de Blanco M, Landaeta- Jiménez M, Espinoza I, Macías de Tomei C. En *Estudio Nacional de Crecimiento y Desarrollo Humanos de la República de Venezuela. Proyecto Venezuela*. H Méndez Castellano (ed). Tomo II. Caracas: Fundacredesa.1996:407-845.
14. López-Blanco M, Macías-Tomei C, Vásquez Ramírez M, Blanco-Cedres L. Canalización del patrón de distribución de grasa en niños y adolescentes de Caracas. *Arch Ven Puer Ped* 2000; 63:82-94.
15. Mueller W H, Weininger JC, Liehr P, Chan W, Chandler PS. Conicity: A new index of body fat distribution - What does it tell us? *Am J Hum Biol* 1996;8:489-496
16. Perez B, Landaeta-Jiménez M. Relationship of weight and height with waist circumference, body mass index and conicity index in adolescents. *Acta Med Auxol* 2001;33(2):61-71.
17. Johnston FE. Sex differences in fat patterning in children and youth. In *Fat distribution during growth and later health outcomes*. Johnston FE and Bouchard C (ed). New York: Alan R. Liss 1988; pp 85-102.
18. Bouchard C. Inheritance of human fat distribution. In C Bouchard and F Johnston (eds): *Fat distribution during growth and later health outcome*. New York: Alan R Liss, 1988 pp 103-125.
19. Ramirez ME, Mueller WH. The development of obesity fat patterning in Tokelau children. *Hum Biol* 1980; 52: 675-687.

20. Georges E, Mueller W, Wear ML. Body fat distribution associations with socioeconomic status in the Hispanic health and Nutrition Examination Survey. *Am J Hum Biol* 1991; 31: 489-501.
21. Ryan AS, Martinez GA, Roche AF. An evaluation of the associations between socioeconomic status and the growth of Mexican- American children. Data from the Hispanic Health and Nutrition Examination Survey (HHANES 1982-1984). *Am J Clin Nutr* 1990; 51:944S -952S.
22. Bogfn R, Sullivan T. Socioeconomic status, sex, age, and ethnicity as determinants of body fat distribution for Guatemalan children. *Am J Phys Anthropol* 1986, 69:527-536.
23. Fundacredesa. Indicadores de condiciones de vida. Caracas. 1996.
24. Méndez Castellano H, Méndez MC. Sociedad y estratificación. Método Graffar Méndez Castellano. Caracas. Venezuela. 1994.
25. Weiner JS, Lourie JA. *Human Biology. A guide to field methods (IBP Handbook N° 9)*. Academic Press. London, 1966: 439p.
26. Hoaglin, D.C., Mosteller, F. Tukey, J. *Understanding robust and exploratory data analysis*. John Willey & Sons Inc., 1983.
27. Mueller WH, Marbella A, Harrits RB, Kaplowitz HJ, Grunbaum JA, Labarthe DR. Body circumferences as alternatives to skinfold measures of body fat distribution in children. *Ann Hum Biol* 1989;16:495-506.
28. Deurenberg P, Pieters JL, Hautvast JG. The assessment of the body fat percentage by skinfold thickness measurements in childhood and young adolescence. *Brit J Nutr*. 1990; 63: 293-303.
29. Hammer LD, Wilson DM, Litt IF, Killen JD, Hayward C, Miner B, Vosti C, Taylor CB. Impact of pubertal development on body fat distribution among white, hispanic and asian female adolescents. *J Pediatrics* 1991;118:975-980.
30. Moreno L, Fleta J, Mur L, Sarría A, Bueno M. Fat distribution in obese and nonobese children and adolescents. *J Paediatr Gastroentol Nutr* 1998; 27:176-180.
31. Mueller WH, Kaplowitz HJ. The precision of anthropometric assessment of body fat distribution in children. *Ann Hum Biol* 1994;21(3): 267-274.
32. López-Blanco M, Espinoza I, Macías-Tomei C, Blanco-Cedres L. Maduración temprana: factor de riesgo de sobrepeso y obesidad durante la pubertad. Fundacredesa, Fundación Cavendes, UCV. 1997.
33. Ledezma T, Landaeta- Jiménez M, Pérez B, Ortega Mancera A. Condiciones socioeconómicas y situación nutricional. Estudio de una comunidad de Caracas. *An Venez Nutr* 1992;5:17-23.
34. Landaeta-Jiménez M, López-Blanco M, Méndez Castellano H. Arm muscle and arm fat areas: Reference values for children and adolescents. Project Venezuela. *Auxology 94'*. *Humanbiol. Budapest* 1994;25:555-562
35. Freedman D, Shinivasan S, Harsha D, Webber L, Berenson G. Relation of body fat patterning to lipid and lipoprotein concentrations in children and adolescents: the Bogalusa Hearts Study. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 930-939.
36. Van Lenthe F, Kemper H, Van Mechelen W, Twisk J WR. Development and tracking of central patterns of subcutaneous fat in adolescence and adulthood: The Amsterdam growth and health study. *Int J Epidemiol*. 1996;25:1162-1171.
37. Diaz M E, Montero M, Wong I, Moreno V, Toledo E.M, Moreno R. Fat distribution Cuban infants. *Am J Hum Biol* 1994;6:687-692.

Recibido: 31-05-2001

Aceptado: 28-01-2002

Escalas de satisfacción alimentaria-nutricional para representantes y madres cuidadoras de niños atendidos en multihogares de cuidado diario

Jennifer Bernal, Paulina Lorenzana

Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela

RESUMEN. El estudio desarrolla y valida dos escalas para la medición del nivel de Satisfacción Alimentaria-Nutricional (SAN) en representantes y madres cuidadoras de niños beneficiarios del programa Multihogares de Cuidado Diario (MCD), pertenecientes a una comunidad pobre urbana en Caracas, Venezuela. Dentro de la perspectiva naturalista-constructivista, se seleccionó una muestra intencional de 20 representantes y cuidadoras, para captar su percepción sobre el componente alimentario-nutricional del programa. De las entrevistas surgieron categorías que sirvieron para construir los ítems de dos escalas tipo Likert, que miden la SAN en representantes y madres cuidadoras. Las escalas poseen diferentes dimensiones del servicio de alimentación y nutrición y fueron validadas en 73 representantes y 32 madres cuidadoras. Se determinó el análisis factorial y de componentes múltiples, el cual mostró que los ítems de las escalas, en conjunto, explican 61% y 69% de la varianza a través de la variable "Satisfacción Alimentario-Nutricional" de representantes y cuidadoras respectivamente. La confiabilidad medida por el Coeficiente Alfa de Cronbach fue de 0,74 (representantes) y 0,77 (madres cuidadoras), lo que indica validez de contenido y confiabilidad. El 74% y 94% de los representantes y madres cuidadoras obtuvieron un elevado nivel de SAN, demostrando que el programa responde a las necesidades alimentario-nutricionales de la comunidad de multihogares de Antfmano. Las escalas pueden detectar dimensiones de la SAN susceptibles de modificar, y así lograr programas más eficientes y efectivos. Se recomienda la validación externa de las escalas para obtener información útil para la vigilancia y evaluación del programa de MCD desde la perspectiva de sus gerentes y usuarios. **Palabras clave:** Multihogares de cuidado diario, escalas, alimentaria-nutricional, satisfacción, programa social.

SUMMARY. Scales to measure parents' and caretakers' satisfaction with the food and nutrition component of Child-care Centers. Two Likert-type scales for measuring parents' and caretakers' level of satisfaction with the food and nutrition services offered at childcare multi-centers in a peri-urban community in Caracas, were developed and validated. An intentional sample of 20 parents and caretakers were interviewed within the naturalistic-constructivist perspective, to capture their perceptions of distinct aspects of the food and nutrition components of the program. Categories emerged from the interviews that served to construct the items for two scales that measure level of satisfaction of parents and caretakers with the food and nutrition aspects of the program. To validate the scales, they were applied to 73 parents and 32 caretakers. Factor and multiple components analysis showed that overall, the scales explained 61% and 69% of the variation in level of satisfaction of parents and caretakers respectively. Confiability measured with Alpha Cronbach coefficient was 0.74 and 0.77 for parents' and caretakers' scales respectively. These results reveal scales that have content validity and good reliability. Besides, the scales detect specific aspects of the food and nutrition service that should be reinforced or modified, to make the Child-care Centers program more effective and efficient. External validation of the scales is recommended, since they provide an instrument capable of capturing useful information for monitoring and evaluating the Child-care Centers program nation-wide, from the perspective of program managers and parents of program users.

Key words: Childcare centers, scales, food and nutritional, satisfaction, social program.

INTRODUCCION

Los Multihogares de Cuidado Diario (MCD) forman parte de los programas sociales para la atención de población infantil en Venezuela. Surgen para responder a las demandas y necesidades básicas de hogares de escasos recursos socioeconómicos. En estos centros, los niños reciben desayuno, almuerzo y dos meriendas diarias, que cubren aproximadamente 85% del requerimiento energético diario

(1). Por cada MCD, tres madres cuidadoras y una promotora ofrecen atención integral a 30 niños, menores de seis años, en casas de la comunidad, situadas en zonas pobres de las ciudades (2). En 1998, se atendieron 42% de niños menores de 6 años en condiciones de pobreza (3), muchos de los cuales poseen madres trabajadoras fuera del hogar.

Dentro de los programas alimentarios, la satisfacción de la población atendida es una variable importante que detecta la calidad percibida y la aceptabilidad del servicio; además

es un indicador que mide el éxito en la gestión (4). En países industrializados, numerosos estudios miden la satisfacción del beneficiario por el servicio de alimentación recibido (4-7). Se ha reportado el desarrollo, validación y aplicación de cuestionarios que estiman la satisfacción alimentaria en pacientes y personal del área de la salud en centros médicos, donde la variable efectividad se relaciona con la satisfacción de los involucrados en el sistema de alimentación (8). Otro estudio señala la influencia positiva de ofrecer diversas elecciones de alimentos sobre la satisfacción de estudiantes de secundaria, detectada mediante el uso de un cuestionario (9). Sin embargo, en países menos industrializados, no es frecuente el uso de instrumentos para la evaluación de la satisfacción del beneficiario, por la ausencia de instrumentos válidos (10). Más aún, son pocos los programas estudiados en la práctica de atención al usuario, que han documentado procesos de cambio, como resultado de la intervención (11).

En Venezuela, el seguimiento y evaluación del programa de MCD, desde su inicio se concentró en cuantificar la cobertura y la ejecución del presupuesto asignado, aunque en puntuales estudios se han reportado datos más amplios sobre el componente salud y nutrición (3,12-15). Sin embargo, se necesita fortalecer la evaluación con aspectos cualitativos, desde la perspectiva del beneficiario. Para ello, es necesario la implementación de novedosos sistemas de evaluación, con la participación activa comunitaria en el monitoreo y evaluación de programas en nutrición (16).

El presente estudio documenta el proceso de desarrollar y validar dos escalas que miden la Satisfacción Alimentario-Nutricional (SAN) de representantes y madres cuidadoras de niños atendidos en el programa de MCD en una comunidad pobre urbana en Caracas, Venezuela.

METODOLOGIA

El trabajo se realizó en Antímamo, una comunidad pobre ubicada en Caracas, Venezuela. La presencia del personal del Centro de Atención Nutricional Infantil de Antímamo (CANIA) facilitó el acercamiento a los MCD y la captación de los participantes en el estudio. Este centro brinda atención médica y nutricional a los niños menores de seis años y el entorno familiar de esta comunidad, por lo que poseen amplios conocimientos del lugar (17,18). El grupo de estudio estuvo constituido por representantes de los niños usuarios del programa y las madres cuidadoras. Los representantes, son aquellos padres, tíos (as) o abuelos (as) encargados del niño ante el MCD. Las madres cuidadoras son las personas responsables del cuidado del niño en el MCD.

La investigación se desarrolló en dos fases, comprendidas desde marzo de 1998 a mayo de 1999.

En la primera fase, se utilizó la metodología naturalista-constructivista dentro del paradigma post-positivista (19, 20)

para recolectar, analizar e interpretar los datos. Las fuentes de datos incluyeron transcripciones de entrevistas, observación del programa, notas de campo y memos analíticos. Se seleccionó de manera intencional 10 de 21 MCD que al momento del estudio funcionaban en la comunidad, los cuales tenían una cobertura de 588 niños y niñas (17). Se entrevistó 10 representantes y 10 madres cuidadoras quienes fueron visitadas en los MCD. Cada entrevista de 30 a 45 minutos, fue grabada, transcrita y analizada. El análisis se realizó durante todo el proceso de recopilación de los datos. Se escribieron memos analíticos con las coincidencias y divergencias de cada entrevista, con la finalidad de detectar las categorías emergentes y las posibles relaciones entre estas categorías (20). Las categorías sirven de soporte para elaborar los ítemes que conforman las escalas de la Satisfacción Alimentaria-Nutricional y se elaboran considerando los aspectos que surgen de cada entrevista cualitativa. Los ítemes se elaboran a partir de las propias palabras de los entrevistados, lo que asegura la validez del contenido de las escalas. Las escalas tipo Likert (21), constan de cuatro puntos: siempre, a menudo, a veces y nunca; a los cuales se les asignó un puntaje ordinal indicativo del nivel de SAN en cada grupo. El puntaje varió entre ambas escalas, debido a que el número de ítemes en cada una fue diferente.

Se realizó un arbitraje sistemático por pares, durante todo el análisis para vigilar la confiabilidad y validez de las categorías que surgieron de las entrevistas. Cada escala que surge de las entrevistas realizadas a representantes y/o madres cuidadoras, representa la percepción de la Satisfacción Alimentaria-Nutricional de cada grupo.

La segunda fase de la investigación basada en el paradigma positivista, incluyó la pre-prueba de las escalas en 30 representantes y 15 madres cuidadoras. Las escalas se ajustaron después de verificar la consistencia de los factores y la replicabilidad del instrumento. La versión final se aplicó a 73 representantes y 32 madres cuidadoras en 7 MCD que no formaron parte de las muestras anteriores, lo que asegura la validez de los resultados (22). El tipo de muestreo fue no probabilístico intencional (23).

En las escalas se aplicó el análisis factorial y de componentes múltiples (*) (24) utilizando el paquete estadístico SYSTAT para Windows, versión 5 (25). Con el paquete estadístico SPSS, versión 7.5 para Windows, se verificó la confiabilidad de las escalas a través de la prueba

* El análisis factorial y de componentes múltiples genera "factores" o variables. Un factor es una combinación lineal de los ítemes basado en una matriz de correlación. Se interpreta como el reflejo de una dimensión del concepto que se pretende medir, en este caso la Satisfacción Alimentario-Nutricional (24).

de α -Cronbach ** (26), indicativa de confiabilidad, es decir, si la misma escala se administra repetidamente en una muestra, se obtendrán respuestas similares.

RESULTADOS

La Tabla 1 presenta el porcentaje de representantes según el nivel de SAN. La escala constó de 11 ítems y 4 puntos. El

nivel de SAN en representantes, se clasificó de la siguiente manera: Muy Satisfecho (22 - 33 puntos), Satisfecho (13 - 21 puntos), Insatisfecho (4 a 12 puntos) y Muy Insatisfecho (≤ 3 puntos). Como se indicó anteriormente, estos ítems surgen de las entrevistas cualitativas realizadas a este grupo, están redactados utilizando las propias palabras de los representantes y reflejan las principales percepciones sobre el componente alimentario-nutricional de los entrevistados.

TABLA 1
Porcentaje de representantes según nivel de satisfacción alimentaria-nutricional (n = 73)

Ítems que miden Satisfacción Alimentaria Nutricional *	Porcentaje según el nivel de SAN**			
	Muy Satisfecho	Satisfecho	Insatisfecho	Muy Insatisfecho
1. Le parece que las madres cuidadoras se preocupan por la alimentación de sus hijos.	88	10	1	1
2. Los niños se comen todos los alimentos, porque les gusta la comida que se les ofrece en el Multihogar.	82	14	4	0
3. Los niños se sienten satisfechos por lo sabroso de las comidas.	78	17	4	1
4. Las madres cuidadoras son ordenadas y limpiecitas cuando cocinan.	86	14	0	0
5. A los niños los alimentan bien, se les da lo que ellos realmente necesitan.	79	17	4	0
6. Es una gran ayuda para Ud. la alimentación y el cuidado que le dan a su niño.	92	8	0	0
7. Los niños que van al Multihogar están más fuertes, que otros niños que no asisten al hogar de cuidado.	58	19	15	8
8. Los niños que van al Multihogar están más repuestos, que otros niños que no asisten al hogar de cuidado.	67	22	10	1
9. A usted le mantienen informada(o) sobre como han comido los niños.	47	23	11	19
10. Hay suficientes alimentos en el Multihogar para que los niños reciban desayuno, merienda, almuerzo, y merienda cada día.	49	29	22	0
11. A usted le piden colaboración porque la comida en el Multihogar no alcanza.	30	29	11	30

* Cada ítem presentó 4 puntos : nunca, a veces, a menudo y siempre. A cada punto se le asignó 0, 1, 2, y 3 puntos respectivamente; a excepción del ítem 11, en que se asignó 3 puntos: nunca, 2 puntos: a veces, 1 punto: a menudo y 0 puntos: siempre.

**Muy Satisfecho: 22 - 33 puntos, Satisfecho: 13 - 21 puntos, Insatisfecho: 4 - 12 puntos, Muy Insatisfecho: ≤ 3 puntos.

En el ítem 1 relativo a la preocupación demostrada por las madres cuidadoras en el aspecto relativo a la alimentación de sus hijos: casi la totalidad de la muestra representada por el 98% de los representantes reflejó satisfacción. Los ítems 2 y 3, referidos a la satisfacción de los niños por la comida en el MCD, presentó elevados niveles de satisfacción, con 82% y 78% respectivamente; mientras que 4% y 5% indicó insatisfacción.

En el ítem 4, 86% de los representantes manifestó satisfacción debido al orden y aseo de las madres cuidadoras y no se reportó ningún indicio de insatisfacción. El ítem 5 sobre la alimentación que realmente necesitan los niños, resultó con un nivel elevado de satisfacción, y 4% de inconformidad. En el ítem 6, destaca 92% de la muestra muy satisfecha y 8% satisfecha, el cual se refiere a la ayuda que representa el MCD en la alimentación y cuidado del niño, en este sentido, se nota que desde la perspectiva del representante el programa cumple íntegramente con el objetivo principal para el cual ha sido creado-proveer a la madre, en especial las que trabajan fuera del hogar, ayuda en el cuidado de sus hijos.

Los resultados de los ítems 7 y 8 característicos del aspecto físico de los niños, señalan 23% y 11% de desagrado, aunque también se observó un elevado nivel de satisfacción; se puede observar que estos ítems fueron percibidos en forma distinta por los entrevistados.

El ítem 9, sobre la insatisfacción del representante debido a la falta de información sobre la alimentación del niño, generó 22% de inconformidad. En este sentido, es necesario considerar que la responsabilidad de preguntar e informar sobre el estado de la alimentación de los niños, debe ser compartida entre las madres cuidadoras y los representantes.

El ítem 10 referido a la suficiencia de alimentos en el MCD para que los niños reciban las comidas establecidas por el programa presentó 22% de inconformidad. Esta es la

** El α Cronbach es una medición de consistencia interna, que selecciona grupos de pares múltiples al azar, correlaciona los puntajes de cada par y utiliza las mezclas de correlaciones entre los grupos de pares (26).

principal debilidad del programa desde el punto de vista alimentario-nutricional, ya que al no disponer de suficientes alimentos, resulta imposible cubrir los objetivos del programa, además los principales afectados son los niños beneficiarios, quienes estarían recibiendo una alimentación de menor calidad y/o cantidad.

El ítem 11 surge por el desagrado del representante debido a la insuficiencia de alimentos y como una medida necesaria para que el multihogar no deje de funcionar. Se refiere a la colaboración solicitada a representantes, en este sentido, 41% manifestó algún grado de insatisfacción.

En la Tabla 2 se presenta el análisis factorial y de componentes principales a la escala de los representantes.

Surgen 3 factores que reflejaron dimensiones de la variable "Satisfacción Alimentaria-Nutricional", manifestadas por los representantes. Los factores se conceptualizaron según el grado de cohesión entre los ítems presentes en el mismo factor. El factor 1 se denominó *factores que causan satisfacción a los representantes*. En esta dimensión se correlacionan los ítems 1, 2, 3, 4, 5 y 6 que explicaron 25,81% de la variación de la SAN. Incluyen diferentes aspectos sobre la ayuda, el cuidado, la alimentación, la higiene brindada por el multihogar y el rol fundamental de las madres cuidadoras en brindar la atención necesaria a los niños beneficiarios.

TABLA 2
Análisis factorial de escala de satisfacción alimentaria-nutricional en representantes (n = 73)

Ítems que miden Satisfacción Alimentaria Nutricional	Factor 1	Factor 2	Factor 3
1. Le parece que las madres cuidadoras se preocupan por la alimentación de sus hijos.	<u>0.82</u>	0.02	0.10
2. Los niños se comen todos los alimentos, porque les gusta la comida que se les ofrece en el Multihogar.	<u>0.78</u>	0.18	-0.04
3. Los niños se sienten satisfechos por lo sabroso de las comidas.	<u>0.76</u>	0.03	0.16
4. Las madres cuidadoras son ordenadas y limpiecitas cuando cocinan.	<u>0.54</u>	0.23	0.52
5. A los niños los alimentan bien, se les da lo que ellos realmente necesitan.	<u>0.54</u>	0.20	0.51
6. Es una gran ayuda para Ud. la alimentación y el cuidado que le dan a su niño.	<u>0.51</u>	0.06	0.47
7. Los niños que van al Multihogar están más fuertes, que otros niños que no asisten al hogar de cuidado.	0.15	<u>0.90</u>	0.03
8. Los niños que van al Multihogar están más repuestos, que otros niños que no asisten al hogar de cuidado.	0.09	<u>0.87</u>	0.19
9. A usted le mantienen informada(o) sobre como han comido los niños.	0.17	0.08	<u>0.69</u>
10. Hay suficientes alimentos en el Multihogar para que los niños reciban desayuno, merienda, almuerzo, y merienda cada día.	0.17	0.06	<u>0.67</u>
11. A usted le piden colaboración porque la comida en el Multihogar no alcanza.	0.10	0.14	<u>0.58</u>
Total variación explicada por los ítems *	25.81	15.92	19.25

El total de la variación es la sumatoria del factor 1,2 y 3. En esta escala, los ítems señalados explican 61% de la variación en la variable SAN: Nota: los valores en negrilla representan los ítems que más se adhieren al factor. Se escogieron los valores mayores a 0.50, debido a que indican mayor cohesión al factor.

El factor 2 se denominó *aspecto físico de los niños beneficiarios*, conformado por los ítems 7 y 8 que explican 15,92 % de la variación de la SAN. Se refieren a características percibidas por los representantes, que indican un adecuado nivel de bienestar físico de los niños y que se compara con otros niños que no son beneficiarios del programa de multihogares.

El factor 3 se refiere a la *gerencia del componente Alimentario-Nutricional del MCD*, comprende los ítems 9, 10 y 11, que indican una variación de 19,25% de la variable SAN. Estos ítems caracterizan algunos aspectos sobre la disponibilidad y acceso de alimentos y la solicitud de colaboración por parte de los representantes debido a la escasez alimentaria en los multihogares, sin embargo, la responsabilidad, en este sentido, es de los organismos financiadores del programa.

Los 3 factores explican en conjunto 60,98% de la variación en la variable SAN definida por los 11 ítems. El coeficiente de consistencia interna, dado por α Cronbach fue 0,74, indicativo de una escala confiable y precisa.

La Tabla 3 presenta el porcentaje de madres cuidadoras según el nivel de SAN de la escala desarrollada -19 ítems, 4 puntos-. Esta escala consta de un mayor número de ítems debido a la mayor cantidad de información que surgió de las entrevistas cualitativas, debido a que las madres cuidadoras se encuentran más involucradas en el funcionamiento diario del programa. En este instrumento, la clasificación de SAN según el puntaje obtenido fue: Muy Satisfecha (38-57 puntos), Satisfecha (21-37 puntos), Insatisfecha (4-20 puntos) y Muy Insatisfecha (≤ 3 puntos).

TABLA 3
Porcentaje de madres cuidadoras según nivel de satisfacción alimentaria-nutricional (n=32)

Ítemes que miden Satisfacción Alimentaria Nutricional *	Porcentaje según el nivel de SAN**			
	Muy Satisfecho	Satisfecho	Insatisfecho	Muy Insatisfecho
1. A los niños los enseñan a comer combinando diferentes tipos de alimentos.	84	13	3	0
2. Los niños se sienten satisfechos por lo sabroso de las comidas.	81	16	3	0
3. A los niños los alimentan bien, les dan lo que ellos realmente necesitan.	81	13	6	0
4. Los niños quedan llenos cuando comen en el Multihogar.	91	6	3	0
5. Se toman en cuenta los gustos de los niños en la preparación de las comidas.	66	25	9	0
6. Los alimentos llegan a tiempo al Multihogar.	53	9	35	3
7. Los alimentos disponibles permiten cumplir menú recomendado por Ministerio de Familia.	63	9	28	0
8. Hay suficientes alimentos para que los niños reciban desayuno, merienda, almuerzo, y merienda cada día.	50	25	25	0
9. La cantidad de alimentos disponibles, es suficiente para el número de niños.	81	6	13	0
10. A los niños se les sirve la comida variada cada día en el Multihogar.	97	3	0	0
11. A los niños chiquitos se les sirve poquita comida y a los niños grandes se les dan raciones más grandes.	91	3	6	0
12. Enseñan buenas costumbres antes de comer como lavarse las manos y los dientes después de comer.	91	9	0	0
13. Niños hacen comentarios buenos o gestos, como poner caras de contentos, porque les gusta la comida.	84	9	3	3
14. A los niños se les sirve porciones de alimentos que los satisfacen.	94	6	0	0
15. La comida tiene buen sabor porque le ponen suficientes aliños.	91	6	3	0
16. Usted pone de su dinero para comprar alimentos, porque la comida no alcanza.	72	22	6	0
17. A los niños se les da la oportunidad de repetir comida si ellos lo desean.	66	3	28	3
18. Toma en cuenta para la preparación de alimentos, la posibilidad de que los niños repitan la comida.	84	6	6	3
19. En las comidas, sólo comen los niños y adultos que pertenecen al Multihogar.	69	25	6	0

Cada ítem presentó 4 puntos : nunca, a veces, a menudo y siempre. A cada punto se le asignó 0, 1, 2, y 3 puntos respectivamente; a excepción del ítem 16, que se asignó

puntos: nunca, 2 puntos: a veces, 1 punto: a menudo y 0 puntos: siempre.

**Muy Satisfecho: 38-57 puntos, Satisfecho: 21-37 puntos, Insatisfecho: 4-20 puntos, Muy Insatisfecho: ≤ 3puntos.

Los ítemes 1, 2, 3, 5, 9, 10, 13, 16 y 18 se refieren a la diversificación alimentaria, los comentarios o gestos de los niños por la comida, la posibilidad de repetir alimentos, lo sabroso de las comidas, la satisfacción de las necesidades nutricionales, las preferencias alimentarias, la solicitud de colaboración monetaria y la suficiencia de alimentos según el número de niños, los cuales son atributos que reflejan niveles de SAN superiores a 80%.

Para las madres cuidadoras, el ítem 10, relativo a la *variedad de la alimentación de los niños en el MCD*, provee el más alto nivel de satisfacción (97%). En segundo lugar, los ítemes 4, 11, 12, 14, 15 representaron las porciones de alimentos, las buenas costumbres que se enseñan a los niños, la saciedad de los niños al comer, el buen sabor de los alimentos y la distribución adecuada de las raciones según el tamaño del niño; las cuales son características percibidas con niveles de SAN superiores al 90%. Se distingue una alimentación bien esmerada y cuidadosamente preparada, dentro de un ambiente de escasos recursos típico de los MCD, situación que refleja entrega y mística de trabajo de las madres cuidadoras en la comunidad estudiada.

Únicamente, los ítemes 6, 7, 8, 9 y 17 referidos a la regularidad de los insumos alimentarios, la oportunidad de los niños para repetir alimentos, la disponibilidad alimentaria para cumplir el menú recomendado, la suficiencia de alimentos para cubrir con el número de comidas establecidas por el programa y la disponibilidad alimentaria para el número de niños; presentaron el porcentaje mayor de insatisfacción, expresado con un valor máximo de 38% en el ítem 6, sobre la regularidad del abastecimiento alimentario.

Los resultados arrojados por los ítemes 3 y 9 al compararse con el ítem 7 pudieran parecer incoherentes, sin embargo, no es así, considerando que las madres cuidadoras perciben que a los niños se les provee de una buena alimentación y que los alimentos disponibles son suficientes para el número de niños; pero resulta difícil cumplir el menú recomendado por los entes gubernamentales, por la falta de continuidad en la transferencia de recursos económicos. Es frecuente observar que los menús recomendados no se adaptan a las potencialidades locales.

Cabe destacar que los ítemes 17 y 18 que se refieren a «la posibilidad de repetir comida» pueden ser percibidos

negativamente, considerando que las alteraciones nutricionales por exceso se inician desde temprana edad. Sin embargo, esta medida podría ser necesaria debido a los reportes de las madres cuidadoras sobre la insuficiencia de alimentos en los hogares de los niños (27).

La Tabla 4 muestra los 5 factores que surgieron del análisis factorial y de componentes múltiples y que conceptualizan cinco dimensiones de la variable SAN. El factor 1 se denominó *aspectos de la planificación en la alimentación del niño beneficiario*. En esta dimensión se correlacionaron

los ítemes 1, 2, 3, 4, y 5, que explicaron 18,6% de la variación en la variable SAN. Dichos aspectos consideran variables que son responsabilidad de las madres cuidadoras, y que se relacionan con su creatividad al planificar y elaborar los menús de los niños. También depende de los entes que dirigen el programa, debido a su responsabilidad en la capacitación de las madres cuidadoras en educación nutricional y sobre las destrezas alimentarias que pueden mejorar la preparación y utilización de los alimentos.

TABLA 4
Análisis factorial de la escala de satisfacción alimentaria nutricional en madres cuidadoras (n= 32)

Ítemes que miden Satisfacción Alimentaria Nutricional	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5
1. A los niños los enseñan a comer combinando diferentes tipos de alimentos.	<u>0.92</u>	0.18	0.01	0.00	0.04
2. Los niños se sienten satisfechos por lo sabroso de las comidas.	<u>0.87</u>	0.11	-0.02	0.01	0.00
3. A los niños los alimentan bien, les dan lo que ellos realmente necesitan.	0.83	0.17	-0.05	0.03	0.21
4. Los niños quedan llenos cuando comen en el Multihogar.	<u>0.60</u>	0.04	0.37	0.07	0.22
5. Se toman en cuenta los gustos de los niños en la preparación de las comidas.	0.55	0.38	-0.08	0.12	0.19
6. Los alimentos llegan a tiempo al Multihogar.	0.14	<u>0.86</u>	-0.07	0.03	-0.07
7. Los alimentos disponibles permiten cumplir con menú recomendado por Ministerio de Familia.	0.15	<u>0.81</u>	0.02	0.00	0.26
8. Hay suficientes alimentos para que los niños reciban desayuno, merienda, almuerzo, y merienda cada día.	0.19	<u>0.77</u>	0.12	-0.11	-0.26
9. La cantidad de alimentos disponibles, es suficiente para el número de niños.	0.33	<u>0.76</u>	0.05	-0.04	0.25
10. A los niños se les sirve la comida variada cada día en el Multihogar.	-0.05	-0.04	<u>0.80</u>	0.01	0.06
11. A los niños chiquitos se les sirve poquita comida y a los niños grandes se les dan raciones más grandes.	-0.02	0.03	<u>0.75</u>	0.11	0.02
12. Enseñan buenas costumbres antes de comer como lavarse las manos y los dientes después de comer.	0.07	0.09	<u>0.72</u>	<u>-0.53</u>	-0.05
13. Niños hacen comentarios buenos o gestos, como poner caras de contentos, porque les gusta a comida.	0.06	-0.25	-0.03	<u>-0.84</u>	-0.08
14. A los niños se les sirve porciones de alimentos que los satisfacen.	-0.14	0.27	0.03	<u>-0.69</u>	-0.19
15. La comida tiene buen sabor porque le ponen suficientes aliños.	-0.26	0.22	-0.15	<u>-0.56</u>	0.54
16. Usted pone de su dinero para comprar alimentos, porque la comida no alcanza.	-0.13	0.40	0.13	-0.14	<u>-0.62</u>
17. A los niños se les da la oportunidad de repetir comida si ellos lo desean.	0.19	0.13	0.46	0.11	<u>0.61</u>
18. Toma en cuenta para la preparación de alimentos, la posibilidad de que los niños repitan la comida.	0.44	0.21	-0.11	-0.26	<u>0.59</u>
19. En las comidas, sólo comen los niños y adultos que pertenecen al Multihogar.	-0.02	-0.07	-0.21	-0.25	-0.58
Total variación explicada por los ítemes *	18.66	17.22	11.78	10.57	11.13

El total de la variación es la sumatoria del factor 1, 2, 3, 4 y 5. En esta escala, los ítemes señalados explican 69% de la variación en la variable SAN. Nota: los valores en negrilla representan los ítemes que más se adhieren al factor. Se escogieron los valores mayores a 0.50, debido a que indican mayor cohesión al factor.

El factor 2 denominado *suficiencia de alimentos*, estuvo conformado por los ítemes 6, 7, 8 y 9, que explicaron 17,2 % de la variación en la satisfacción de las cuidadoras con el componente alimentario-nutricional del programa. Se refieren al acceso alimentario en los MCD, el cual es una variable que depende directamente de los organismos que dirigen el programa y es una de las dimensiones que presenta mayor debilidad.

El factor 3 denominado *manifestaciones de las destrezas de las madres cuidadoras en aspectos relacionados con la alimentación del niño*, comprende los ítemes 10, 11 y 12

que explican 11,78% de la variación determinado por este factor. Se enfoca en las habilidades demostradas por las madres cuidadoras que permiten mejorar la calidad del servicio de alimentación y nutrición del programa.

El factor 4 se refiere a *las causas y manifestaciones de la satisfacción de los niños por la alimentación*, con los ítemes 13, 14 y 15 que explicaron 10,57% de la variación de la SAN. Se manifiesta como las características observadas y percibidas por las madres cuidadoras, que permiten conocer el nivel de agrado de los niños por los alimentos ofrecidos en el multihogar.

El factor 5 captó las *prácticas en los MCD que determinan el acceso alimentario*, el cual incluye los ítemes 16, 17, 18 y 19, que explican 11,13% de la variación de la SAN. Son estrategias de las madres cuidadoras que permiten enfrentar la escasez de alimentos y practicas que disminuyen la cantidad de alimentos dentro del multihogar, aunque aumentan la seguridad alimentaria de otros individuos de la comunidad, como por ejemplo, el hecho de que algunos adultos o niños consumen alguna comida en el multihogar, aunque no pertenecen al mismo.

Los 5 factores explicaron en conjunto 69,36% de la variación en la variable SAN de las madres cuidadoras definida por los 19 ítemes. El coeficiente de consistencia interna, dado por el α Cronbach fue de 0,77, valor que indicó buena confiabilidad y precisión de la escala.

En términos globales, los niveles de satisfacción por el componente alimentario-nutricional de los MCD en representantes y madres cuidadoras son altos (74% y 94% muy satisfechas, respectivamente). No existen diferencias significativas ($p = 0,06$) en el nivel de satisfacción entre los representantes y las madres cuidadoras.

DISCUSION

El elevado nivel de Satisfacción Alimentaria-Nutricional de los representantes y madres cuidadoras permiten concluir que el componente alimentario-nutricional es ampliamente aceptado y contribuye a fortalecer la seguridad alimentaria de niños, representantes y madres cuidadoras. Posiblemente está influenciado por la presencia de CANIA en la comunidad de Antímamo, institución que capacita a madres cuidadoras, atiende a representantes y niños con problemas nutricionales (18). Los aspectos que más inconformidad causaron en los representantes se refirieron a la colaboración en términos monetarios, la falta de información sobre la alimentación de los niños y la inestabilidad e insuficiencia del suministro de alimentos en el MCD. La necesidad de pedir colaboración y la insuficiencia alimentaria, son factores externos que las madres cuidadoras no pueden controlar. La solución depende de la institución gubernamental encargada del programa, en velar por un abastecimiento alimentario regular y oportuno. Se observa concordancia en las percepciones de representantes y madres cuidadoras con respecto a la falta de regularidad en el suministro y la insuficiencia de los alimentos, para cumplir con los objetivos del programa; además, otro derivado de los anteriores, es la poca factibilidad de cumplir con el menú recomendado.

Terán y colaboradores señalan la necesidad de capacitar a las madres cuidadoras en el manejo de raciones de alimentos (28). Otros autores argumentan que las madres cuidadoras poseen bajo nivel educativo y cultural, falta de higiene, baja eficiencia y poca creatividad laboral (12). Por el contrario,

en el presente estudio destaca la adecuada planificación y los múltiples ajustes que realizan las madres cuidadoras para mejorar la alimentación de los niños. Un estudio puntual sobre los hogares de cuidado diario en Caracas, señaló un elevado incumplimiento del menú (29); situación semejante a la reportada por el ítem sobre este aspecto, en la escala de las madres cuidadoras.

Se concluye que las escalas resultan una herramienta altamente válidas y confiables para valorar y vigilar la variable SAN en representantes y madres cuidadoras en la comunidad estudiada. Existe la posibilidad de aplicar las escalas en otras comunidades, aunque es necesaria su validación externa

El desarrollo de estas escalas constituye una novedosa forma de hacer seguimiento y evaluación de programas con componentes alimentario-nutricionales, en diferentes grupos poblacionales (4-9, 30, 31). Sirve como instrumento para incrementar la participación comunitaria, elemento que cada día cobra más importancia (16). Sin embargo, se requiere elevada rigurosidad, laboriosidad e inversión de tiempo para la construcción y análisis de estas formas de evaluación. Una vez desarrollado y validado el instrumento, es sencillo de aplicar y aporta información complementaria sobre aspectos no detectados en otros tipos de evaluaciones. Se recomienda la complementación de este tipo de instrumento con algún otro de naturaleza cuantitativa (32) para así lograr una visión global obtenida desde diferentes perspectivas.

Es recomendable la utilización de estos instrumentos periódicamente para detectar aspectos del servicio en alimentación y nutrición que se deben afianzar, y los que se deben modificar, información que resulta útil para el mejoramiento del funcionamiento del programa. La información sobre estas nuevas formas de evaluación, que surgen de esta investigación es de interés para la comunidad organizada, instituciones gubernamentales, no gubernamentales, centros de investigación y entes académicos. Además, aporta insumos para la reorientación de objetivos y acciones del programa, a fin de obtener más éxito en la implementación del mismo.

AGRADECIMIENTO

Se agradece el apoyo brindado al Instituto Nacional de Nutrición, Centro de Atención Nutricional Infantil de Antímamo-CANIA y SENIFA para la realización de este estudio. Se reconocen las valiosas observaciones técnicas de la Dra. Maritza Landaeta de Jiménez y el Dr. Miguel Martínez Miguelez.

REFERENCIAS

1. Ministerio de la Familia, SENIFA, Fundación Cavendes. Guías de alimentación para Venezuela del niño menor de seis años. Manual para hogares y multihogares de cuidado diario. Ediciones Cavendes, Caracas, 1996.
2. Gonzalo M. Documentación sobre el proceso de masificación de los hogares de cuidado diario. Ed. Fundación del Niño, Caracas, 1993.
3. Piñango N. 24 años de Historia, los Hogares y Multihogares de Cuidado Diario 1974-98. Ed. Ministerio de la Familia – SENIFA, Caracas, 1998.
4. Meyer MK. Top predictors of middle/junior high school students' satisfaction with school foodservice and nutrition programs. *J Am Diet Assoc* 2000; 100 (1): 100-103.
5. Meyer MK, Conklin MT. Variables affecting high school students' perceptions of school foodservice. *J Am Diet Assoc* 1998; 98 (12): 1424-1428.
6. Lau C, Gregoire MB. Quality ratings of a hospital foodservice department by inpatients and postdischarge patients. *J Am Diet Assoc* 1998; 98: 1303-1307.
7. Courney MR. The evaluation of a new clinical nutrition service delivery model [thesis]. Chicago, III: Rush University, 1998. Comentado en: *J Am Diet Assoc* 2000; 100(4): 460-463.
8. Oyarzun VE, Laffery LJ, Gregoire MB, Sowa DC, Dowling RA, Shott S. Evaluation of efficiency and effectiveness measurements of a food service system that included a spoken menu. *J Am Diet Assoc* 2000; 100 (4): 460-463.
9. Meyer MK. Influence of food choices on high school students' perception of school foodservice. *J Am Diet Assoc* 2000; 100 (8): 952-954.
10. Etter J, Perneger T. Validating a satisfaction questionnaire using multiple approaches: a case study. *Soc Sci Med* 1997; 45 (6): 879-885.
11. Engle P, Lhotska L. The role of care in programmatic actions for nutrition: Designing programmes involving care. *Food and Nutr Bull* 1999; 20 (1): 121-135.
12. Ledezma T, Padrón C. Los indicadores sociales y el análisis de la situación social. Ed. Universidad Central de Venezuela, CODEX-FACES 63, Caracas, 1996.
13. Universidad Católica Andrés Bello, Instituto de Investigaciones Económicas y Sociales. Reporte de resultados Sistema de seguimiento a los MCD, 1º operativo. UCAB, Caracas, 1993.
14. Universidad Católica Andrés Bello, Instituto de Investigaciones Económicas y Sociales. Reporte de resultados Sistema de seguimiento a los MCD, 2º operativo. UCAB, Caracas, 1993.
15. Universidad Católica Andrés Bello, Instituto de Investigaciones Económicas y Sociales. Reporte de resultados del Sistema de seguimiento y evaluación del programa Hogares y MCD, 3º operativo. UCAB, Caracas, 1996.
16. Levinson FJ, Rogers BL, Hicks KM, Schaetzel T, Troy L, Young C. Monitoring and evaluation of nutrition programs in developing countries. *Nutr Reviews* 1999; 57 (5): 157-164.
17. Centro de Atención Nutricional Infantil de Antimano - CANIA. La sectorización como estrategia de trabajo en CANIA. Ed. CANIA, Caracas, 1999.
18. Centro de Atención Nutricional Infantil de Antimano - CANIA. Boletín de Nutrición Infantil CANIA. Ed. CANIA, Caracas, 1998.
19. Guba G, Lincoln S. Fourth generation evaluation. Sage publications, California: Newbury Park, 1989.
20. Martínez M. La investigación cualitativa etnográfica en educación: manual teórico práctico. 3ª ed. Trillas, México, 1998.
21. Smith M. Contemporary Communication Research Methods. Wadsworth publishing co, California: Belmont, 1988.
22. Riegelman R, Hirsch R. Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica. Publicación Científica N° 531, OPS, Washington, 1992.
23. Hurtado L, Toro G. Paradigmas y métodos de investigación en tiempos de cambio. Episteme Consultores Asociados, Carabobo, 1997.
24. Polit D, Hungler B. Investigación Científica en Ciencias de la Salud. 4ª ed, México, 1994.
25. Wilkinson L, Hill M, Welna J. SYSTAT for Windows: Statistics, versión 5. Evanston, IL, Illionis, 1992.
26. Cronbach L. Coefficient α and the internal structure of test. *Psychometrika*, 1951: 16.
27. Bernal J y Lorenzana P. Escalas que miden la satisfacción alimentara-nutricional en Multihogares de Cuidado Diario. Universidad Simón Bolívar (Tesis), Sartenejas, 1999.
28. Terán MC, Rodríguez M, Tovar A. Programa de Hogares de Cuidado Diario, plan de extensión masiva Venezuela, estudio de caso. Ministerio de la Familia y Fundación del Niño, Caracas, 1993.
29. Fundación del Niño, Instituto Nacional de Nutrición, Fundación Cavendes. Investigación sobre el estado nutricional de los niños en los Hogares de Cuidado Diario de Caracas. Fundación del Niño, Caracas, 1979.
30. Satia JA, Patterson RE, Taylor VM, Cheney CL, Shiu-Thornton S, Chitnarong K, Kristal AR. Use of qualitative methods to study diet, aculturation, and health in Chinese-American women. *J Am Diet Assoc* 2000; 100 (8): 934-940.
31. Nahikian-Nelms M. Influential factors of caregiver behavior at mealtime: A study of 24 child-care programs. *J Am Diet Assoc* 1997; 97 (5): 505-509.
32. Patton M. Qualitative evaluation and research methods. 2ª ed. Sage, California, 1990.

Recibido: 23-02-2001

Aceptado: 31-10-2001

Modificaciones de las lipoproteínas del plasma después del uso dietético de la oleína de palma en adultos sanos

Virgilio Bosch, Ada Aular, José Medina, Neptalí Ortiz, Rafael Apitz

Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad Central de Venezuela. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC- Venezuela

RESUMEN. Desde hace mucho tiempo se conocen los efectos dañinos de los ácidos grasos saturados sobre los niveles de colesterol y triglicéridos de la sangre, pero investigaciones recientes han desarrollado nuevos conceptos sobre el problema. El objetivo del presente estudio fue conocer el efecto del consumo de la oleína de palma sobre los niveles de triacilglicéridos y colesterol plasmáticos y de las fracciones lipoproteicas en individuos sanos de ambos sexos. **Materiales y método:** A 60 individuos, 45 hombres y 15 mujeres, entre 19 y 45 años, divididos en tres grupos, se les administraron diferentes tipos de grasas durante 12 semanas: al grupo mezcla (GM), se le administró aceite, margarina y mayonesa, preparadas con oleína al 50%, el grupo oleína (GO) consumió grasas preparada con oleína al 100% y el grupo control (GC) consumió grasas de uso habitual en la población. Las dietas proporcionaron entre el 25% y 30% de las calorías provenientes de las grasas. Se obtuvieron muestras de sangre para el análisis de los lípidos al inicio y al final del estudio. Las concentraciones de colesterol y triacilglicéridos plasmáticos se determinaron por métodos enzimáticos y las lipoproteínas (VLDL, LDL, y HDL) por ultracentrifugación. **Resultados y discusión:** Al comparar las medias de los grupos no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los lípidos de la sangre. Las diferencias individuales muestran un ligero aumento de las VLDL-C en el GO comparado con el GM y el GC. No se encontraron diferencias en la concentración de LDL. **Conclusiones:** Estos resultados aportan evidencias para diferenciar los efectos entre los aceites vegetales saturados como el de coco y la oleína de palma, por lo que se recomienda no extrapolar los efectos de un tipo de aceite a otro en lo que respecta a la elevación del CT sanguíneo. **Palabras clave:** Colesterol total, triacilglicéridos, dieta, oleína de palma.

SUMMARY. Modifications of plasma lipoproteins after use of palm olein in the diet of a group healthy adults. Although saturated fat acids have long known to have harmful effects on cholesterol and triacylglycerides levels in blood, new concepts have emerged from recent research on this matter. The purpose of this study was to know the effect of the consumption of palm olein on triacylglycerides and cholesterol levels as well as lipoprotein fractions in the blood plasma of healthy individuals from both sexes. **Materials and methods:** Different types of fats were administered for 12 weeks to 60 subjects, 45 male, 15 female, between 19 and 45 years of age, who were divided into three groups: the mix group (MG) was administered oil, margarine, and mayonnaise prepared with 50% olein; the olein group (OG) consumed fats prepared with 100% olein; and the control group (CG) consumed regular fats of customary use by the population. The diets provided 25 to 30% of calories. Blood samples were obtained for lipid analysis at the beginning and the end of the study. Plasma triacylglycerides and cholesterol concentrations were determined by means of enzyme and lipoprotein methods (VLDL, LDL; and HDL) by ultracentrifugation. **Results and discussion:** By comparing the groups' means no significant differences were found ($p > 0.05$) in blood lipids. Individual differences show a slight increase in VLDL-C in OG compared to MG and CG. No differences were found in LDL concentration. **Conclusions:** These results contribute evidence to differentiate between the effects of saturated vegetable oils, such as coconut oil, and of palm olein. The authors recommend not extrapolate the effects of type of oil to another in connection with TC increase in blood.

Key words: Total cholesterol, triacylglycerides, diet, palm oil.

INTRODUCCION

Para la década de los años 60 ya se conocían los trabajos metabólicos que habían sentado las relaciones entre el consumo de ácidos grasos de la dieta y la concentración del colesterol del plasma (1-3) y se tenía claro el concepto que el proceso de la aterogénesis dependía, entre otros factores, del colesterol del plasma (4). Como consecuencia de estas investigaciones se estableció una expresión cuantitativa probable del cambio de la concentración del colesterol del

plasma al cambiar los ácidos grasos de la dieta. Se llegó a pensar que bastaba con conocer la relación P/S de una dieta para conocer su influencia sobre los lípidos del plasma. Sin embargo, investigaciones posteriores indicaron que el ácido oleico podía producir un descenso del colesterol del plasma de la misma magnitud que el linoleico (5). Además se observó que el ácido estearico, que es un ácido graso saturado no aumentaba la concentración del colesterol del plasma, mas bien podía inducir un descenso de éste, al sustituir a otros ácidos grasos saturados (6). Mas recientemente, Hayes y sus

colaboradores han mostrado que el ácido palmítico, otro de los ácidos grasos saturados abundantes en los alimentos como el aceite de palma, tampoco tiene una influencia marcada en muchas condiciones nutricionales, hasta el punto que en la fórmula de predicción del colesterol del plasma en primates, Hayes (7) establece que la influencia del palmítico es tan insignificante en esas condiciones, que desaparece de la expresión de regresión y ocupa aquí un rol predominante el ácido mirístico. Hayes y colaboradores al hacer un metanálisis de numerosas investigaciones en humanos, consideran que el ácido palmítico comienza a tener influencia en el colesterol del plasma cuando su valor es superior a los 200 mg/dL. Estos autores establecen, además, que la influencia beneficiosa del linoleico alcanza un límite cuando llega a 75% de las calorías totales, de ahí en adelante ya no influye mucho en el colesterol del plasma (7). Esta importante información establece la gran diferencia entre el aceite de palma y las grasas animales; estas últimas tienden a tener una proporción considerable de ácido mirístico, mientras el aceite de palma tiene menos del 1%.

En lo que respecta a Venezuela, podría decirse que la población obtiene de las grasas cerca del 30% de las calorías diarias, repartidas casi por igual entre grasas vegetales y animales (8). Una parte importante de las primeras está representada por el aceite vegetal comestible (30 mL/p/d), puro o mezclado, el cual constituye la principal fuente de los ácidos grasos de la dieta.

A mediados de la década de los años 70, comienza en el país una merma en la producción de aceite de ajonjolí, principal aceite comestible hasta entonces, lo cual obligó a pensar en la importación de materia prima oleaginosa para reemplazar la producción nacional en descenso. En ese momento, dos grandes productos mantenían el ritmo creciente más alto en el mundo: el aceite de palma y el de soja, por lo que el interés se centró en estas dos posibilidades.

De acuerdo a la composición de los ácidos grasos que aparece en la Tabla 1, se puede deducir que si en Venezuela se sustituyera el aceite de ajonjolí por palma, se produciría un descenso de ácidos grasos poliinsaturados y un ascenso de los ácidos grasos saturados. Es oportuno indicar que la mayoría de los trabajos que han conducido a estas predicciones cuantitativas se han hecho con consumo del orden del 30% o más de las calorías en forma de grasa. No se conoce con certeza como variarían las fórmulas mencionadas anteriormente al variar el contenido total de grasa de una dieta, el contenido de fibra, de tocotrienoles, tocoferoles, de ácidos grasos "trans" y distintos minerales. Es por ello que en este estudio se propuso investigar el efecto de una grasa altamente saturada como la oleína de palma en individuos sanos, normocolesterolémicos, sobre la concentración de lípidos y lipoproteínas del plasma a través de la administración de dietas preparadas con oleína de palma.

TABLA 1
Composición porcentual en ácidos grasos de algunos aceites vegetales comestibles

Aceite vegetal	Ácidos grasos		
	Poliinsaturados	Monoinsaturados	Saturados
Oleína de palma	10,9	39,0	50,0
Ajonjolí	45,6	38,9	15,5
Soja	61,3	22,4	16,4
Algodón	53,1	19,3	27,5
Maíz	51,8	32,6	15,6
Girasol	66,4	21,3	12,2

Fuente: Cottrel RC. Am.J.Clin Nutr: 53:989S-1009S

MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental

El diseño experimental fue tipo doble ciego, y consistió en administrar dietas preparadas con distintos tipos de grasa a 60 individuos sanos, 15 mujeres y 45 hombres; entre las edades de 19 y 45, años quienes se prestaron voluntariamente a participar en el estudio. La mayoría de ellos procedía de El Zamuro, población rural distante 25 minutos de la Ciudad de Maturín, Estado Monagas, Venezuela, en la cual se desarrolló el estudio.

Antes de someterse a los exámenes previos para determinar su elegibilidad, todos los voluntarios firmaron estar acuerdo de participar en el estudio, de conformidad al protocolo de Helsinki.

Grupo de estudio

Los 60 voluntarios fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos para la administración de las dietas experimentales: El grupo Control recibió la dieta preparada con aceite vegetal, mayonesa y margarina especialmente elaborada con aceite de soja y girasol en iguales proporciones. El grupo Mezcla, recibió dietas preparadas con grasas que contenían 25% aceite de soja, 25% aceite de girasol y 50% oleína de palma y un tercer grupo, llamado Oleína, recibió dietas preparadas con grasas provenientes en 100% de oleína de palma.

Alimentación de los voluntarios

Una encuesta dietética para caracterizar el tipo de alimentos consumidos por el grupo seleccionado, permitió ajustar los menús a los hábitos de los voluntarios. Estos menús consistieron en preparaciones basadas en recetas típicas venezolanas distribuidas en diez menús que se rotaron cada dos semanas. Las comidas se elaboraron con alimentos frescos adquiridos en mercados locales a los que se le añadía

la grasa de acuerdo a indicaciones escritas. Las dietas debían suministrar 65%, 1.600 Kcal, de la energía diaria requerida por cada individuo, cuyas necesidades fueron calculadas siguiendo la metodología FAO/OMS/UNU, reportada en la Publicación Serie de Informes Técnicos N° 724, Ginebra, 1985 (9). Se estableció el criterio que las proteínas aportarían entre el 15% y 17% de las calorías, las grasas entre el 25% y el 28% y el resto, los hidratos de carbono.

Se sirvieron dos comidas diarias (almuerzo y cena) a cada sujeto, de lunes a viernes en un local organizado como comedor cerca de la cocina experimental donde fueron preparadas las comidas por personal adiestrado y supervisado permanentemente. Los fines de semana y días feriados del periodo de estudio, los voluntarios tenían absoluta libertad de consumir cualquier alimento. Las dietas se suministraron durante 12 semanas y la asistencia a las comidas fue controlada diariamente por nutricionistas, quienes además tallaron y pesaron a los voluntarios al inicio del estudio y llevaron un control semanal del peso corporal.

A fin de llevar control del añadido de las grasas experimentales a los alimentos se tomaron muestras al azar de la comida servida, las cuales después de ser homogeneizadas en el sitio de la recolección, fueron analizadas en el Laboratorio de Lipidología del Instituto de Medicina Experimental de la UCV, donde se les determinó el contenido de ácidos grasos por la técnica de cromatografía en fase gas/líquido en columnas empacadas con Chromosorb/PEGA-5% en un cromatógrafo Hewlett-Packard, USA, 5880-A, después de la extracción de los lípidos con el sistema de solventes cloroformo-metano-agua, transmetilación con ácido sulfúrico en metanol y extracción con el sistema de solventes cloroformo-metano-agua, utilizando butil hidroxitolueno como antioxidante. Los isómeros trans se analizaron con una columna capilar de 30m de Alletech Heliflex AT225, Houston, USA. El contenido de ácidos grasos de las diferentes muestras se discute y explica en una publicación anterior (10).

Determinación de lípidos y lipoproteínas plasmáticas

Después de un ayuno aproximado de 12 horas se tomaron tres muestras de sangre a cada individuo, con etilendiamintetracetato de sodio en tubos Vacutainer® BD. Las muestras de plasma se separaron inmediatamente en una centrifuga refrigerada y se trasladaron en hielo para el laboratorio. Las determinaciones de colesterol y triacilglicéridos se realizaron por triplicado con equipos enzimáticos de Boehringer-Manhein®, Alemania. Las lipoproteínas plasmáticas se analizaron por ultracentrifugación de acuerdo a la técnica descrita en detalle en una publicación anterior (11).

Análisis de los resultados

Para comprobar las diferencias en los valores se utilizó el programa Excel 2000 de Microsoft®.

RESULTADOS

La Tabla 2 muestra el promedio de edad e índice de masa corporal de los sujetos estudiados y distribuidos en cada grupo. De los 60 sujetos iniciales, 45 terminaron el estudio, 15 corresponden al grupo Mezcla, 17 al grupo Control y 13 al grupo Oleína. Las razones para la deserción fueron variadas, entre las que se incluye la preñez de dos mujeres. La asistencia de los voluntarios que permanecieron en el estudio fue continua hasta el final.

TABLA 2
Edad e índice de masa corporal en los sujetos al inicio y final del estudio. Promedio \pm Desviación típica

Grupo	Edad (años)	Índice de masa corporal (Inicial) (1)	Índice de masa corporal (Final) (2)
Control	26,0 \pm 4,6	23,9 \pm 3,86	22,72 \pm 1,98
Mezcla	29,0 \pm 8,2	24,0 \pm 2,62	24,79 \pm 2,52
Oleína	28,8 \pm 6,5	22,6 \pm 2,17	24,35 \pm 3,92

(1) N= 20 (2) NC= 17; NM = 15; y NO = 14

En las Tablas 3 y 4 se muestran las concentraciones promedio de Triacilglicéridos (TG), Colesterol Total (CT) y de las Lipoproteínas HDL, LDL, VLDL, al inicio y final del experimento separados por sexo. Los valores de TG resultaron menores al final del estudio para las mujeres de los tres grupos experimentales y en cuanto a los hombres aumentó solo el correspondiente al grupo control. Se evidencian también diferencias en cuanto al sexo para las cifras del CT; mientras los valores de las mujeres experimentaron un descenso de los valores iniciales, en los hombres mostraron un aumento, sin embargo las diferencias entre los valores al inicio y al final no resultaron estadísticamente significativas. Es notorio que al final del experimento los valores de colesterol total del plasma no sufrieron modificaciones significativas en hombres y mujeres en los tres grupos, y que además se encuentran por debajo de 200 mg/dL., pues se esperaba que una dieta como la suministrada al grupo oleína debía aumentar de colesterol plasmático en 20 mg/dL por su alto contenido de ácidos grasos saturados, predicción basada al aplicar las formulas para calcular el incremento del colesterol del plasma propuesta por Hegsted (3), lo que no pudo comprobarse en este estudio. En cuanto a las concentraciones de colesterol

de la VLDL indicaron valores significativamente menores al final del experimento tanto en las mujeres como en los hombres del grupo control. En la Figura 1 se presentan las variaciones de colesterol de la VLDL.

TABLA 3

Concentración de triacilglicéridos, colesterol total y colesterol en las lipoproteínas del plasma, al inicio y a los 90 días de dieta. Sexo femenino

	Grupo oleína (1)		Grupo mezcla (2)		Grupo control (3)	
	Inicio	90 Días	Inicio	90 días	Inicio	90 días
Triacilglicéridos (mg/dl)	88±17	74±13	71±14	55±5	101±15	62±11
Colesterol total (mg/dl)	161±8	169±11	138±8	133±5	178±14	160±12
Colesterol-vldl (mg/dl)	33±12	25±8	25±6	15±2	34±7	16±2
Colesterol-ldl (mg/dl)	87±9	106±10	77±6	83±9	98±9	102±11
Colesterol-hdl (mg/dl)	42±4	38±2	36±2	35±3	46±4	43±2

(1) N= 13 (2) N= 15 (3) N= 17

TABLA 4

Concentración de triacilglicéridos, colesterol total y colesterol en las lipoproteínas del plasma, al inicio y a los 90 días de dieta. Sexo masculino

	Grupo oleína		Grupo mezcla		Grupo control	
	Inicio	90 Días	Inicio	90 días	Inicio	90 días
Triacilglicéridos (mg/dl)	99±10	74±6	92±9	88±10	92±13	117±22
Colesterol total (mg/dl)	153±7	165±5	174±11	178±13	159±12	161±4
Colesterol-vldl (mg/dl)	22±5	34±5	33±4	21±5	34±4	22±4
Colesterol-ldl (mg/dl)	90±5	95±7	99±10	114±16	81±9	97±9
Colesterol-hdl (mg/dl)	42±3	36±2	44±3	43±2	43±2	42±2

La lipoproteína con mayor potencial aterogénico, la LDL, adquiere valores por debajo de 115 mg/dL. Al calcular las diferencias individuales de esta fracción, se observó un incremento estadísticamente no significativo de las concentraciones, tanto en hombres como mujeres de todos los grupos. En la Figura 2 se presentan las variaciones de colesterol de la LDL. En cuanto al colesterol de la HDL, se encontraron concentraciones iniciales mayores a 35 mg/dL, con una leve tendencia a la disminución hacia el final del experimento, sin embargo esas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En la Figura 3 se presentan las variaciones de colesterol de la HDL.

FIGURA 1

Diferencia de la concentración de colesterol en la VLDL. Datos pareados entre los 90 días de dieta y el valor inicial.

Media ± E.E. en mg CT-VLDL/dLplasma.

Diferencia significativa entre los grupos A y B con $p < 0,05$.

Entre los grupos A y C con $p < 0,01$

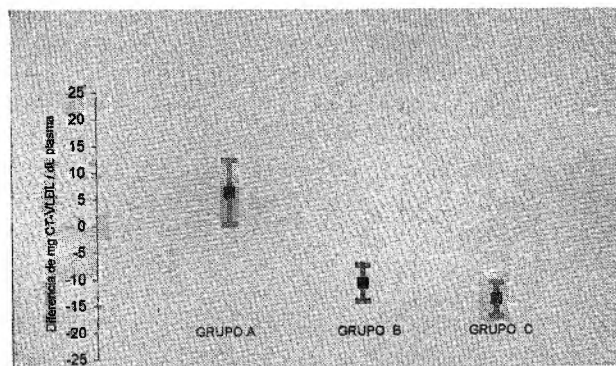


FIGURA 2

Diferencia de la concentración de colesterol en la LDL. Datos pareados entre los 90 días de dieta y el valor inicial.

Media ± E.E. en mg CT-LDL/dLplasma.

No hay diferencia significativa entre los grupos

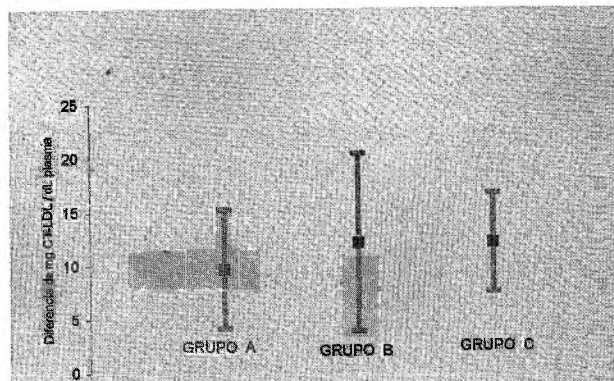
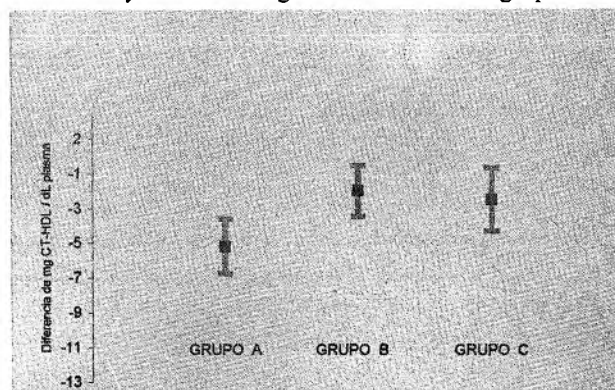


FIGURA 3

Diferencia de la concentración de colesterol en la HDL. Datos pareados entre los 90 días de dieta y el valor inicial.

Media ± E.E. en mg CT-HDL/dLplasma.

No hay diferencia significativa entre los grupos



DISCUSION

La reducción del colesterol total y de la fracción LDL por modificaciones de la dieta ha sido tema de interés de numerosos estudios, ya que las reducciones considerables del tipo y cantidad de la grasa dietética está claramente asociada con la disminución de los niveles del colesterol total del plasma. Sin embargo todavía persiste mucha controversia acerca de los efectos individuales de cada tipo de ácido graso, enfocándose la atención en cual sería el grado de reducción de la cantidad total de ácidos grasos saturados, el nivel óptimo deseable de los poliinsaturados y la función de los ácidos grasos monoinsaturados. Hasta ahora la mayoría de las investigaciones sobre el efecto de las grasas en la nutrición humana, han concluido que un alto consumo de ácidos grasos saturados tiene efecto negativo en la salud, condicionando el establecimiento de enfermedades crónicas degenerativas.

Es por ello que en este estudio se exploró de manera prolongada los efectos que produciría el reemplazo de la grasa de uso habitual en la dieta, por una grasa altamente saturada, como la oleína de palma, en individuos normocolesterolémicos. Se esperaba que el consumo de estas grasas, en una proporción del 50% ó 100% produciría un aumento considerable en el colesterol total y de la fracción LDL en los individuos participantes que comenzaron el estudio con valores de CT muy bajos. Sin embargo, los promedios del CT plasmáticos para los individuos de los tres grupos estuvieron por debajo de 200 mg/dL. De acuerdo a las formulas de predicción del colesterol propuesta por Hegsted (3) se podría esperar que una dieta como la suministrada al grupo oleína debía producir un aumento del CT del orden de los 20 mg/dL, lo que no se pudo comprobar en este estudio, encontrándose un incremento cercano a los 10mg/dL en promedio. Estos resultados coinciden con los reportados por Sumdran, Honstran y col., quienes realizaron un experimento controlado similar al que aquí se reporta, en el que investigaron el efecto de la sustitución del 70% de la grasa de la dieta holandesa por aceite de palma, encontrando que las concentraciones de CT, LDL-C y TG no sufrieron modificaciones significativas, mostrando además una mejoría del perfil de riesgo cardiovascular asociado a las lipoproteínas (12). Mas recientemente Herber y Col., (13) coinciden también con resultados similares a los encontrados en el presente estudio. Ellos evaluaron durante tres semanas, en hombres sanos norte americanos el efecto sobre los lípidos y proteínas del plasma, de dietas enriquecidas con aceite de palma, aceite de coco y aceite de soja hidrogenado y no observando cambios significativos en las proteínas ApoAI y ApoB, CT y LDL-C en los sujetos que recibieron la dieta con el aceite de palma. Marzuki y col. (14) evaluaron el efecto del consumo de alimentos que contenían aceite de palma o soja en jóvenes voluntarios que sufrían de

hipercolesterolemia y los resultados indican que la dieta con aceite de soja produjo una elevación mayor del colesterol total que el aceite de palma y además incrementó la concentración de LDL-C. Sin embargo cuando se aplicaron las mismas dietas a un grupo de individuos jóvenes con niveles normales de colesterol sanguíneo, encontraron que ambas dietas no modifican las concentraciones de colesterol.

En Venezuela, no se habían realizado hasta ahora, estudios similares en humanos, sólo se han reportado estudios en animales cuyos resultados no pueden compararse a los encontrados en esta investigación.

Los resultados del presente trabajo, así como los numerosos estudios sobre la materia refuerzan la tesis que el aceite de palma no puede equipararse en cuanto a sus efectos sobre el colesterol plasmático con el aceite de coco. El aceite de palma puro así como la oleína extraída del mismo aceite es un producto natural que se viene consumiendo desde hace mas de 5000 años (15) y actualmente se usa en todo el mundo como aceite y como componente de margarinas y materias grasas. También se añade como componente secundario a las mezclas de grasas que se usan para la fabricación de una gran cantidad de productos alimenticios. En lo que respecta a la Región Latinoamericana el aceite y la oleína de palma se consume abundantemente en Costa Rica y Ecuador. En Venezuela se están utilizando estas grasas en la fabricación de galletas, y otro productos de panaderías así como en la elaboración de aceites comestibles. En conclusión se podría decir que a la luz de las investigaciones mas recientes pareciera que no hay suficiente evidencia científica que sustente los supuestos efectos dislipémicos atribuidos al aceite de palma por lo que no parece prudente equipar este aceite con el de coco, en cuanto a sus efectos sobre el colesterol sanguíneo.

REFERENCIAS

1. Arens EH, Insull W, Bloomstrand R, Hirsch J, Tsaltas TT, Peterson, ML. The influence of dietary fats on serum lipids in man. *Lancet* 1957;1:943-53.
2. Keys A, Anderson JT, Grande F. Prediction of serum-cholesterol responses on man to changes in fats in the diet. I. Iodine values versus 25-P. *Metabolism*. 1965;14:776-87
3. Hegsted DM, Mc Gandy RB, Myers ML, Stare FJ. Quantitative Effects of dietary fats on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr* 1965;17:281-95.
4. Keys A. Editor Coronary Heart Disease in Seven Countries. *Circulation* 1970;41(1Suppl):11-211
5. Mattson FH, Grundy SM. Comparison of effects of dietary saturated monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J Lipid Res* 1985; 26:1914-202
6. Bonanome A, Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N Engl J Med* 1988; 318:1244-8

7. Hayes KC, Khosla P. Dietary fatty acid thresholds and cholesterolemia. *FASEB J* 1992;6:2600-7.
8. INN/ULA. Hojas de Balance de Alimentos. 1990-1997.
9. FAO/OMS. Serie de Informes Técnicos N° 724, Ginebra, 1985.
10. Aular A, Bosch V, y Ortiz N. Ácidos grasos en comidas típicas venezolanas preparadas con diferentes aceites vegetales. *An Venez Nutr.* 1999;(12):23-27.
11. Bosch V, Rodríguez M, Geron N. Características de las dislipoproteinemias mas frecuentes en Venezuela estudiadas mediante análisis de ultracentrifugación preparativa. *Invest Clin* 1987:5-19.
12. Sundram K, Honstra G, Van Houwelingen AC, Kester ADM. Replacement of dietary fat with palm oil. Effect on human serum lipids, lipoprotein and apolipoprotein. *Brit J Nutr.* 1992; 68:677-92.
13. Herber D, Ashley JM, Solares ME, Wang HJ, Alfin-Slater RB. The effects of palm oil enriched diet on plasma lipids and lipoprotein in healthy young men. *Nutr Res.* 1992; 12:53S-59S.
14. Mazurki A, Arshad F, Abdul Razak T, Haarin K. Influence of the dietary fat on plasma lipid profile of Malaysian adolescents. *Am J Clin Nutr* 1991;35 (4 Supl): 1010S-1014S.
15. MacFarlane, Swetman AA and Coursy DG. Comparison of traditional and industrial palm oil. Secretariat and Observes Papers, Appendix 4, Report N°4. In: *Proceedings of Second African Palm Oil Processing Workshop, Nigeria, FAO, Rome, 1984.*

Recibido: 06-06-2001

Acepado: 06-02-2002

Efecto de la adición de una pectinasa y una celulasa sobre la digestibilidad *in vitro* del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

Floribeth Víquez Rodríguez, Ana Ruth Bonilla Leiva

Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, Costa Rica, C.A.

RESUMEN. Se midió el efecto de la adición de una pectinasa y una celulasa comerciales sobre la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), una negra (Brunca) y una roja (Chirripó). Se mantuvieron condiciones fijas de pH (entre 6,3 y 6,4), tiempo (60 min) y temperatura (40°C) y se ensayaron tres concentraciones de cada enzima: 0,25%, 0,50% y 1,0% m/m. Los incrementos en la digestibilidad *in vitro* del frijol negro fueron 6,9%; 9,5% y 12,3% ($p < 0,05$), para los respectivos incrementos en la concentración de pectinasa y del frijol rojo de 8,9%; 10,2% y 12,9% ($p < 0,05$). El efecto de la celulasa fue dependiente de la concentración de enzima y de la variedad de frijol. La digestibilidad *in vitro* del frijol rojo aumentó en 5,7%; 9,2% y 12,0% ($p < 0,05$), con los incrementos en la concentración de celulasa; la digestibilidad del frijol negro aumentó en menos de un 5% ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la aceptación general de los frijoles tratados enzimáticamente (negro o rojo) y los frijoles sin tratar.

Palabras clave: Frijol (*Phaseolus vulgaris*); digestibilidad *in vitro*; pectinasa; celulasa.

SUMMARY. Effect of pectinase and cellulase addition on *in vitro* digestibility of common bean (*Phaseolus vulgaris*). Effect of commercial pectinase and cellulase addition on *in vitro* digestibility of two common bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties, black (Brunca) and red (Chirripó), was measured. Constant conditions of pH (6,3-6,4), time (60 min), and temperature (40°C) were held, and three enzyme concentrations were tested: 0,25%, 0,5% and 1,0% m/m. *In vitro* digestibility increases for black beans were 6,9%; 9,5% and 12,3% ($p < 0,05$), and for red beans were 8,9%; 10,2% and 12,9% ($p < 0,05$), with increasing pectinase concentration. Effects of cellulase were dependent upon both, enzyme concentration and bean variety. *In vitro* digestibility of red beans increased by 5,7%; 9,2% and 12,0% with increasing cellulase concentration; digestibility of black beans increased by less than 5%. No significant difference ($p > 0,05$) in general acceptance of enzyme treated beans (black or red) or nontreated beans was noted. **Key words:** Beans (*Phaseolus vulgaris*); *in vitro* digestibility; pectinase; cellulase.

INTRODUCCION

Los frijoles son un alimento básico y tradicional en la dieta del costarricense, al igual que lo es en la de muchos otros países del área centroamericana. A pesar de ser un alimento rico en nutrientes, tales como proteínas, carbohidratos, fibra, ciertas vitaminas y minerales, su consumo se ve restringido por la presencia de factores antinutricionales, una baja digestibilidad de la proteína y del almidón y los problemas de flatulencia que ocasiona su ingesta.

Se ha comprobado que los principales causantes de flatulencia en el frijol común son el almidón resistente, los oligosacáridos de la familia de la rafinosa y los componentes de la fibra dietética (1-7). Tanto el almidón resistente como los componentes de la fibra dietética tienen efectos fisiológicos beneficiosos para la salud, ejercen un efecto protector sobre diversos tipos de cáncer, así como enfermedades cardiovasculares, el tratamiento de la diabetes y la reducción del colesterol, entre otros (8-10).

Diversos procesos que mejoran la digestibilidad de la proteína y del almidón de leguminosas, así como tratamientos que eliminan los problemas de flatulencia debido al almidón resistente y a los oligosacáridos de la familia de la rafinosa han sido reportados en la literatura (11-15). Sin embargo, no existen referencias del uso de pectinasas y celulasas para mejorar la digestibilidad del frijol común.

El objetivo de este estudio fue evaluar, mediante tratamientos independientes, el efecto de la adición de una pectinasa y una celulasa comerciales sobre el contenido de residuo indigerible (RI) de dos variedades de frijol de diferente coloración, con el propósito de encontrar un tratamiento que mejore la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica del frijol común (*Phaseolus vulgaris*).

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron dos variedades de frijol común, una negra (Brunca) y una roja (Chirripó), suministradas por la Estación Experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica.

La pectinasa empleada fue "Pectinex Ultra SPL" (Novo Nordisk). Mediante la reducción de la viscosidad relativa con respecto al tiempo de una disolución de pectina comercial al 1,0% (m/v) y utilizando una concentración definida de Pectinex de 1,0% (m/v) se determinó que una unidad PG (unidad viscosimétrica pectinasa) equivale a 4,5 veces el cambio de viscosidad/min. La celulasa utilizada fue "Validase TRL" (Valley Research Inc., IN), para la cual la casa comercial reporta que una unidad CU (unidad viscosimétrica celulasa) equivale a 0,2 veces el cambio de viscosidad/min.

Para los tratamientos enzimáticos, tanto de la pectinasa como de la celulasa, se trabajó con pastas de frijol obtenidas de la siguiente manera: los frijoles se remojaron en agua 16 h, utilizando una relación 1:3 (frijol:agua); luego se eliminó el agua de remojo y se cocieron en una olla de presión (15 lb/plg²) por 5 min, utilizando una relación 1:1 (frijol: agua); se homogeneizaron en una licuadora de alta velocidad hasta obtener una pasta fina con un contenido de sólidos entre 74 y 77%. En cada tratamiento se emplearon 100 g de la pasta de frijol homogeneizada. Se mantuvieron condiciones fijas de pH (entre 6,3 y 6,4), temperatura (40°C) y tiempo de acción enzimática (60 min). Se ensayaron tres concentraciones de cada enzima: 0,25%, 0,5% y 1,0% m/m. En todos los casos, se empleó un control, sin adición de la enzima.

Una vez concluido el tiempo de acción de la enzima, ésta se inactivó mediante la adición de HCl concentrado hasta un pH de 1,9-2,0. Las muestras se deshidrataron en una estufa de convección a 85°C, durante la noche (16 ± 2 h), se molieron en un molino (Cienceware Micro Mill, Belt Art Products, NJ), se pasaron a través de una malla de 40 mesh y se les determinó el contenido de residuo indigerible (RI). Para el análisis de digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica, se empleó el método descrito por Tomkinson (5), empleando las enzimas pepsina y pancreatina, variando los tiempos de acción a 2 h, según lo recomiendan Kon *et al.* (18). Se pesó por triplicado exactamente 2,55 g de muestra seca y se colocó en una botella de centrifuga de 250 mL. Se agregó 90 mL de agua destilada y unos cristales de timol. Se tapó y se colocó en un baño con agua a ebullición 30 min. Se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó 15 mL de pepsina de concentración 10 mg/mL. Se ajustó el pH a 1,9-2,0, con HCl concentrado, utilizando un pH-metro. Se colocó 2 h en un baño a 40°C con agitación. Se ajustó el pH a 6,8 con NaOH 0,5 M. Se agregó 15 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0,1 M (pH 6,8) conteniendo 10 mg/mL de pancreatina, previamente filtrada a través de un papel Whatman N° 41. Se colocó 2 h en un baño a 40°C con agitación. Se enfrió y se adicionó 4 volúmenes de etanol a 60°C, se dejó reposar 30 min. Se centrifugó a 2000 rpm (336 RCF) 4 min. Se descartó el supernatante y el residuo se deshidrató a 70 °C durante la noche (16 ± 2 h) en una estufa al vacío. Se enfrió a temperatura

ambiente y se pesó. Se seleccionó la concentración de enzima que logró la mayor digestibilidad *in vitro* (el menor contenido de RI). Esta concentración fue usada posteriormente para medir el efecto sobre la calidad y el agrado general.

Los resultados se analizaron mediante un análisis de ANDEVA, al 95% de confiabilidad. Se determinó el efecto de la adición de la enzima mediante un modelo de regresión múltiple, analizando el efecto de la variedad de frijol, el efecto de la enzima, de la concentración de la enzima y de la interacción enzima:variedad.

Para el análisis sensorial se empleó pasta homogeneizada de frijol obtenida de la manera como se describió anteriormente. Se empleó la concentración de enzima seleccionada y la temperatura, tiempo y pH descritos. Una vez cumplido el tiempo de acción de la enzima, ésta se inactivó calentando la muestra a aproximadamente 85°C, 5 min. Se adicionó 0,3% de sal (NaCl), 0,2% de cebolla (*Allium cepa*), 0,1% de ajo (*Allium sativum*), 0,1% de culantro (*Coriandrum sativum*) y 0,1% de chile dulce (*Capsicum annuum*) a ambas muestras (el control y la muestra tratada con la enzima). Se determinó el agrado y la calidad general del producto, utilizando una escala hedónica no estructurada de 150 puntos y 24 jueces entrenados. Los resultados se analizaron mediante un análisis de ANDEVA, al 95% de confiabilidad.

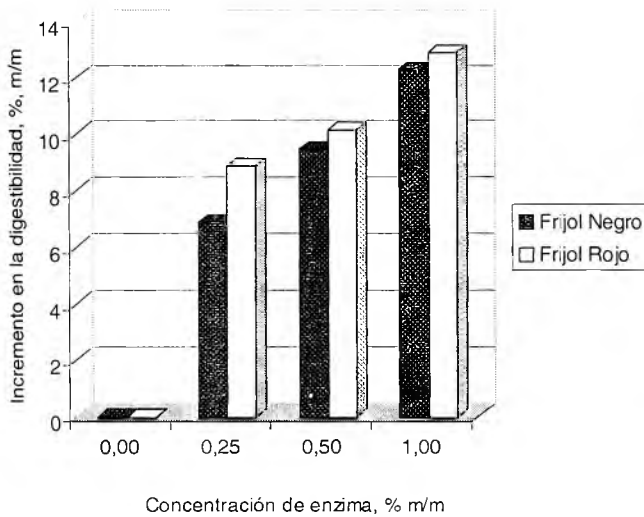
RESULTADOS Y DISCUSION

La acidificación de las muestras, que se realizó para la inactivación de las enzimas, favorece la hidrólisis de los enlaces glucosídicos tanto de la pectina como de la celulosa. Sin embargo, esto no afecta los valores del incremento en la digestibilidad *in vitro* que se reportan a continuación, ya que los mismos fueron establecidos utilizando como referencia un control sin tratamiento enzimático, bajo las mismas condiciones de acidificación y secado.

El contenido promedio de RI en las muestras sin enzima fue de 39,8%. Al adicionar pectinasa, se pudo determinar que su efecto sobre el contenido de RI no fue afectado por la variedad de frijol ($p > 0,05$). También se pudo observar que un incremento en la concentración de la enzima aumentó la digestibilidad *in vitro* de ambas variedades, lo cual se manifiesta por una reducción en el contenido de RI. La Figura 1 muestra los incrementos de digestibilidad *in vitro* obtenidos con las dos variedades de frijol, de acuerdo con la concentración de la enzima. Con una concentración de 1,0% m/m (la mayor concentración utilizada) se obtuvo un RI de 34,9% para frijol negro (variedad Brunca) y de 34,7% para el frijol rojo (variedad Chirripó), lo que significa incrementos en la digestibilidad *in vitro* de 12,3% y 12,9%, respectivamente.

FIGURA 1

Efecto de la adición de una pectinasa comercial* sobre la digestibilidad *in vitro* de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*)



*Pectinex Ultra SPL (Novo Nordisk)
Actividad = 26 000 PG/mL
1 PG = 4,5 cambio de viscosidad/min

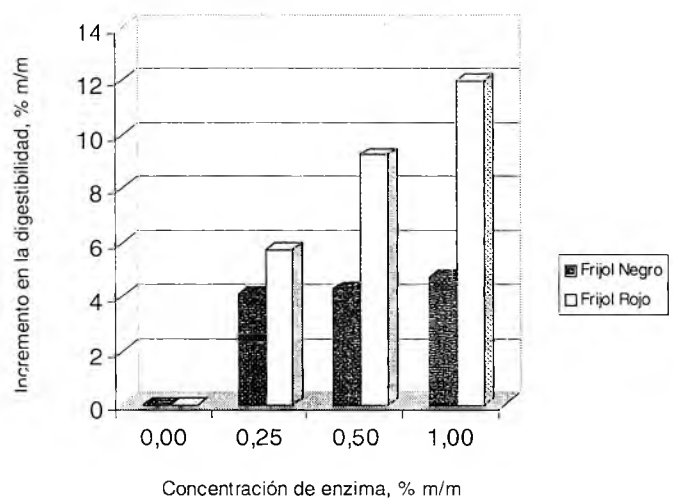
A partir del análisis de regresión múltiple, se pudo obtener la ecuación que mide el efecto de la concentración de la pectinasa sobre el contenido de RI (Ecuación 1). Si se trabaja a las mismas condiciones de ensayo descritas y dentro del rango de concentración estudiado, esta ecuación puede emplearse para estimar, con un 69 % de probabilidad, el efecto sobre el contenido de RI a otras concentraciones de la enzima.

$$RI (\% m/m) = 38,84 - 4,58 \times \text{concentración} + e_j \tag{Ecuación 1}$$

A pesar de que los panelistas percibieron cambios en la textura final del producto tratado con pectinasa (una ligera "arenosidad"), el agrado general de los frijoles con y sin enzima fue similar ($p > 0,05$), tanto para el frijol rojo como para el negro. Se obtuvo una calificación promedio de 108 puntos en una escala hedónica no estructurada de 150 puntos. Se encontró que el efecto de la celulasa sobre el contenido de RI fue diferente según la variedad de frijol empleada ($p < 0,05$). El contenido promedio de RI de los frijoles sin tratamiento enzimático fue de 39,8%; al adicionar un 1,0% de la enzima disminuye a 37,9% en el frijol negro y a 35,0% en el frijol rojo. Esto implica que la digestibilidad *in vitro* del frijol negro se incrementó en un 4,7%, mientras que la del rojo en un 12,0 % (Figura 2).

FIGURA 2

Efecto de la adición de una celulasa* sobre la digestibilidad *in vitro* de dos variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris*)



*Validase TRL (Valley Research Inc.)
Actividad = 13000 CU/g
1 CU = 0,2 cambio viscosidad/min

El modelo con interacción es el que mejor explica el efecto de la celulasa sobre el contenido de RI. La Ecuación 2 permite estimar, con un 61 % de probabilidad, el efecto de la celulasa a otras concentraciones, bajo las condiciones de ensayo descritas y dentro del rango de concentración estudiado.

$$RI (\% m/m) = 39,53 - 1,57 \times \text{conc.} + 0,35 \times \text{vari.} - 3,006 \times \text{inter.} + e_{ij} \tag{Ecuación 2}$$

Si el frijol es negro, vari. (variedad) es 0 e inter. (interacción enzima: variedad) también es cero, con lo que el efecto de la celulasa sobre el contenido de RI en el frijol negro se puede calcular como sigue:

$$RI (\% m/m) = 39,53 - 1,57 \times \text{conc.}$$

Si el frijol es rojo, vari. es 1 e inter. también es 1 y el contenido de RI va a depender de la concentración de la enzima de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$RI (\% m/m) = 39,53 - 4,63 \times \text{conc.}$$

Desde el punto de vista sensorial, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al agrado y calidad general del frijol tratado con un 1,0% m/m de celulasa y el

frijol sin tratamiento ($p > 0,05$), tanto para el frijol rojo como para el negro, obteniéndose una calificación promedio de 120 puntos en una escala hedónica no estructurada de 150 puntos. La glucosa que resulta de la hidrólisis de la celulosa le imparte un sabor residual dulce, que resultó agradable al gusto de los panelistas. Los jueces no detectaron cambios en la textura; el producto tratado con celulasa obtuvo una calificación general promedio superior al obtenido con pectinasa ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

El mayor efecto de la adición de la pectinasa se obtuvo al utilizarla al 1%, lo cual aumentó la digestibilidad *in vitro* de las dos variedades de frijol, rojo y negro, en un 12,9% y un 12,3% respectivamente. El efecto de la celulasa no sólo fue dependiente de la concentración de la enzima, sino además, de la variedad de frijol. La digestibilidad *in vitro* del frijol rojo aumentó en un 12% (máximo valor obtenido) utilizando 1% de la enzima, mientras que la digestibilidad del frijol negro no sobrepasó un incremento del 5%.

Debido a la importancia del consumo de frijoles en la población costarricense, el incremento en la digestibilidad *in vitro* del frijol común obtenido en este estudio cobra relevancia desde el punto de vista nutricional, especialmente en ciertos sectores de nuestro país, tales como niños de corta edad, ancianos y vegetarianos, que basan su suministro de proteína y de hierro a través del consumo de esta leguminosa.

Esta investigación formó parte del Programa "Bean Cowpea Collaborative Research Support Programa (CRSP)" y fue financiada por la Agencia Internacional para el Desarrollo (USAID) Grant N° DAN-G-SS-86-0008-88

REFERENCIAS

1. Tovar J. Bioavailability of carbohydrates in legumes: digestible and indigestible fractions. *Arch Latinoamer. Nutr.* 1994;44 (4-S): 36 S- 40 S.
2. Annison G & Topping DL Nutritional role of resistant starch: chemical structure and physiological function. *Annu Rev Nutr.* 1994;14: 297-320.
3. Nanna IA. & Phillips RD. Protein and starch digestibility and flatulence potential of germinated cowpeas (*Vigna unguiculata*). *J Food Sci.* 1990;55(1): 151-153. 183.
4. Englyst HN & Cummings JH. Non starch polysaccharides (dietary fiber) and resistant starch. In *New developments in dietary fiber.* Furda, I. & Brine, C.J., eds. Plenum Press. New York. 1990;205-225.
5. Tomkinson RA. Studies on the indigestible and fermentable components of dry bean and cereal grains. Thesis M.Sc. Michigan State University, Department of Crop and Soil Science, Michigan. 1986;48-58.
6. Reddy NR, Pierson MD, Sathe SK & Salunkhe DK. Chemical, nutritional and physiological aspects of dry bean carbohydrates. A review. *Food Chem.* 1984;13:25-68.
7. Fleming SE. A study of relationships between flatus potential and carbohydrate distribution in legume seeds. *J Food Sci.* 1981;46:794-798.
8. Kellogg's. Importancia de la fibra. *Dieta y Salud* 1997;7 (1):1-16.
9. Gurr MI & Asp NG. 1994. Dietary Fiber. ILSI Europe Concise Monograph Series. ILSI Press. Washington, D.C. 23 p.
10. Kritchesky D. Cereal fiber and lipidemia. *Cereal Foods World* 1997;42 (2): 81-85.
11. Navarrete K. 1999. Evaluación del efecto del tamaño de partícula y cocción antes y después de la molienda del frijol *Phaseolus vulgaris* variedad Brunca, sobre la digestibilidad *in vitro* del almidón. Tesis Lic. en Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Facultad de Agronomía. San José. 36 p.
12. Chau CF & Cheung PCK. Effect of various processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch of two Chinese indigenous legume seeds. *J Agr Food Chem.* 1997;45(12): 4773-4776.
13. Barampama Z & Simard RE. Effects of soaking, cooking and fermentation on composition, *in vitro* starch digestibility and nutritive value of common beans. *Plant Foods Human Nutr.* 1995;418 (4): 349-365.
14. Marques MH, Casa Nova S, Fernández ML & Gomes AM. Insoluble dietary fiber of grain food legumes and protein digestibility. *Arch Latinoamer Nutr.* 1993;43(1): 66-72.
15. Borejszo Z & Khan K. Reduction of flatulence causing sugars by high temperature extrusion of pinto bean high starch fractions. *J Food Sci.* 1992;57(3): 771-777.
16. Kon S, Wagner JR, Becker R, Booth AN & Robbins DJ. Optimizing nutrient availability of legume food products. *J Food Sci.* 1971;36: 635-639.

Recibido: 23-04-2001

Aceptado: 19-02-2002

***Clostridium perfringens* en carnes crudas y cocidas y su relación con el ambiente en Costa Rica**

Evelyn Rodríguez, María del Mar Gamboa y Pablo Vargas

Laboratorio de Investigación en Bacteriología Anaerobia y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales,
Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

RESUMEN. Con el fin de establecer el riesgo de contraer una toxicoinfección alimentaria por la ingestión de carne contaminada con *Clostridium perfringens*, se analizaron 8 plantas procesadoras de carne en Costa Rica, utilizando la técnica del Número Más Probable por gramo (NMP/g). *C. perfringens* se aisló en 29 (88%) de 33 muestras de suelos aledaños a las plantas (promedio NMP/g $6,7 \times 10^2$), en 70 (93%) de 75 intestinos de animales sacrificados (promedio NMP/g 3×10^4), en 42 (55%) de 76 carnes en canal (promedio NMP/g $2,2 \times 10^4$) y en 30 (61%) de 49 carnes procesadas o molidas, listas para su expendio (promedio NMP/g 8×10^3). Adicionalmente se evaluó la presencia de esta bacteria en 10 expendios del Area Metropolitana de Costa Rica, aislándose en 15 (75%) de 20 muestras de carne molida y en 28 (36%) de 78 muestras de carne en trozo (promedio NMP/g $1,9 \times 10^3$ y $7,5 \times 10^2$, respectivamente). Al analizar 35 muestras de carne cocida en 32 restaurantes que utilizan baños termorregulables (temperatura promedio 82°C) sólo una fue positiva por *C. perfringens* (NMP/g 4, temperatura 72°C). De un total de 1121 cepas aisladas, 250 se seleccionaron al azar para evaluar la producción de enterotoxina. Sólo 3 cepas (1,2%) fueron positivas, probablemente porque la mayoría de las cepas silvestres no son productoras de esta toxina, aunque pueden llegar a producirla como resultado de choques térmicos repetidos. Los resultados de este trabajo señalan la necesidad de adoptar medidas preventivas adecuadas y altos estándares sanitarios en la industria procesadora de carne en Costa Rica, para minimizar el riesgo de toxicoinfecciones alimentarias causadas por *C. perfringens*, debido a su amplia distribución y al peligro potencial para la salud del hombre.

Palabras clave: *Clostridium perfringens*, plantas procesadoras de carne, carnes crudas, carnes cocidas, suelos, expendios de carnes, restaurantes, enterotoxina.

SUMMARY. *Clostridium perfringens* in raw and cooked meats and its relation with the environment in Costa Rica. The presence of *Clostridium perfringens* in eight slaughter houses from Costa Rica was analyzed using the Most Probable Number (MPN) technique, in order to assess the risk of acquiring a food borne intoxication due to consumption of contaminated meat. *C. perfringens* was detected in 29 (88%) out of 33 soil samples collected from the slaughter house surroundings (average $6,7 \times 10^2$ MPN/g), as well as in 70 (93%) out of 75 intestinal contents of slaughtered animals (average 3×10^4 MPN/g), in 42 (55%) out of 76 samples of slaughtered meat (average $2,2 \times 10^4$ MPN/g) and in 30 (61%) out of 49 retail meats (average 8×10^3 MPN/g). In addition, the presence of this bacterium was evaluated in ten retail meat markets located in the Metropolitan Area of Costa Rica, where it was isolated from 15 (75%) out of 20 samples of ground meat and from 28 (36%) de 78 stew meat samples (average $1,9 \times 10^3$ and $7,5 \times 10^2$ MPN/g, respectively). Only one out of 35 samples of cooked meat obtained from 32 restaurants that utilize heated water baths (average temperature of 82°C) was positive for *C. perfringens* (4 MPN/g, temperature 72°C). Out of 1121 bacterial isolates obtained, 250 were evaluated for enterotoxigenicity. Only 3 (1,2%) of these tested positive for enterotoxin production, probably because most wild strains are not toxin producers, even though they can be induced to produce it as a result of repeated thermal shocks. The present results urge the adoption of adequate preventive measures and high sanitary standards in the meat processing industry in Costa Rica, in order to minimize the risk of food-borne intoxications caused by *C. perfringens*, due to its widespread distribution and potential human health hazard.

Key words: *Clostridium perfringens*, slaughter houses, raw meat, cooked meat, soils, meat markets, restaurants, enterotoxin.

INTRODUCCION

Clostridium perfringens es un bacilo Gram positivo, esporulado y anaerobio, capaz de crecer rápidamente a 45°C y cuyo principal hábitat es el suelo y los intestinos de humanos y de animales (1). Se ha comprobado que esta especie causa una variedad de enfermedades de diferente severidad (2-4) entre las que se encuentran las de origen alimentario, en virtud de la producción de una enterotoxina, que es una de las 13

toxinas producidas por *C. perfringens* (2,3).

En muchos países, incluso de alto nivel sanitario, más de la mitad de todos los brotes epidémicos de enfermedades transmitidas por los alimentos son causados por carne y productos cárnicos (5) que son los que más se asocian con la toxicoinfección producida por *C. perfringens*, pues ofrecen condiciones ideales para su desarrollo. Unas pocas bacterias pueden sobrevivir después de la cocción de los alimentos y si las condiciones ambientales lo permiten, se multiplican

hasta llegar a la dosis infectante (6). Cuando las células vegetativas llegan al intestino y esporulan, producen la enterotoxina que es la responsable del cuadro clínico, una toxicoinfección caracterizada por náuseas, diarrea, dolor y gases abdominales, 6 a 12 horas después de haber ingerido los alimentos contaminados (1,6).

En estudios previos en Costa Rica (7,8), se informó la presencia de *C. perfringens* en un 37% de las muestras de suelo y en un 46% de las carnes cocidas, pero se desconoce la prevalencia de esta bacteria en la flora intestinal de los animales. A fin de establecer una relación entre la presencia de *C. perfringens* en el ambiente y la carne lista para consumo, se decidió realizar un estudio integral en plantas procesadoras de carne, que incluyó muestreos en los suelos aledaños, en los intestinos de los animales sacrificados, en la carne en canal, en la carne procesada o molida lista para su expendio y en la carne cocida mantenida en baños termorregulables en los restaurantes. Finalmente se determinó el porcentaje de cepas de *C. perfringens* productoras de enterotoxina, para establecer el riesgo de contraer una intoxicación alimentaria por la ingestión de carne.

METODOS

Muestras

Se muestrearon, en dos ocasiones diferentes, 8 plantas procesadoras de carne de ganado vacuno, 3 de las cuales eran del área metropolitana y 5 del área rural. En cada visita se tomaron muestras provenientes de 5 animales (intestino y carne en canal) y 5 muestras de carne molida o en trozos si hubiese disponible. En total se analizaron 200 muestras de animales distribuidas así: 75 de contenido intestinal, 76 de carne en canal y 49 de carne molida o en trozos; se recolectaron además 33 muestras de suelos aledaños a las plantas procesadoras. Adicionalmente, se adquirieron 98 muestras de carne cruda en 10 expendios del Área Metropolitana: 20 de carne molida y 78 de carne en trozo. Finalmente, en 32 restaurantes, se tomaron 35 muestras de carne cocida, mantenidas calientes en baños termorregulables. Todas las muestras fueron recolectadas en bolsas plásticas estériles, transportadas a temperatura ambiente al laboratorio (9) y analizadas en un tiempo no mayor a las 6 horas de su recolección.

Metodología

Para la determinación del NMP se siguió la metodología de Morera *et al.* (10) que utiliza los principios descritos en Peeler *et al.* (11), Rhodehamel y Harmon (12) y Smith y Williams (9) para optimizar esa determinación. Así, se tomaron 25 g de cada muestra que se diluyeron en 225 mL de agua peptonada estéril (0,1%); se prepararon diluciones decimales (hasta 10^{-5}) que fueron enriquecidas por triplicado, en tubos con carne picada y 10 mL de caldo infusión de

cerebro-corazón suplementado (CICC), prerreducidos antes de esterilizar (PRAS) y mantenidos con atmósfera anaerobia de CO_2 y N_2 (13). Después de incubar a 45°C por 24 h (9), a partir de cada tubo con crecimiento y burbujas de gas se inocularon placas de Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina (SPS), que se incubaron en jarra de anaerobiosis a 45°C por 24 h. Las colonias bacterianas aisladas, incluyendo tanto negras como blancas, fueron inoculadas en tubos de CICC-PRAS (con atmósfera anaerobia de CO_2 y N_2) que se incubaron en baño a 45°C por 4-5 h; a partir de aquellos tubos con crecimiento y burbujas de gas se inocularon placas de Agar Sangre (AS), que fueron incubadas en jarras de anaerobiosis a 45°C por 24 h.

Identificación de cepas

Las cepas provenientes de colonias típicas en AS, con morfología y tinción de Gram compatibles con *C. perfringens* fueron identificadas bioquímicamente de acuerdo con la metodología y pruebas recomendadas (14,15), incluyendo determinación de movilidad, licuefacción de gelatina, reducción de nitratos, producción de indol, de lecitinasa y fermentación de lactosa y salicina.

Detección de enterotoxigenicidad

Se escogieron 250 cepas provenientes de todos los tipos de muestras (suelos, contenido intestinal, carnes crudas en canal, en trozos, en expendios y carnes cocidas) a las que se les determinó su capacidad de producir enterotoxina. Esto se realizó utilizando la prueba de aglutinación reversa pasiva (Oxoid[®]) empleando como medio para la esporulación el caldo Duncan Strong modificado (15), que se incubó en anaerobiosis por 96 h. Se utilizó la cepa enterotoxigénica *C. perfringens* UCR-A-89 como control positivo.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa SPSS para Windows y se compararon los datos mediante la prueba de χ^2 de Pearson, con un nivel de significancia de 99% ($p < 0,01$).

RESULTADOS Y DISCUSION

Tal y como ha sido descrito previamente (10), no sólo cepas provenientes de colonias negras en agar SPS confirmaron ser *C. perfringens*, sino que colonias blancas (no típicas) resultaron ser *C. perfringens*. En este estudio, 1121 cepas fueron identificadas como *C. perfringens*, de las cuales 792 (71%) provenían de colonias negras y 329 (29%) de colonias blancas. Por otra parte, de un total de 1254 colonias negras analizadas, 462 (37%) no correspondieron a *C. perfringens*. Estos datos ratifican la necesidad de realizar pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de *C. perfringens* o bien, utilizar otros medios selectivos más específicos para su aislamiento.

Suelos

C. perfringens se ha encontrado en la mayoría de muestras de suelo en las que se le ha buscado específicamente (9). En este estudio fue posible aislarlo en 29 de las 33 muestras de suelos aledaños a las plantas procesadoras de carne (88%), con un NMP/g de tierra que varió de $1,3 \times 10^1$ a $3,6 \times 10^3$ (promedio: $6,7 \times 10^2$, Tabla 1). Esta frecuencia resultó ser mayor a la descrita para la Meseta Central (37%) (7), probablemente porque en ese estudio previo, a diferencia del presente, se empleó una metodología que favoreciera a los clostridios esporulados y *C. perfringens* no siempre esporula (6,9).

TABLA 1
Número Más Probable (NMP) de *Clostridium perfringens* por gramo en suelos aledaños a plantas procesadoras de carne, Costa Rica

Plantas procesadoras*	Muestras +/-total	NMP/g
1	5/5	$1,4 \times 10^1$
2	2/4	$1,6 \times 10^1$
3	2/4	$1,3 \times 10^1$
4	4/4	$3,9 \times 10^2$
5	4/4	$5,8 \times 10^2$
6	4/4	$3,6 \times 10^3$
7	4/4	$8,0 \times 10^1$
8	4/4	$1,5 \times 10^2$
	T=29/33 (88%)	X= $6,7 \times 10^2$

*1-3:urbanas, 4-8:rurales. T: total de muestras positivas.
X: promedio NMP/g.

La certeza de que *C. perfringens* sea un habitante normal de los suelos aledaños a las plantas procesadoras de carne representa un factor de riesgo para la contaminación del producto, especialmente en las plantas rurales, que cuentan con infraestructura muy limitada y generalmente deficiente.

Plantas procesadoras

C. perfringens es habitante normal de intestinos de animales en cantidades variables según la especie y aún dentro de la misma especie (9). En este estudio se analizaron 200 muestras de animales recién sacrificados: 75 de contenido intestinal, 76 de carne en canal y 49 de carne en trozo o molida (Tabla 2).

El NMP/g de contenido intestinal fue muy similar en los animales de diferentes plantas (promedio: $3,0 \times 10^4$), excepto en la planta #1, donde los animales son mantenidos en ayuno por 24 horas y probablemente las variaciones que pueda sufrir la flora normal intestinal no favorecen a *C. perfringens*. Un 93% de las muestras de contenido intestinal fueron positivas por *C. perfringens*, lo que concuerda con lo informado por Smith y Williams, Miserez y col. y Netherwood y col. (9,16,17). Además, es importante señalar que *C. perfringens* puede llegar a causar enfermedades en animales, tales como diarreas, enterotoxemias, y tiflocolitis (16,18,19).

TABLA 2
Número Más Probable (NMP) de *Clostridium perfringens* por gramo de contenido intestinal de animales y de carne cruda provenientes de plantas procesadoras de carne, Costa Rica

Plantas*	Intestino		Carne canal		Carne trozo o molida	
	Muestras +/-total	NMP/g	Muestras +/-total	NMP/g	Muestras +/-total	NMP/g
1	7/10	8,6	1/10	7	6/10	5
2	10/10	$4,4 \times 10^4$	4/10	$3,0 \times 10^1$	-	-
3	7/9	$1,0 \times 10^4$	0/10	-	3/8	$3,2 \times 10^1$
4	10/10	$2,3 \times 10^4$	6/10	$1,4 \times 10^1$	5/12	$3,5 \times 10^1$
5	10/10	$7,0 \times 10^4$	6/10	$3,4 \times 10^4$	7/10	$3,4 \times 10^4$
6	7/7	$3,3 \times 10^4$	7/7	$1,1 \times 10^5$	-	-
7	9/9	$3,8 \times 10^4$	9/9	$7,5 \times 10^3$	9/9	$2,9 \times 10^2$
8	10/10	$1,2 \times 10^4$	9/10	$5,4 \times 10^3$	-	-
	T=70/75 (93%)	X= 3×10^4	T=42/76 (55%)	X= $2,2 \times 10^4$	T=30/49 (61%)	X= $8,0 \times 10^3$

*1-3:urbanas, 4-8:rurales.
T: total de muestras positivas.

Teóricamente, el proceso de destace del animal está diseñado para que el contenido intestinal no entre en contacto con la carne en canal. El animal recién sacrificado es suspendido de sus patas en el canal, desprovisto del cuero y cabeza y eviscerado. A pesar de esto, los resultados de la carne en canal demostraron la presencia de *C. perfringens* en el 55% de las muestras, con un promedio de NMP/g de carne en muestras positivas de $2,2 \times 10^4$ (Tabla 2). De acuerdo con las condiciones en que se mantenga la carne, ese nivel de contaminación podría aumentar, pues *C. perfringens* encuentra en la carne el pH, los aminoácidos y otros factores de crecimiento que le favorecen. Tomando en consideración únicamente las plantas procesadoras del área rural, el porcentaje de carnes en canal positivas por *C. perfringens* fue 74%, lo cual es más alarmante pues en muchas de estas plantas no hay facilidades para refrigerar la carne. Ya que *C. perfringens* puede sobrevivir y multiplicarse muy rápidamente en microambientes con moderada cantidad de oxígeno (1,9), el problema de contaminación podría ser aún mayor.

El porcentaje de muestras de carne molida o en trozos positivas por *C. perfringens* fue mayor (61%) que el de la carne en canal (55%) ($p < 0,01$) con un NMP/g que varió desde 5 hasta $3,4 \times 10^4$ (Tabla 2). En algunos casos el NMP/g de las muestras de carne molida o en trozo pudo haber disminuido, en comparación con los de la carne en canal, ya que *C. perfringens* es sensible a las temperaturas de refrigeración, especialmente en condiciones de aerobiosis (9,20). El aumento en el número de muestras positivas puede deberse a varios factores: mayor manipulación de la carne molida o en trozos, contaminación cruzada entre la materia prima contaminada y las piezas de carne de buena calidad, higiene deficiente en el sitio de preparación de la carne y condiciones de tiempo y temperatura antes de refrigerar la carne que puedan favorecer la multiplicación de *C. perfringens* (6,9).

Expendios

Los resultados de las 98 muestras de carne cruda adquiridas en los lugares de expendio no son muy diferentes a los encontrados en las plantas procesadoras. El 75% de las muestras de carne molida y el 36% de la carne en trozos dio resultados positivos por *C. perfringens*, con un NMP/g que varió de 4 a $1,1 \times 10^4$ (Tabla 3).

A pesar de que algunas de las condiciones de transporte y almacenamiento de la carne no son favorables para *C. perfringens*, que muere rápidamente a temperaturas de refrigeración (9) y en aerobiosis, los datos anteriores son preocupantes, especialmente si se considera que probablemente el abastecimiento de las carnicerías muestreadas (del Area Metropolitana) provenga de los mataderos también del Area Metropolitana, que fueron los de mejor calidad bacteriológica. Aunque lo ideal hubiera sido

muestrear en carnicerías del área rural la carne proveniente de las plantas procesadoras rurales, este seguimiento no fue posible debido a que estas plantas en su mayoría, lo que brindan es el servicio de destace de los animales y la carne es distribuida de acuerdo con la demanda, en la misma área rural, Area Metropolitana o incluso, otras áreas rurales.

TABLE 3
Número Más Probable (NMP) de *Clostridium perfringens* por gramo de carne cruda proveniente de expendios del Area Metropolitana, Costa Rica

Expendios	Carne molida		Carne en trozo	
	Muestras +/total	NMP/g	Muestras +/total	NMP/g
1	4/4	6,5	0/6	-
2	-	-	8/10	$1,4 \times 10^3$
3	1/2	$1,1 \times 10^4$	3/7	$4,0 \times 10^2$
4	2/2	$8,7 \times 10^1$	6/8	$4,3 \times 10^3$
5	½	9	2/7	$1,4 \times 10^1$
6	2/2	$7,3 \times 10^3$	0/8	-
7	2/2	$5,6 \times 10^2$	5/8	$1,2 \times 10^3$
8	½	4	3/8	4
9	0/2	-	1/8	4
10	2/2	9,5	0/8	-
	T=15/20 (75%)	X= $1,9 \times 10^3$	T=28/78 (36%)	X= $7,5 \times 10^2$

T: total de muestras positivas.

X: promedio NMP/g.

Restaurantes

Únicamente una de las 34 muestras de carne cocida mantenidas en baños termostáticos de restaurantes fue positiva por *C. perfringens*, con un NMP/g de alimento igual a 4. Estos resultados, muy satisfactorios desde el punto de vista de salud pública, se explican por la temperatura de mantenimiento que se detectó en los baños, que en promedio fue de 82°C y varió desde 55°C a 95°C. Durante el proceso de cocción de los alimentos mueren las células vegetativas de *C. perfringens* pero no sus esporas; si las condiciones de temperatura no son favorables no se da la germinación de esas esporas y su posterior multiplicación hasta niveles que permitan llegar a la dosis infectante. En un estudio anterior Gutiérrez *et al.* (8) habían encontrado *C. perfringens* en un 46% de las muestras de carne cocida con un promedio de temperatura de mantenimiento de los baños termostáticos de 68,7°C. Dichos establecimientos fueron oportunamente notificados e instruidos acerca de la importancia de mantener la temperatura de los baños por encima de 75°C. Afortunadamente tales indicaciones aunadas a campañas de prevención y capacitación del Ministerio de Salud y la

Universidad de Costa Rica han sido exitosas. Aunque la frecuencia de *C. perfringens* en carnes cocidas es baja, la vigilancia epidemiológica no se debe disminuir, pues la materia prima a partir de la cual se preparan las carnes cocidas a menudo está contaminada.

Análisis de enterotoxigenicidad

Aunque menos del 5% de las cepas aisladas de *C. perfringens* tienen el gen que codifica para la enterotoxina (*cpe*) (4,21), son una causa importante de muchas enfermedades entéricas humanas y veterinarias (2-3,16-19). En este estudio se determinó la producción de la enterotoxina de *C. perfringens* en una muestra de 250 cepas (de un total de 1121) provenientes de todos los tipos de muestras analizadas. Únicamente 3 cepas (1,2%) fueron positivas, probablemente debido a que en su mayoría las cepas provienen de su ambiente natural, como lo es el suelo o los intestinos. Estos datos concuerdan con otras investigaciones que señalan que las cepas silvestres por lo general, no son productoras de enterotoxina (17,21,22). Sin embargo, es importante señalar que las cepas enterotoxina negativas, pero *cpe* positivas pueden llegar a activar el gen como resultado de choques térmicos repetidos (6), que pueden darse durante la cocción y mantenimiento de los alimentos y llegar a causar un problema de origen alimentario. Además, más recientemente, las cepas de *C. perfringens cpe* positivas también han sido implicadas en otras enfermedades gastrointestinales, tales como, diarrea asociada a antibióticos, diarrea esporádica (4) y enfermedad gastrointestinal en animales (16-19).

Los datos de este estudio demuestran la amplia distribución de *C. perfringens* en el ambiente y ponen de manifiesto el peligro potencial que representa para la salud del hombre y de los animales.

REFERENCIAS

- Hatheway CL. Toxigenic Clostridia. Clin Microbiol Rev 1990; 3:66-98.
- Rood JI. Virulence genes of *Clostridium perfringens*. Annu Rev Microbiol 1998; 52:333-360.
- Rood JI, Cole ST. Molecular Genetics and Pathogenesis of *Clostridium perfringens*. Microbiol Rev 1991; 55:621-648.
- Collie RE, Kokai-Kun JF, McClane BA. Phenotypic characterization of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* isolates from non-foodborne human gastrointestinal diseases. Anaerobe 1998; 4:69-79.
- Hatakka M. Microbiological quality of hot meals served by airlines. J Food Prot 1998; 61:1052-1056.
- Meer RR, Songer JG, Park DL. Human disease associated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. Rev Environ Contam Toxicol 1997; 150:75-94.
- Rodríguez E, Gamboa MM, Fernández B. Clostridios mesófilos en tierras de la Meseta Central de Costa Rica. Rev Biol Trop 1993; 41:365-369.
- Gutiérrez A, Gamboa MM, Rodríguez E, Arias ML. Presencia de *Clostridium perfringens* en preparaciones a base de carne en servicios de alimentación pública del Cantón Central de San José, Costa Rica. Arch Latinoam Nutr 1999; 49:275-278.
- Smith LDS, Williams BL. *Clostridium perfringens*. The Pathogenic Anaerobic Bacteria. CC Thomas Publisher, Illinois 1984:101-136.
- Morera J, Rodríguez E, Gamboa MM. Determinación de *Clostridium perfringens* en embutidos de carne de cerdo del Área Metropolitana de Costa Rica. Arch Latinoam Nutr 1999; 49:279-282.
- Peeler JT, Houghtby, Rainosek AP. The most probable number technique. In: Vanderzant M, Splittstoesser V, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods 3rd ed, A PHA 1992:105-120.
- Rhodehamel J, Harmon SM. *Clostridium perfringens*. In: Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. AOA International 8th ed, Gaithersburg 1995:1601-1651.
- Holdeman L, Cato E, Moore W. Anaerobe Laboratory Manual. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg 1977.
- Post DE. Food-borne pathogens. Monograph #4 Oxoid England.
- Labbé R, Harmon SM. *Clostridium perfringens*. In: Vanderzant M, Splittstoesser V, editors. Compendium of methods for the microbiological examination of foods 3rd ed, A PHA 1992:623-635.
- Miserez R, Frey J, Buogo C, Capaul S, Tontis A, Burnens A, Nicolet J. Detection of alpha-and epsilon-toxigenic *Clostridium perfringens* type D in sheep and goats using a DNA amplification technique (PCR). Lett Appl Microbiol 1998; 37:382-386.
- Netherwood T, Chanter N, Mumford JA. Improved isolation of *Clostridium perfringens* from foal faeces. Res Vet Sci 1996; 37:147-151.
- Donaldson MT, Palmer JE. Prevalence of *Clostridium perfringens* enterotoxin and *Clostridium difficile* toxin A in feces of horses with diarrhea and colic. J Am Vet Med Assoc 1999; 215:358-361.
- Herholz C, Miserez R, Nicolet J, Frey J, Popoff M, Gibert M, Gerber H, Straub R. Prevalence of beta2-toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders. J Clin Microbiol 1999;37:358-361.
- Trinh S, Biolat V, Reysset G. Growth response of *Clostridium perfringens* to oxidative stress. Anaerobe 2000;6:233-240.
- Czeczlin JR, Collie RE, McClane BA. Regulated expression of *Clostridium perfringens* enterotoxin in naturally *cpe*-negative type A, B, and C isolates of *C. perfringens*. Infect Immun 1996;64:3301-3309.
- Granum PE. *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. Int J Food Microbiol. 1990;10:101-112.
- Cornillot E, Granum P, Saint Joanis B, Daube G, Katayama S, Carand B, Cole S. The enterotoxin gene (*cpe*) of *Clostridium perfringens* can be chromosomal or plasmid-borne. Mol Microbiol 1995;15:639-647.

Recibido: 21-05-2001

Aceptado: 07-03-2002

Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche

Marcia Costa L., M. Francisca Gómez S., Luz H. Molina C., Ricardo Simpson R. y Alejandro Romero M.

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ICYTAL. Universidad Austral de Chile, Valdivia-Chile,
Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso-Chile

RESUMEN. El aumento de los niveles de contaminación de la leche cruda por bacterias psicrotróficas, durante el período en que ésta permanece refrigerada previo a su tratamiento en la planta, puede traducirse en la producción de enzimas termorresistentes responsables del deterioro de productos lácteos industrializados del tipo larga vida. *Pseudomonas fluorescens*, es la especie bacteriana psicrotrófica que con mayor frecuencia se encuentra en las leches del sur de Chile. En el presente trabajo se purificaron los extractos enzimáticos de proteasas obtenidos de cultivos a 6°C de *Pseudomonas fluorescens* RV10 en leches crudas recién ordeñadas. Se encontró que la proteasa corresponde a una proteína de masa molecular 49,5 kD, que presenta termorresistencia y que ataca rápidamente a la κ -caseína y luego a la β -caseína. Del trabajo es posible concluir que el almacenamiento de la leche a 6°C es riesgoso cuando va a ser destinada a productos del tipo larga vida, debido a la pérdida de calidad por la acción de proteasas de bacterias psicrotróficas.

Palabras clave: Psicrotróficas, proteasas termorresistentes, *Pseudomonas fluorescens*, leche cruda.

Es frecuente la contaminación de la leche cruda por bacterias psicrotróficas durante el período en que la leche se encuentra almacenada en los estanques prediales refrigerados, el transporte a la planta lechera en camiones cisterna y el almacenamiento en la industria. Si la contaminación es alta, puede traducirse en la producción de proteasas y lipasas termorresistentes, principales responsables del deterioro de productos lácteos industrializados, especialmente leches UHT (Ultra High Temperature) y otros del tipo larga vida (1- 5).

En Chile los estanques prediales, el transporte y los estanques silos operan a temperaturas reales entre 4°C y 6°C. Dentro de las cepas bacterianas encontradas en leches refrigeradas en la Xª Región, es importante por su alta frecuencia *Pseudomonas fluorescens* (6). En nuestro laboratorio se ha aislado la cepa RV10 con la cual se efectuaron estudios de crecimiento bacteriano y producción de enzimas termorresistentes en leches crudas recién ordeñadas almacenadas a 4°C (7).

Las proteínas de la leche principalmente están compuestas por caseínas (8), las que son degradadas por acción de las

SUMMARY. Purification and characterization of proteases from *Pseudomonas fluorescens* and their effects on milk proteins. The increase in the levels of psychrotrophic bacteria in the raw milk during the refrigeration period, could lead to the production of heat-resistant enzymes responsible for the deterioration of long-life industrial dairy products. *Pseudomonas fluorescens* is the psychrotrophic bacteria most commonly found in milk in Southern Chile. In the present work the enzymatic proteinases extract of cultures of *Pseudomonas fluorescens* RV10 at 6°C in raw milk just milked were purified. It was found that the protease corresponds to a protein with a molecular mass of 49.5 kD, that presents heat resistance and rapidly attacks the κ -casein continuing with the β -casein. It is possible to conclude that storage of the milk for long-life products at 6°C is risky, as it causes the loss of quality for the proteases of psychrotrophic bacteria.

Key words: Psychrotrophe, thermoresistant proteases, *Pseudomonas fluorescens*, raw milk.

enzimas termorresistentes producidas por microorganismos psicrotróficos provocando la proteólisis de la leche, lo que lleva a la coagulación, gelificación y la formación de sabores amargos en el producto terminado (9). Las caseínas se clasifican de acuerdo a su secuencia aminoacídica en α_1 , α_2 , β - y κ -caseína. Las distintas caseínas son muy susceptibles a la hidrólisis debido a que presentan una estructura no helicoidal al azar. Casi todas las caseínas de la leche fresca recién secretada están contenidas en partículas agregadas denominadas micelas. El modelo más aceptado para la conformación de las micelas de caseína presenta numerosas subunidades compuestas de (β -caseína en la mayor parte de la superficie, y α_1 , α_2 - y β -caseínas comprimidas al interior de las micelas. Cuando la leche es almacenada a bajas temperaturas, la β -caseína se disocia de las micelas y la cantidad de caseína soluble puede alcanzar hasta un 30%. Se ha sugerido entonces, que la refrigeración podría hacer a las fracciones de caseínas más susceptibles a la proteólisis (10).

Fairbairn y Law (1), han postulado un mecanismo que describe como ocurriría la proteólisis en la leche producida por enzimas de microorganismos psicrotróficos. Generalmente, las proteasas bacterianas de *Pseudomonas fluorescens*, atacarían a la κ -caseína para producir para- κ -caseína, esto produciría la desestabilización de las micelas de caseína, y por lo tanto, una severa hidrólisis de la κ -caseína que traería como consecuencia la coagulación de la leche, su gelificación y desarrollo de sabores a sucio y amargo. Los siguientes objetivos de esta investigación fueron purificar y caracterizar extractos enzimáticos obtenidos de cultivos en leche cruda a 6°C y determinar la fracción de proteínas de la leche sobre las cuales actuarían estas proteasas bacterianas.

MATERIALES Y METODOS

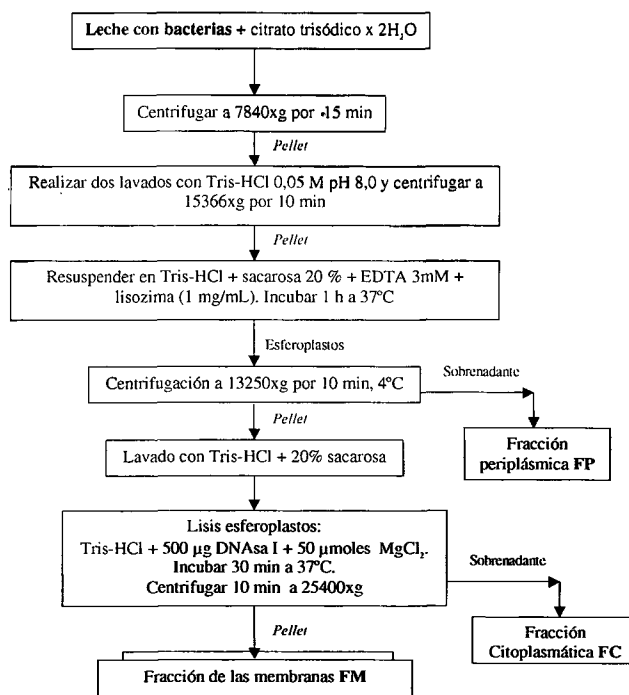
Cultivos

Los cultivos de *Pseudomonas fluorescens* RV10 se efectuaron en un fermentador modular (Gallenkamp) de 1 L, con control automático de pH y temperatura (6°C) sin aireación y con mínima agitación, en 500 mL de leche recién ordeñada de vacas sanas pertenecientes al fundo Vista Alegre de la Universidad Austral de Chile. Las leches fueron inoculadas con un cultivo previo de *Pseudomonas fluorescens* RV10 en caldo cerebro corazón de forma tal de obtener una concentración inicial de 4 a 6 x10³ ufc/mL. Se tomaron muestras cada 2 horas durante 100 horas y se determinó cada vez el recuento total en placa Agar Plate Count de acuerdo con Houghtby y col. (11) y la actividad proteásica mediante el método de Linden y col. (12), que fue modificado en el presente trabajo como sigue: 3 mL de leche se mezclan con 1 mL de una solución de leucyl-p-nitroanilida 6mM (Sigma Chemical Co.) en 20 mM buffer bis-tris propano (Sigma Chemical Co.) e incubados a 37°C por 2 h, al término del cual se toman 2 mL de la mezcla y se mezclan con 4 ml de etanol absoluto (Merck). Luego de dejar reposar unos minutos la mezcla es centrifugada a 14.700g por 20 min a 4°C. El sobrenadante es extraído cuidadosamente y se lee su absorbancia a 405 nm. Se construye una curva de calibración estándar de p-nitroanilina (Sigma Chemical Co.) en el rango de 0-200 μ moles/L. La actividad proteásica se expresa como μ M de p-nitroanilina (pNA) liberados en 2 h a 37°C.

Purificación de proteasas

El procedimiento seguido para extraer las enzimas de la muestra de leche con *Pseudomonas fluorescens* se presenta en la Figura 1 y está basado en los procedimientos de Extercate y Shamsuzzaman y McKellar (13,14). A cada una de las fracciones obtenidas en cada etapa se les determinó la actividad proteásica y concentración de proteínas, esta última mediante el ensayo mejorado de cobre alcalino (15).

FIGURA 1
Esquema del proceso llevado a cabo para el fraccionamiento subcelular



Para la purificación de las proteasas de *Pseudomonas fluorescens* se realizó una cromatografía en gel, utilizando una resina Sephadex G-75, para ello se empacaron aproximadamente 10 g de resina en una columna de 150,9 cm³ (Pharmacia). La resina fue equilibrada por 72 horas en buffer fosfato 50 mM, pH 7,2. Se eluyó a presión normal, con un flujo de 57 mL/h y para recoger las distintas fracciones se utilizó un colector de fracciones automático (Gilson). Para la calibración de la columna se utilizaron estándares de peso molecular conocido para columnas de filtración en gel de origen Sigma Chemical Co.: aprotinina (6,5 Kd), citocromo C (12,4 Kd), anhidrasa carbónica (29 Kd) y albúmina de suero bovino (66 Kd).

A todas las fracciones eluidas se les determinó la absorbancia a 280 nm para verificar presencia de proteínas y a aquellas que la contenían se les determinó actividad proteásica conforme el protocolo detallado anteriormente.

Se utilizó Blue Dextran (2x10⁶ Kd) (Sigma Chemical Co.) para obtener los valores de operación de la columna, se introdujeron los estándares, se recolectaron las fracciones, eluidas al mismo flujo utilizado para el Blue Dextran y se construyó la curva estándar que permitió determinar que el volumen de elución de la enzima correspondía a una proteína ubicada entre, anhidrasa carbónica y albúmina desuero bovino.

Caracterización parcial de las proteasas

Ensayos de termorresistencia

Se efectuaron ensayos de termorresistencia (100°C y 130°C, 120 s) a leche cruda inoculada con *Pseudomonas fluorescens* y a la fracción enzimática purificada por cromatografía de filtración gel y se determinó la actividad enzimática residual.

Determinación del peso molecular

Para la estimación del tamaño molecular se realizó una electroforesis del extracto enzimático obtenido por cromatografía en gel, utilizando geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Para esto, se utilizó una solución de acrilamida-bisacrilamida al 15%-0,4%. Se utilizó un sistema continuo, es decir la muestra de proteína fue colocada directamente sobre el gel separador. Para el gel separador se utilizó como tampón tris-HCl pH 8,8 y como tampón de corrida tris-glicina pH 8,3 (16,17).

Se adicionaron 20 µL de estándar y 50 µL de muestra de enzima en cada carril. La curva de calibración fue realizada con proteínas estándares de peso molecular conocido grado electroforético de origen Sigma Chemical Co.: albúmina de leche bovina (66 Kd), α-caseína (40% de β-caseína), κ-caseína (19 Kd), β-lactoglobulina (18,4 Kd). Las corridas se realizaron a temperatura de refrigeración y con una intensidad de 25 mA.

Una vez finalizada la corrida se fijaron las bandas con: metanol: ácido acético (50:10), y se tiñeron durante 1 h con azul de Coomassie R 200, en metanol:ácido acético:H₂O (50:10:40) y se destiñó el gel solución de destiñido metanol:ácido acético:H₂O (30:7:63), (16,17).

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las proteínas de la leche. Proteólisis causada por enzimas de *Pseudomonas fluorescens*

Mediante la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), es posible separar las distintas caseínas que forman parte de las proteínas de la leche y a través de los distintos patrones electroforéticos constatar en qué extensión y cuáles de estas proteínas han sido degradadas por acción de una enzima proteolítica, en este caso de *Pseudomonas fluorescens*.

Para realizar esta experiencia se incubaron muestras de leche cruda inoculada con *P. fluorescens* por intervalos de 1, 2, 3 y 6 días a 4°C, con la finalidad de verificar las diferencias en los patrones electroforéticos.

El ensayo se realizó tomando un volumen de 10 mL de leche al que se le adicionaron lentamente 5 mL de TCA (ácido tricloroacético) al 24%, bajo agitación constante. Después de permanecer en reposo durante 90 minutos a temperatura ambiente (25°C), el precipitado de caseína y proteínas del

siero fue removido por filtración en papel filtro Whatman N°5, (18). Posteriormente el precipitado fue lavado y resuspendido en buffer gel al volumen inicial.

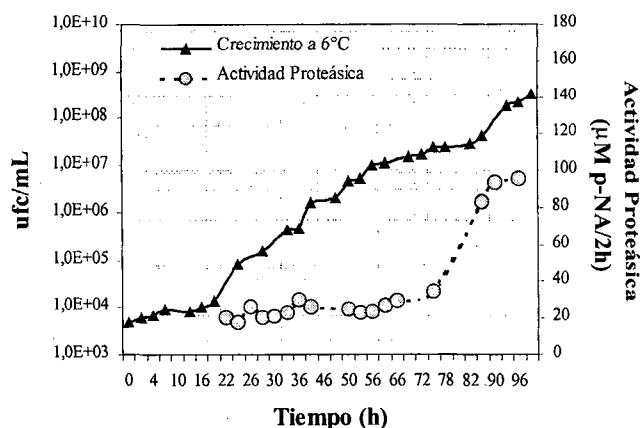
Luego se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) bajo las mismas condiciones aplicadas en la determinación de la masa molecular.

RESULTADOS

Cultivos

El resultado de los cultivos efectuados a 6°C se presenta en la Figura 2 donde es posible observar el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* y la producción de proteasas, mostrando un acelerado aumento de actividad luego de las 72 h.

FIGURA 2
Curvas de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* y actividad proteásica a 6°C



Purificación de las proteasas bacterianas

En la Tabla 1 se muestran los valores de actividad enzimática y concentración de proteínas obtenidos para el fraccionamiento subcelular realizado para purificar parcialmente las proteasas bacterianas. Estos resultados obtenidos muestran que la fracción en la cual se encuentra mayoritariamente la actividad proteásica corresponde a la fracción periplásmica (FP), lo que estaría indicando que la proteasa estaría unida a alguna zona de la membrana de la célula bacteriana.

Cromatografía de filtración en gel

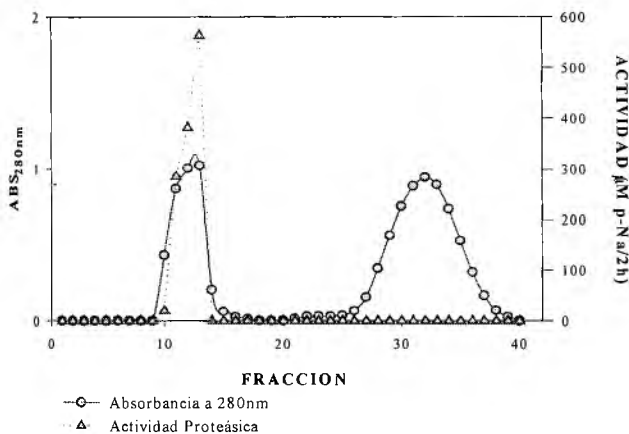
En el Figura 3, se presenta el perfil de elución del extracto enzimático, encontrándose mayor actividad proteásica luego del fraccionamiento subcelular. Se pueden observar claramente dos picos, y solamente el primer pico, la fracción 13, representaría a la proteasa aislada de *Pseudomonas fluorescens*.

TABLA 1
Resultados del fraccionamiento subcelular realizado para purificar parcialmente las proteasas de *Pseudomonas fluorescens*

Fracción	Actividad proteásica (µM p-NA/2 h)	Concentración de proteínas (µg/mL)
Leche con bacterias (cultivo de 6 °C)	416,5	---
Pellet, 1ª centrifugación	402,2	---
Esferoplastos	231,2	---
Pellet esferoplastos	43,0	---
Fracción de las membranas, FM	0,0	86,9
Fracción citoplásmica, FC	31,5	375,3
Fracción periplásmica, FP	119,0	244,1

FIGURA 3

Cromatografía en Sephadex G-75, en buffer fosfato pH 7,2 del extracto enzimático purificado de un cultivo realizado a 6°C en leche cruda entera



Caracterización de las proteasas purificadas por cromatografía en gel

La Figura 4 presenta el resultado de la electroforesis donde se puede apreciar que la masa molecular de la proteasa purificada mediante cromatografía en gel es de 49,5 Kd.

En cuanto a la resistencia de las enzimas proteolíticas al calor, en la Figura 5 se presentan las curvas de inactivación térmica para la enzima de *Pseudomonas fluorescens* en leche cruda entera y en el extracto enzimático purificado por cromatografía de filtración molecular. Se observa que para los tratamientos a diferentes temperaturas la enzima retiene en un menor porcentaje la actividad proteásica a la temperatura más elevada (130°C), en este caso un 4,9% de actividad residual a los 120 s y para el extracto purificado de 2,4% a los 120 s.

FIGURA 4

Determinación del peso molecular de extracto enzimático obtenido por cromatografía en gel

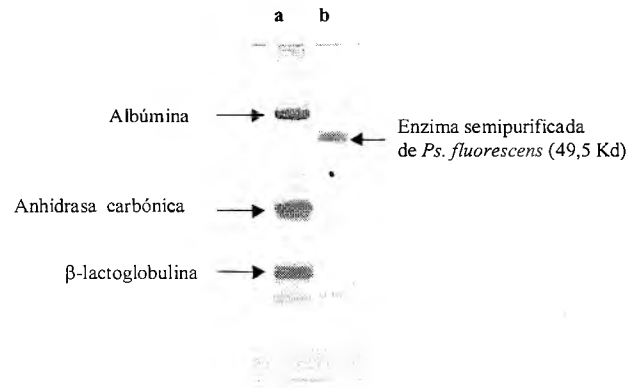
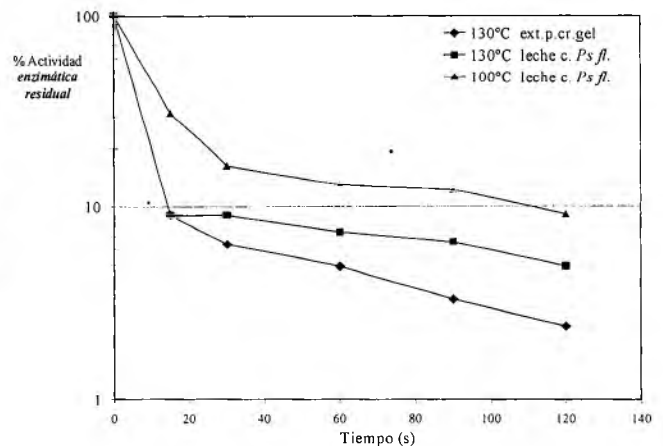


FIGURA 5

Curvas de inactivación térmica de leche cruda con *Pseudomonas fluorescens* (100°C y 130°C) y del extracto enzimático purificado por cromatografía de filtración en gel (130°C)



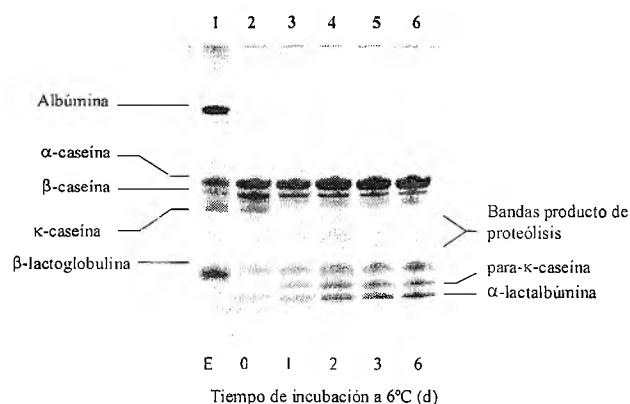
Proteólisis por enzimas de *Pseudomonas fluorescens*

En la Figura 6 se puede observar una fotografía del gel de la electroforesis donde se puede apreciar una considerable hidrólisis de las caseínas de la leche, no así de las proteínas del suero (β-lactoglobulina y α-lactalbúmina). En el carril Nº 2, se ubica la leche cruda no inoculada (T₀) y en los carriles Nº 3, 4, 5 y 6 las muestras de leche cruda inoculada con bacterias psicrotróficas e incubadas por 1, 2, 3 y 6 días, respectivamente a 4°C. En la primera muestra se aprecia que la banda correspondiente a la κ-caseína desaparece casi por completo. Así también, podemos observar una disminución de la banda que corresponde a la β-caseína. La acción sobre la α-caseína no es detectable a simple vista. En las restantes muestras se aprecia también la desaparición de la banda de

κ -caseína, pero aparece otra banda que correspondería a la para- κ -caseína, incrementando su intensidad a medida que aumenta el tiempo de incubación. De igual forma se encontraron otras bandas que corresponderían a polipéptidos producto de la hidrólisis de la β -caseína, dada la disminución de la intensidad de dicha banda.

FIGURA 6

SDS-PAGE de muestras de leche cruda inoculadas con *Pseudomonas fluorescens* e incubadas por diferentes tiempos a 4°C. En el carril N° 2, se ubica la leche cruda no incubada y en los carriles N° 3,4,5 y 6 las muestras de leche cruda incubadas por 1,2,3 y 6 días, respectivamente. En el carril N° 1 se ubica el estándar



DISCUSION Y CONCLUSIONES

El crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* y la producción de proteasas fue evidenciado en el cultivo en leche llevado a cabo a 6°C, las curvas que presentan ambos comportamientos indican que a partir de las 72 h y cuando la concentración celular alcanza niveles de 10^7 ufc/mL se produce un incremento notable en la actividad proteásica, lográndose al final del cultivo niveles de actividad sobre 90 μ M pNA/2h, al efectuar la purificación del extracto enzimático. Siguiendo el protocolo de Extercate (13) se encontró que la proteasa se encuentra asociada a la membrana bacteriana y presenta marcada termorresistencia.

La característica más particular de las bacterias psicrotróficas presentes en la leche cruda es su capacidad de producir enzimas degradativas, sobre las cuales los tratamientos de pasteurización y de ultra alta temperatura (UHT) tienen pocos efectos en su inactivación. *Pseudomonas fluorescens*, es predominante en la flora de la leche refrigerada y es enzimáticamente activa, reteniendo una actividad residual entre un 14% y un 51% (19).

Se ha descrito que proteasas de 13 especies de *Pseudomonas* psicrotróficas retuvieron entre el 55% y el 65% de su actividad luego de un tratamiento a 77°C por 17 segundos, y alrededor del 20 al 40% de la actividad fue detectada luego de un tratamiento a 140°C por 5 segundos (20).

Estos estudios confirman los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde el valor D (tiempo necesario para reducir la actividad en un 90%) de la proteasa de leche cruda a 100°C es cercano a los 2 minutos, no así para la misma fuente de proteasa a 130°C, donde D es aproximadamente de 30 segundos. En el caso del extracto enzimático tratado a 130°C, D es de 15 segundos aproximadamente, indicando así la mayor termoestabilidad que estas proteasas presentan en la leche. Lo anteriormente señalado coincide con un estudio realizado por Barach y col. (21), donde se comprobó que la termoestabilidad de la proteasa de *Pseudomonas spp.* MC60 a 149°C en leche y en buffer suplementado con Ca^{2+} , fue mayor que en buffer sin Ca^{2+} o en agua. Esto indicaría, además, que la estabilidad de las proteasas estaría dada por el Ca^{2+} y no por las proteínas de la leche (22).

En este estudio se determinó que la proteasa purificada tiene un peso molecular de 49,5 Kd aproximadamente, lo que fue determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La proteasa purificada además presenta una alta actividad del tipo aminopeptidasa, y que estaría asociada a la célula bacteriana ya que durante el fraccionamiento subcelular se encontró que la actividad estaba principalmente asociada a la fracción periplásmica. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Shamsuzzaman y McKellar (10), quienes estudiaron dos cepas de *Pseudomonas fluorescens*, la 240 y 32A, que mostraron actividad asociada a la célula y que fue demostrado por el fraccionamiento subcelular; dos peptidasas fueron purificadas de la cepa 32A, una de ellas hidrolizaba específicamente N- α -benzoyl-DL-arginina-4-nitroanilida que fue denominada como endopeptidasa, y la otra hidrolizaba L-lisina- y L-leucina-4-nitroanilida y fue denominada como aminopeptidasa.

En cuanto a la proteólisis provocada por esta enzima sobre las distintas fracciones proteicas de la leche (proteínas del suero o caseínas), se observa que la proteasa causa una extensa degradación, afectando principalmente a la κ -caseína, hecho que es corroborado por la presencia de una banda que correspondería a la para- κ -caseína. Además de la κ -caseína, la β -caseína también es degradada rápidamente, ya que se aprecia una disminución en la intensidad de esta banda en el gel, mientras que sobre la α -caseína no se aprecia un efecto degradativo significativo.

Por otro lado, sobre la fracción de las proteínas del suero (α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina) no se observa degradación.

Las proteínas del suero serían más resistentes a la proteólisis por estas enzimas proteolíticas, seguramente atribuible a que poseen una estructura terciaria más compacta, lo cual las protegería de la acción de la enzima. Esto no ocurriría en el caso de proteínas parcialmente desnaturalizadas o proteínas con estructuras más abiertas, como es el caso de las caseínas, que son más sensibles al ataque enzimático.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Grieve y Kitchen (23), donde se estudió la proteólisis causada en la leche por la presencia de leucocitos y por las proteasas naturales y de origen bacteriano. Los perfiles de degradación para el caso de las enzimas bacterianas mostraron que la κ -caseína fue atacada prontamente, como lo indicó la rápida aparición de la banda de para- κ -caseína, y que la β -caseína fue hidrolizada mucho más rápidamente que la α_{s1} -caseína, además de la aparición de ocho fragmentos de hidrólisis, provenientes principalmente de la degradación de la fracción de la β -caseína.

De este estudio se puede concluir en general, que el almacenamiento de la leche a 6°C es riesgoso cuando va a ser destinada a productos del tipo larga vida, debido a la pérdida de calidad por la acción de proteasas de bacterias psicrotróficas. Particularmente se pudo observar que:

- Cultivos realizados con leche cruda a 6°C con *Pseudomonas fluorescens* muestran una considerable producción de enzimas con elevada actividad proteásica a partir de las 72 horas de incubación y cuando el recuento bacteriano alcanza los 10^7 ufc/mL.
- La termoestabilidad de la enzima encontrada es mayor en la leche cruda que en buffer si se comparan los resultados obtenidos a 130°C.
- La proteasa purificada presenta una actividad del tipo aminopeptidasa ya que hidroliza en forma extensa al sustrato sintético L-leucil-4-nitroanilida.
- Esta enzima estaría probablemente asociada a la envoltura de la célula bacteriana, según los resultados obtenidos del fraccionamiento subcelular.
- Se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), que la enzima tiene un peso molecular de 49,5 Kd.
- Los resultados obtenidos por SDS-PAGE para la proteólisis causada por la proteasa purificada, indican que el efecto degradativo afectaría en forma casi inmediata a la κ -caseína, para luego atacar a la fracción que corresponde a la β -caseína y menos visible para el caso de la α -caseína. Efectos degradativos no fueron observados sobre la fracción del suero.

Esta investigación fue financiada por el Proyecto FONDECYT 1951116.

REFERENCIAS

1. Fairbairn D.J y Law BA. Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. J Dairy Res. 1986; 53: 139-177.
2. Shah NP. Psychrotrophs in milk: a review. Milchwiss. 1994; 49(8): 432-437.
3. Kohlmann KL, Nielsen SS and Steenson LR. Production of proteases by psychrotrophic microorganism. J Dairy Sci. 1991; 74(10): 3275-3283.
4. Mottar J. Heat resistant enzymes in UHT milk and their influence on sensoric changes during uncooled storage. Milchwiss. 1981; 36(2): 87-91.
5. Celestino EL, M Iyer and H Roginski. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. Aust. J Dairy Technol. 1996; 51:59-63.
6. Levicán J. Caracterización de la flora psicrotrófica y sus proteasas en la leche cruda refrigerada. Tesis. Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 1992. p. 132.
7. Costa M, Herrera VM, Romero A y Carrasco E. Purificación y caracterización de proteasas y lipasas producidas por *Pseudomonas fluorescens* en leche a 4°C. Alimentos, Chile. 1997; 22(1-2):73-82.
8. Alais C. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. 1985. 2ª Ed. Barcelona, Reverte.
9. Law BA, Andrews AT and Sharpe ME. Gelation of ultra-high-temperature-sterilized milk by proteases from a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from raw milk. J Dairy Res. 1977;44: 145-148.
10. Cromie S. Psychrotrophics and their enzyme residues in cheese milk. Aust. J. Dairy Technol. 1992; 47: 96-100.
11. Houghtby GA, LJ Maturin and EK Koenig, (Messer, J.W., Tech. Comm.). Chapter 6. Microbiological Counts Methods. In: Standard Methods of Dairy Products, 16th Edition. Robert T. Marshall, Editor. American Public Health Association. 1992; 213-244.
12. Linden G, Humbert G, Desnouveaux R et J Picard. Applications de la dissolution complete du lait à la détermination de quelque activités enzymatiques. Le Lait. 1982; 62(615-616): 209-219.
13. Exterkate FA. Location of peptidases outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. Appl Environ. Microbiol. 1984; 7(1):177-183.
14. Shamsuzzaman K and McKellar R. Peptidases from two strains of *Pseudomonas fluorescens*: partial purification, properties and action on milk. J Dairy Res. 1987;54: 283-293.
15. Stoscheck CM. Section II. General Methods for Handling Proteins and Enzymes. 6. Quantitation of Protein. En: Methods in Enzymology, Volume 182: Guide to Protein Purification Purification. Deutscher, M.P., Ed., Academic Press Inc., London. 1990.
16. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;224:680.
17. Hill SHA and Gasson M J. A qualitative screening procedure for the detection of casein hydrolysis by bacteria, using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. J Dairy Res. 1986;53:625-629.

18. Urbán G, Pérez N, Vega y León S, Fresón C y M Pinto. Separación por electroforesis (PAGE-SDS) del caseinomacropéptido liberado por quimosina sobre la κ -caseína. Efecto de la proteólisis por bacterias psicrótrofas. Agro Sur, Chile. 1998;26(2): 110-120.
19. Muir D. The shelf-life of dairy products: 3. Factor influencing intermediate and long life dairy products. J Soc Dairy Tech. 1996;49(3): 67-72.
20. Griffiths MW. Effect of temperature and milk fat on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophic bacteria during growth in milk. Milchwiss. 1989;44(9): 539-542.
21. Barach JT, Adams DM and Speck ML. Stabilization of a psychrotrophic *Pseudomonas* protease by calcium against thermal inactivation in milk at ultra high temperature. App. and Environ. Micr. 1976_a; 31(6): 875-879.
22. Barach JT, Adams DM and Speck ML. Low temperature inactivation in milk of heat-resistant proteases from psychrotrophic bacteria. J Dairy Sci. 1976_b; 59(3): 391-395.
23. Grieve PA and Kitchen BJ. Proteolysis in milk: the significance of proteinases originating from milk leucocytes and comparison of the action of leucocyte, bacterial and natural milk proteinases on casein. J Dairy Res. 1985;32:101-112.

Recibido: 11-04-2001

Aceptado: 28-01-2002

Distribución de la proteína en fracciones físicas de la molienda y tamizado del grano de amaranto

María Ester Búcaro Segura y Ricardo Bressani

Centro de Estudios en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Instituto de Investigaciones.
Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala

RESUMEN. El objetivo del estudio fue establecer la distribución de las proteínas en las fracciones físicas de harina de amaranto, en particular entre la harina del germen y la harina del perispermo. La distribución de las proteínas se obtuvo aplicando la serie de solventes utilizadas en la Metodología de Osborne & Mendel. La muestra de 2000 g de *A. cruentus* se dividió en cuatro partes iguales de 500 g. Una se tomó como control y las restantes fueron molidas individualmente con un molino de 3 fases. Cada harina fue luego tamizada por 18, 20, 30 y 40 mesh, obteniendo de cada lote de harina 5 fracciones. Muestras de estas harinas se observaron por estereoscopia y se analizaron por humedad, grasa y proteína. Estas características sugirieron que la fracción retenida en 30 mesh y la que pasaba 40 mesh posiblemente era el perispermo y el germen respectivamente. La de 30 mesh contenía 2.34% de grasa y 9.05% de proteína mientras que la que pasó 40 mesh contenía 16.18% de grasa y 26.46% de proteína. La extracción y fraccionamiento de las proteínas indicó que las fracciones proteínicas más importantes tanto en germen como en el perispermo fueron las solubles en agua y glutelinas medidas por Kjeldahl. La relación solubles en agua + globulinas a glutelinas fue de 2.1 a 1 en el grano, de 1.9 a 1 en el perispermo y de 1.7 a 1 en el germen. La distribución de las proteínas en el perispermo es muy similar a la distribución en el germen. Los niveles de prolaminas en los dos tejidos son significativamente bajos. La extracción de las proteínas de la harina retenida en 30 mesh posiblemente el perispermo fue 71.1% medido por Kjeldahl y fue de 47.4% por el método de Bradford.

Palabras claves: Grano de amaranto, harinas, fracciones de diferentes granulometría, composición química, distribución proteínica, perispermo y germen.

INTRODUCCION

El grano de amaranto en una planta ancestral de uso popular entre los antiguos habitantes del continente latinoamericano. La discontinuación de su uso se debió mas a supersticiones que a un razonamiento científico, sin embargo en base a sus cualidades nutritivas y potencial de uso en alimentos, su disponibilidad y utilización se está incrementando. Durante los últimos 20 años, el grano de amaranto se ha estudiado extensamente, tanto desde el punto de vista genético agronómico como en los otros eslabones

SUMMARY. Protein fraction distribution in milling and screened physical fractions of Grain amaranth. The purpose of the study was to establish the protein distribution based on solubility in physical fractions of amaranth flour, in particular between the flour from the germ and that from the perisperm. The protein distribution was obtained applying a series of solvents sequentially utilized in the classical methodology of Osborne & Mendel. The sample of *A. cruentus* weighing 2000 g was divided into 4 subsamples of 500 g each. One was left as the control while the other 3 were ground individually with a mill. Each flour was screened through 18, 20, 30 and 40 mesh screens, so that 5 fractions were obtained from each of the whole grain flours. Samples of each screened fractions were observed by stereoscopy and analyzed for moisture, fat and protein. This characterization suggested that the fraction above the 30 mesh screen and the flour which passed the 40 mesh screen probably were the perisperm and germ respectively. The 30 mesh sample contained 2.34 fat and 9.05% protein while the 40 mesh contained 16.18% fat and 26.46 % protein. The extraction and partitioning of the proteins indicated that the most important fractions in germ and perisperm were the water soluble and glutelins measured by Kjeldahl. The relationship of the water soluble + globulin to glutelin ratio was 2.1 to 1 in the whole grain, 1.9 to 1 in the perisperm and 1.7 to 1 in the germ. The distribution of proteins was very much alike between germ and perisperm. The levels of prolamines were quite low. The protein extraction of the perisperm proteins retained on the 30 mesh screen was low (71.1%) measured by Kjeldahl and 47.4% with the Bradford method to measure protein.

Key words: Grain amaranth, flour of different particle size, chemical composition, protein distribution, perisperm and germ.

de la cadena alimentaria, incluyendo desarrollo de productos y valor nutritivo (1-3). El alto potencial del amaranto como fuente alimenticia se basa en su alto contenido de proteína que varía entre 13-18% (4-6). Además esa proteína esta compuesta por un buen balance de aminoácidos esenciales, principalmente lisina, aunque se ha informado que es deficiente en treonina (4). Debido a lo interesante de la composición de la proteína, varios investigadores han estudiado el contenido de fracciones proteínicas en el grano. Bressani y García Vela (7) informa. on que la distribución de proteínas en el grano basada en su solubilidad, era de 20.7%

de albúminas, 19.2% de globulinas, 2.2% de prolaminas y 49.5% de glutelinas, con una relación entre globulina y albúmina de 0.95.

Este hallazgo coincidió con investigaciones de Soriano-Santos y col (8) y Segura-Nieto y col (9) usando harina del grano de amaranto. Konishi y col (10) hallaron contenidos altos de albúminas y globulinas pero con una relación globulina/albumina de 1.2 - 2.3. Numerosas investigaciones en este tema (11- 14), han utilizado diversidad de soluciones para la extracción de proteína y siempre se ha encontrado una mayor porción de albúmina y globulina, seguido de glutelinas como grupo proteico individual más importante y las prolaminas en muy pequeñas cantidades y hasta consideradas como proteínas de reserva, como se ha indicado en el caso de los cereales.

Gorinstein y Moshe (12), declaran en su trabajo que el fraccionamiento proteico y la composición de aminoácidos del amaranto es mas comparable a la soya que a los cereales. La composición de aminoácidos de las proteínas constituyentes del grano fue descrita por Barba de la Rosa y colaboradores (13,14) así: albúmina rica en lisina y valina, globulina rica en metionina y cisteína; prolamina rica en aminoácidos azufrados y fenilalanina y, por último, las glutelinas en leucina, treonina e histidina. En general las glutelinas exhiben la mayor proporción de aminoácidos esenciales (2,12).

Recientemente Barba de la Rosa y colaboradores (13,14) recomendaron una serie de solventes que encontraron óptimos para la extracción y caracterización de las proteínas de la semilla entera del amaranto. Sin embargo, todos los estudios realizados hasta el momento se han hecho con el grano entero y no con las dos fracciones más importantes del grano como son el germen y el perispermo y se ha postulado en el presente estudio que las fracciones proteicas del germen y perispermo son diferentes, como en los cereales.

Betschart y colaboradores (15) usaron sistemas de molienda perlado y lograron separar con bastante éxito el germen del perispermo, confirmándose luego su éxito mediante la separación manual del grano. Una de las fracciones, el germen, se caracteriza por un alto contenido de grasa y proteína (2.3 - 2.6 veces mas), vitaminas y minerales; la otra fracción, el perispermo se caracteriza por alto contenido de almidón. Estos autores encontraron que el contenido de aminoácidos del perispermo era diferente al del germen. El puntaje químico fue de 88 para el perispermo y 72 para el germen; sin embargo, el PER del germen fue de 1.83, mientras que el del perispermo fue de 0.62. Estas diferencias no fueron explicadas, pero sugieren que posiblemente existían mayores diferencias entre los aminoácidos esenciales, proteínas constitutivas y su distribución entre las dos fracciones físicas de la semilla.

El objetivo de la presente investigación fue establecer la distribución de las diversas clase de proteínas por sus

características de solubilidad en varios solventes, presentes en las fracciones físicas del grano de amaranto, el germen y el perispermo, obtenidas por abrasión y tamizaje.

MATERIALES Y METODOS

Para la realización del estudio se utilizó la variedad 84S-K277 (Rodale) que es un *Amaranthus cruentus*. La semilla fue cultivada en Ahuachapan, El Salvador en 1993 y almacenada a 5-8°C hasta su utilización. De un total de 2000 g, se prepararon 4 submuestras de 500 g cada una. Una de ellas de grano entero se utilizó como muestra control y los otros 3 se pasaron individualmente por un molino de 3 fases con un voltaje de 230, 7.8 amperios y 60 ciclos. (Molino # 1050, Lee Engineering Company, Milwaukee, Wisc. USA). Cada muestra fue pesada antes y después de la molienda y luego almacenada a 5-8°C hasta el momento de la siguiente operación. Esta consistió en fraccionar físicamente la harina integral del amaranto pasándola por 4 mallas y pesando lo retenido en 18, 20, 30, y 40 mesh y la cantidad que pasaba 40 mesh. El agitador eléctrico con las mallas se operó por 15 minutos por lote de 125 g para un total de 500 g de harina. Cada porción fue pesada, envasada y almacenada a 5-8°C hasta la siguiente fase que fue la extracción y fraccionamiento de la proteína.

Todas las muestras fueron molidas nuevamente a 40 mesh para análisis químico y fraccionamiento del nitrógeno. Las muestras fueron analizadas por humedad, grasa y proteína de acuerdo a los métodos de la AOAC (16).

Previo a la extracción y fraccionamiento de la proteína, las muestras fueron primero tratadas con hexano en frío para remover la grasa por un período no menor de 24 horas. Luego se evaporó el solvente y las muestras se almacenaron a 5-8°C. Para la solubilización y fraccionamiento de la proteína, se utilizó básicamente el método de solubilidad de las proteínas de Osborne y Mendel en diferentes solventes secuencialmente en muestras de 1 g de peso repetido 3 veces por cada muestra. Las proteínas solubles en agua y el nitrógeno proteico se obtuvieron en extracciones con 10 ml de agua destilada. Se agitó por una hora y luego se centrifugó por 90 minutos. El sobrenadante se colocó en un balón de 25 ml. El residuo fue extraído dos veces más con 8 ml de agua destilada y los sobrenadantes mezclados y ajustados a 25 ml. El residuo fue utilizado para solubilizar y fraccionar las globulinas con 10, 8 y 8 ml de solución 0.17 M de Na₂HPO₄ (pH7) y se ajustó el volumen a 25 ml. El residuo se utilizó para la extracción de las prolaminas 3 veces con 10, 8 y 8 ml cada vez con 70% de propanol y el volumen se ajustó a 25 ml y finalmente el residuo fue tratado con 10, 8 y 8 ml de una solución de 0.1 M ácido bórico, con 1% (w/v) de dodecil sulfato de sodio y 0.6% de 2 mercapto etanol a un pH de 10 para extraer las glutelinas. El residuo fue luego

secado y analizado por proteína, así como los extractos por el método Kjeldahl de la AOAC (16). Los extractos también fueron analizados por su contenido de proteína por el método de Bradford (17). Los resultados fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSION

Durante la molienda el grano se recuperó 95.51% de harina de un peso inicial de 500 g. El fraccionamiento físico de las harinas dió los datos de peso de cada fracción que se indican en la Tabla 1.

TABLA 1
Rendimiento de tamizado de las muestra molidas

Mesh	Rendimiento %
Retenida en # 18	7.97 ± 0.97
Retenida en # 20	34.32 ± 1.19
Retenida en # 30	24.51 ± 0.88
Retenida en # 40	8.69 ± 0.37
Pasó # 40	24.52 ± 1.00

La distribución por peso retenido en 18, 20, 30 y 40 mesh primero aumentó en 20 mesh y luego disminuyó en 30 y 40 mesh. La cantidad que pasó 40 mesh fue del 24.52% del peso tamizado. De acuerdo a los datos de Bestchart y col (15) quienes usaron el pulidor Strong Scott, informaron de un rendimiento del 25% de peso original de grano que llamaron germen/cáscara y 75% que lo llamaron perispermo, cifras similares a los del presente estudio. Sin embargo, Konishi y col (10) reportaron valores de 35% de germen y 65% de perispermo.

De acuerdo a los datos de fraccionamiento físico del presente estudio, se puede sugerir que la fracción que pasó 40 mesh con un rendimiento de 24.52% es equivalente a la fracción cáscara/germen de Bestchart y col (15), aunque no es muy seguro sugerir que las cantidades retenidas en 18, 20, 30 y 40 mesh correspondan al perispermo de Bestchart y col (15). Sánchez-Marroquín y col (18,19) usando un pulidor Strong Scott y fraccionamiento por tamices de 30 y 60 mesh informaron valores de 75.8% de perispermo y 22% de cáscara/germen. La suma de las fracciones físicas de 18, 20, 30 y 40 mesh del estudio suman 75.5% del peso original de harina, que podría ser el perispermo. Sin embargo fotografías de las fracciones mostraron que sólo las fracciones físicas retenidas en 30 y 40 no mostraban adherido en forma obvia el germen. La suma de estas dos fracciones fue del 33%.

Con el fin de poder disponer de una mejor caracterización de las fracciones, estas se sometieron a un análisis químico de humedad, grasa y proteína. La Tabla 2 resume los datos.

TABLA 2
Contenido de humedad, grasa y proteína en fracciones de tamizado de *A. cruentus*

Muestra	Humedad %	Grasa %	Proteína %	Proteína* %
Grano	11.59 ± 1.08	7.53 ± 0.22	15.78 ± 0.06	18.13 ± 0.20
Retenida en # 18	11.59 ± 0.18	5.19 ± 0.02	12.04 ± 0.07	10.66 ± 0.16
Retenida en # 20	11.80 ± 0.11	4.29 ± 0.01	10.51 ± 0.08	
Retenida en # 30	11.70 ± 0.12	2.34 ± 0.08	9.05 ± 0.08	9.52 ± 0.10
Retenida en # 40	10.94 ± 0.07	6.40 ± 0.12	15.01 ± 0.14	15.56 ± 0.03
Pasó # 40	9.48 ± 0.27	16.18 ± 0.52	26.46 ± 0.07	30.45 ± 0.11

Harina desgrasada - Se unieron las fracciones retenidas en 18 y 20 mesh.

La humedad varió de 9.48 ± 0.27% en la fracción que pasó 40 mesh a 11.80 ± 0.4% en la fracción retenida en 20 mesh. No se encontró diferencias estadísticamente significativas entre repeticiones, pero sí entre fracciones a un p. de 0.05. Con respecto al contenido de lípidos totales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre repeticiones pero sí entre fracciones. La fracción que pasó 40 mesh contenía entre 2 a 7 veces más lípidos que las fracciones retenidas en 18, 20, 30 y 40 mesh. Se conoce que el germen de los cereales es rico en contenido de aceite, lo que confirma que esta fracción (que pasó el tamiz de 40 mesh) es el germen/cáscara del grano de amaranto. La fracción retenida en 40 mesh es entre las fracciones de 18, 20 y 30 la de mayor contenido de lípidos, lo que sugiere que contiene alguna cantidad de germen. Referente al contenido de proteína, hubo diferencias estadísticamente significativas entre fracciones aunque no entre repeticiones.

La fracción física que pasó 40 mesh fue la que contenía la mayor cantidad de proteína, mientras que la fracción retenida en 30 mesh fue la que contenía la menor cantidad. Estos datos se interpretaron en el sentido que la fracción retenida en 30 mesh era el perispermo, fracción rica en almidón y la fracción que pasó 40 mesh, el germen que de nuevo contiene más proteína que el endospermo en granos, en particular cereales. Las muestras se observaron por estereoscopia tomando fotografías de cada fracción. El anillo en el grano que es el germen de acuerdo a Irving y col (20) estaba visualmente ausente en la muestra retenida en 30 mesh en la que se observaba el perispermo, mientras que en la fracción retenida en 40 mesh se veían porciones de una estructura amorfa y más en la fracción que pasó 40 mesh. La fracción amorfa era probablemente el germen.

La extracción y el fraccionamiento de la proteína se llevó a cabo en muestras desgrasadas con hexano. Como se

esperaba el contenido de proteína aumentó tanto en el grano entero como en las fracciones físicas de la molienda en muestras sin lípidos (Tabla 2).

Los resultados de la extracción y fraccionamiento de las diferentes proteínas y fracciones, establecido por análisis de proteína por Kjeldahl se detallan en la Tabla 3.

TABLA 3
Distribución proteínica en las fracciones físicas de la molienda del grano de amaranto (%)*

Muestras	Soluble en agua	Globulina	Prolamina	Glutelina	Residuo	Total
Grano	34.10 ± 0.64	21.64 ± 0.16	4.14 ± 0.06	25.85 ± 0.13	4.34 ± 0.09	89.41 ± 2.02
Retenida en #18/20	26.62 ± 0.26	26.24 ± 0.05	3.46 ± 0.17	27.89 ± 0.84	0.70 ± 0.05	84.91 ± 1.25
Retenida en # 30	22.76 ± 0.04	19.59 ± 0.12	5.82 ± 0.07	22.49 ± 0.24	0.45 ± 0.02	71.13 ± 0.35
Retenida en # 40	23.50 ± 0.22	15.64 ± 0.22	4.45 ± 0.09	24.96 ± 0.12	13.81 ± 0.08	82.35 ± 0.17
Pasó # 40	28.93 ± 0.73	26.25 ± 0.03	6.23 ± 0.08	31.17 ± 0.19	4.57 ± 0.08	97.15 ± 0.82

* Método Kjeldahl

El análisis de varianza no encontró diferencias estadísticas significativas entre repeticiones pero si encontró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre fracciones proteínicas y residuo entre fracciones físicas o harinas. La comparación que interesa es la distribución de proteína en la fracción retenida en 30 mesh (supuestamente perispermo) con lo que pasó el mesh 40 (supuestamente germen). Esta comparación muestra que la fracción física germen contiene mayor cantidad de proteína soluble en agua, globulina, prolamina y glutelina que la fracción física perispermo. Es de interés indicar que el total extraído y recuperado fue del 71.1% para la fracción retenida en 30 mesh, el perispermo y 97.1% para el germen lo cual puede explicar la diferencia. Si se asume una recuperación igual para las dos fracciones físicas la distribución proteínica entre perispermo y germen es similar.

Bestchart y col (15) informaron que el puntaje químico en aminoácidos de la fracción física perispermo era ligeramente superior al puntaje químico del germen, sin embargo el PER fue mejor para la proteína del germen que para la proteína del perispermo. Lo cual fue atribuido a una baja biodisponibilidad de los aminoácidos del perispermo.

Esto último podría estar también asociado a la baja solubilidad o reducida extracción de las proteínas del perispermo de acuerdo a los resultados presentados.

La distribución de las proteínas entre las diferentes fracciones físicas medida por el método de Bradford, dió un patrón similar al utilizar el método micro Kjeldahl, aunque en bases absolutas los valores más bajos, lo cual se evidencian en la cantidad total recuperada que fue menor que al usar el Kjeldahl (Tabla 4).

TABLA 4
Distribución proteínica en las fracciones físicas de la molienda del grano de amaranto (%)*

Muestras	Soluble en agua	Globulina	Prolamina	Glutelina	Residuo	Total
Grano	28.55 ± 0.21	19.44 ± 0.09	0.59 ± 0.01	24.71 ± 0.09	4.34 ± 0.07	77.63 ± 0.25
Retenida en #18/20	24.49 ± 0.19	21.52 ± 0.26	0.52 ± 0.01	20.01 ± 0.21	0.70 ± 0.05	67.24 ± 0.20
Retenida en # 30	17.33 ± 0.28	12.50 ± 0.30	0.85 ± 0.03	16.27 ± 0.07	0.45 ± 0.02	47.40 ± 0.11
Retenida en # 40	15.71 ± 0.20	13.64 ± 0.16	0.73 ± 0.02	21.52 ± 0.21	13.81 ± 0.08	65.41 ± 0.33
Pasó # 40	20.19 ± 0.12	24.51 ± 0.22	0.95 ± 0.03	28.63 ± 0.11	4.57 ± 0.08	78.57 ± 0.27

* Método Bradford

Es de interés mencionar que la recuperación de la fracción retenida en mesh 30 fue baja para los dos métodos de evaluación de la proteína. Aunque podría ser una interferencia por el hexano como fue sugerido por Segura-Nieto y col (8), también puede ser debido a la estructura del perispermo que se caracteriza por un alto contenido de almidón en células pequeñas y compactas protegiendo de esa manera las estructuras proteínicas.

Evaluaciones biológicas en amaranto han mostrado que la calidad nutritiva de su proteína se muestra cuando el grano es procesado (21). No ha habido explicación confirmada. Se ha indicado que es debido a presencia de inhibidores, pero también podría ser biodisponibilidad limitada en grano crudo debido al gránulo compacto del almidón.

Con el fin de tener una mejor comparación entre la distribución de las proteínas en el grano entero, en el

«perispermo» y el «germen» por los dos métodos de análisis de proteína, se calculó la cantidad de cada fracción en base al total soluble. Como se puede observar en la Tabla 5 la distribución del contenido de las proteínas solubles en agua, de globulinas y glutelinas en las 3 muestras físicas fueron similares usando el método de Bradford en comparación con el Kjeldahl no así en prolaminas.

TABLA 5
Distribución protéica en el grano, «perispermo» y «germen» de *A. cruentus* de acuerdo con el método de análisis de proteína (% del total solubilizado)

Muestra	Soluble en agua	Globulina	Prolamina	Glutelina	Alb + Glo / Glu
		Bradford			
Grano	39.07	26.30	0.83	33.80	1.9 / 1
Perispermo	37.11	26.20	1.75	34.94	1.8 / 1
Germen	27.33	33.05	1.28	38.34	1.6 / 1
		Kjeldahl			
Grano	39.24	25.08	4.82	30.23	2.1 / 1
Perispermo	32.54	28.11	8.28	31.02	1.9 / 1
Germen	30.71	28.57	6.79	33.93	1.7 / 1

Los datos del estudio concuerdan con los de Gorinstein y col (12) quienes indicaron que las prolaminas representan el 1% de las proteínas del grano de amaranto.

Los resultados de esta investigación indican que no existen grandes diferencias en la distribución de proteínas entre la fracción morfológica perispermo y germen lo cual es la razón de la similitud de los patrones de aminoácidos en las dos fracciones físicas como fuera indicado por Bestchart y col. (15). La distribución de proteínas en el perispermo del grano de *A. cruentus* es muy diferente a que lo que se ha informado para los cereales, en los cuales las prolaminas son las proteínas más abundantes en la proteína del endospermo. La distribución de las proteínas del germen de los cereales es sin embargo, similar a las del germen del amaranto.

REFERENCIAS

- Saunders R & R Becker. Amaranthus: A potential feed resource. *Ad Cereal Sci & Tech.* 1984;6:357-396.
- Singhal R and P Kulkarni. Review: Amaranthus - under utilized resource. *J Food Sci & Tech.* 1988;23:125-139.
- Amaranth. *Biology, Chemistry and Technology.* Ed. O. Paredes - López CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida USA. 1994;223 p.
- Bressani R. The proteins of grain Amaranth. *Food Revs Int.* 1989;5:13-38.
- Singhal R & P Kulkarui. Composition of the seeds of some Amaranth species. *J Sci Food Agric.* 1988;42:325-331.
- Bressani R, A Sánchez - Marroquín & E Morales. Chemical composition of grain Amaranth cultivars and effects of processing on their nutritional quality. *Food Revs Intal.* 1992;1:23-49.
- Bressani R and L García Vela. Protein fractions in Amaranth grain and their chemical characterization. *J Agr & Food Chem.* 1990;5:1205-1209.
- Soriano-Santos J, S Wiwabuchi, and K Fujimoto. Solubility of Amaranth seed proteins in sodium sulphate and sodium chloride. The main factor in quantitative extraction for analysis. *J Food Sci & Tech.* 1992;27:337-346.
- Segura-Nieto M, N Vasquez-Sánchez and R Rubio Velásquez. Characterization of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L) seed proteins. *J Agric & Food Chem.* 1992;9:1553-1558.
- Konishi Y, Y Fumita & K Ikeda. Isolation and characterization of globulin from seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L *Biol Chem.* 1985;5:1453-1459.
- Duarte - Correa A & R Carrison. Amino acid composition of some Amaranthus sp. grain proteins and of its fractions. *Arch Latino Amer Nutr.* 1986;3:466-476.
- Gorinstein S and R Nioshe. Evaluation of flour Amaranthus species through protein electrophoretic patterns and their amino acid composition. *J Agr & Food Chem.* 1991;5:851-854.
- Barba de la Rosa A, O Paredes - López O. Gueguen. Fractionation produces, electrophoretic characterization, and amino acid composition of Amaranth seed proteins. *J Ag & Food Chem.* 1992;6:931-936.
- Barba de la Rosa A, O Paredes - López, O Gueguen. Fractionation produces, characterization of Amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques. *J Ag & Food Chem.* 1992;6:937-940.
- Bestchart A, D Irving & Allen D. Shepherd. And R. M. Saunders. Amaranthus cruentus: milling characteristics, distribution of nutrients within seed components and the effects of temperature on nutritional quality. *J Food Sci.* 1981;46:1181-1187.
- AOAC 1984. Official Methods on Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12ed. Association of Official Analytical Chemistry Inc. 1141 p.
- Bradford M. A rapid and substitute method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal Biochem.* 1976;12:248-254.
- Sánchez-Marroquín A, S Maya and MV Domingo. Effect of heat treatment and milling on the seed flour, rheological and protein quality of some Amaranth ecotypes. *Arch Latino Amer Nutr.* 1985;35:603-619.
- Sánchez-Marroquín A, S Maya and MV Domingo. Milling Procedures and air classification of Amaranth flours. *Arch Latino Amer Nutr.* 1985;35:620-630.
- Irving D, A Bestchart & R Saunders. Morphological studies on Amaranthus cruentus. *J Food Sci.* 1981; 4:1170-1174.
- Bressani R, JM González, LG Elías & M Melgar. Effect of fertilizer application on the yield, protein and fat content, and protein quality of raw and cooked grain of three Amaranth species. *Plant Foods Hum Nut.* 1987;37:59-57.

Recibido: 29-08-2001

Aceptado: 04-03-2002

Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano subhúmedo de México

Patricia Pérez Herrera, Gilberto Esquivel Esquivel, Rigoberto Rosales Serna, Acosta-Gallegos Jorge A.

CEVAMEX-INIFAP, Chapingo-México

RESUMEN. En el mejoramiento genético de una especie se requiere de la caracterización de los progenitores utilizados en el mismo, a fin de conocer su utilidad como fuente genética de un carácter determinado, así como para planear las combinaciones apropiadas. La presente investigación tuvo como objetivo la caracterización de un grupo de 49 genotipos de *Phaseolus vulgaris* y uno de *Phaseolus coccineus*, en cuanto a las características físicas, de calidad culinaria y nutricional del grano. La variedad Blanco Tlaxcala (*P. coccineus*) presentó mayor tamaño de grano y menor contenido de proteína que los genotipos de *P. vulgaris*. El 86% de los genotipos evaluados mostraron tiempos de cocción menores a 115 min, característica relacionada con la capacidad de absorción de agua ($r=-0.78^{**}$). Redlands Pioneer e ICA Zerinzza resultaron de cocción rápida y Perry Marrow, Kaboon e ICA Zerinzza pueden ser utilizados para desarrollar variedades con bajo contenido de testa. Los genotipos G 2333, Negro Lolotla, REN 27 y J 117 mostraron alto contenido de proteína. BY 94022, Pinto Villa y Negro 150 presentaron la menor actividad de inhibidor de tripsina en frijol cocido. Se encontró suficiente variación genética en la mayoría de las características de calidad determinadas, por lo que existe la posibilidad de su mejoramiento a través de la recombinación y selección.

Palabras clave: Absorción de agua, tiempo de cocción, contenido de proteína, variación genética, mejoramiento.

SUMMARY. Physical, culinary and nutritional characterization in dry bean from the semiarid highlands of Mexico. In the improvement of a given crop species, knowledge on the grain quality and related traits in the progenitors used in the breeding process is needed to establish their usefulness as a source of a given character, and as well as to plan the proper combinations between progenitors. The aim of the present research was to characterize a group of 49 genotypes of *Phaseolus vulgaris* and one of *Phaseolus coccineus*, in relation to physical, cooking and nutritional grain traits. Cultivar Blanco Tlaxcala (*P. coccineus*) showed a larger grain size and lower protein content than any of the *P. vulgaris* cultivars. The 86% of the studied genotypes showed cooking times lower to 115 min, and a significant correlation between this trait and water sorption capacity ($r=-0.78^{**}$) was found. Cultivars Redlands Pioneer and ICA Zerinzza could be used as source of low cooking time; and Perry Marrow, Kaboon and ICA Zerinzza in the production of low shell content cultivars. Genotypes G 2333, Negro Lolotla, REN 27 and J 117 showed the highest grain protein content. On the other hand, BY 94022, Pinto Villa and Negro 150 had the lowest trypsin inhibitor activity. Results support the possible use of the above genotypes as sources of those grain traits. In general, large variability was found for most of the quality traits determined; therefore, there is scope for improvement through recombination and selection.

Key words: Seed water absorption, cooking time, protein content, genetic diversity, breeding.

INTRODUCCION

El grano de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uno de los alimentos de importancia en México, ya que junto con el maíz aportan prácticamente la totalidad de las proteínas vegetales que consumen los estratos sociales de bajos ingresos de la ciudad y del campo, ocupando un lugar predominante dentro de la dieta. Además, esta leguminosa constituye un complemento nutrimental al consumo de los cereales, especialmente del maíz (1,2).

En el pasado, los programas de mejoramiento genético del frijol enfocaban sus esfuerzos a la obtención de materiales con buenas características agronómicas, como alto rendimiento por hectárea, resistencia a condiciones ambientales adversas y patógenos, de ciclo vegetativo corto

y uniformidad de planta y grano (1). No obstante, las características de calidad del grano son importantes para los consumidores de frijol. Por ello, en el Programa de Mejoramiento Genético de Frijol del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP), se da importancia a las características físicas, químicas y culinarias del grano como criterios adicionales de selección. Se reconoce la trascendencia de las propiedades del grano que influyen en su aceptación comercial, además de los parámetros importantes desde el punto de vista nutricional. Lo anterior abre la posibilidad de ofrecer mejores variedades tanto a productores como a consumidores.

En frijol existen diferentes clases y su valor comercial es influenciado por características como tamaño, color y uniformidad del grano, además del tiempo de cocción, sabor

y espesor del caldo (3). Por otra parte, el valor nutrimental de esta leguminosa esta determinado en gran medida por el contenido de proteína y su digestibilidad, pues este grano es una de las principales fuentes de este nutrimento para la población de escasos recursos.

Con base en lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue caracterizar en términos de calidad del grano, a los progenitores utilizados en el Programa de Mejoramiento Genético de Frijol del INIFAP. La identificación de materiales con características de calidad sobresalientes permitirá su utilización para llevar a cabo las combinaciones adecuadas entre ellos.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Calidad de Frijol del CEVAMEX-INIFAP, ubicado en Chapingo, Mex. El germoplasma utilizado en este estudio consistió en 49 genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) y uno de frijol ayocote (*P. coccineus*) (Tabla 1). Estos se sembraron en el ciclo agrícola primavera-verano 1996 bajo condiciones de temporal más riego suplementario en el Campo Experimental Valle de México del INIFAP, situado a los 19°29'N, 98°53' O, 2240 msnm, y con una precipitación anual de 635 mm. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con dos repeticiones, la parcela experimental consistió de dos surcos de 6 m de longitud separados a 0.6 m. El experimento se sembró después de un riego de presiembra el día 20 de mayo

y antes de la siembra se fertilizó el suelo con una dosis de 100 kg/ha de cada uno, urea y superfosfato triple.

En madurez de cosecha los granos fueron separados de las plantas y almacenados bajo condiciones ambientales en la bodega del Programa de Frijol. Posteriormente se enviaron muestras de cada parcela y repetición al Laboratorio de Calidad, en donde muestras de 25 granos de frijol por parcela fueron analizados en cuanto a características físicas como el peso y volumen de 100 granos y el contenido de testa, el cuál se determinó mediante separación de esta estructura del grano después de un remojo del mismo y posterior secado a 60°C (4,5). La capacidad de absorción de agua (CAA) se determinó registrando el peso inicial de muestras de 25 granos y peso final luego de remojarlas en agua por 18 h y cuantificó mediante la siguiente fórmula (4,5):

$$CAA = \frac{(\text{Peso de muestra después del remojo} - \text{Peso inicial de muestra}) \times 100}{\text{Peso inicial de muestra}}$$

El tiempo de cocción se cuantificó de acuerdo al procedimiento de evaluación sensorial descrito por Elías, García-Soto y Bressani (5). Para ello se colocó en un equipo Labconco para determinación de fibra cruda, un vaso de Berzelius con 300 ml de agua destilada hasta alcanzar la ebullición. A éste se le agregó una muestra de 25 granos de frijol y mantuvo en ebullición hasta completar la cocción del grano. El tiempo de cocción se registró cuando el 90% de los granos presentaron una textura granular suave al paladar.

TABLA 1
Genotipos de frijol pertenecientes al grupo de Progenitores del Programa de Mejoramiento de Frijol del CEVAMEX-INIFAP, México. 1996

Blanco Tlaxcala ¹	Negro Tacaná	Pinto Bayacora	TLP 19
Bayomex	Negro 150	ICA Zerinzá	TLP 20
Bayo Zacatecas II	Negro 8025	Bola 60 días	TLP 22
Bayo Baranda	Ojo de Cabra Santa Rita	Ochenteño	A 193
Bayo Mecentral	Garbancillo Zarco	Chihuahua 86	G 122
Bayo Victoria	Amarillo de Calpan	Cacahuate 72	G 2333
Bayo Alteño	Flor de Mayo Bajío	Canario 107	G 4523
Bayo criollo del Llano	Flor de Mayo M 38	Durango 8	G 13746
Bayo INIFAP	FM 94006	Puebla 152	G 17717
BY 91023	Perry Marrow	Michigan Dark Red Kidney (MDRK)	G 19428
BY 94022	Redlands Pioneer	Satevó	J 117
Negro Perla	Pinto Villa	Kaboon	
Negro Lolotla	Pinto Zapata	REN 27	

¹ *Phaseolus coccineus* L

El porcentaje de sólidos en el caldo de cocción se evaluó por diferencia de peso, sometiendo 10 ml del caldo o licor de cocción a un secado a 60°C, en cajas de petri durante aproximadamente 48 h.

La evaluación del contenido de proteína se determinó en muestras molidas de frijol crudo (molino UDY con malla 0.4 mm) con un equipo Technicon Autoanalyzer II, usando el procedimiento descrito por Larry y Charles (6). La digestibilidad *in vitro* de la proteína se determinó por el método de Hsu, Vavak, Satterlee y Miller (7), en frijol cocido, sometido a secado a 60°C durante 72 horas y una molienda en un molino UDY (malla 0.4 mm). El nivel de inhibidor de tripsina se cuantificó en frijol cocido igualmente acondicionado, según el método descrito por Smith, Van Megen, Twaalfhoven y Hitchcock (8), en donde la actividad del inhibidor de tripsina se determinó a través de la pérdida de la actividad de la tripsina, bajo condiciones estándar.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se sometieron a un análisis de varianza, utilizando un diseño completamente al azar con dos repeticiones. En características en las cuales se detectaron diferencias significativas entre genotipos, se realizó la prueba de

comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia de 0.05. Los resultados de ésta prueba no se incluyen en el trabajo, pero sí las figuras en las que se presentan los genotipos con valores estadísticamente más altos y más bajos para las características evaluadas (Figuras 1 a 6).

La digestibilidad *in vitro* de la proteína y la actividad del inhibidor de tripsina se cuantificaron en una sola repetición y por ello no fueron sometidas a análisis de varianza, sin embargo, si se presentan y discuten sus estadísticas básicas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los análisis de varianza detectaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre genotipos para todas las características evaluadas, la excepción fueron la digestibilidad *in vitro* de la proteína y la actividad del inhibidor de tripsina que no se analizaron por no contar con información a través de repeticiones. Se encontró una gran variabilidad entre genotipos en todos los parámetros estudiados (Tabla 2). Las diferencias fueron más notorias en la capacidad de absorción de agua y tiempo de cocción; resultados similares a los obtenidos por Jacinto, Acosta-Gallegos y Ortega (3).

TABLA 2
Estadísticas básicas de características de calidad evaluadas en 49 genotipos de *Phaseolus vulgaris* y uno de *P. coccineus*, var. Blanco Tlaxcala

Característica	<i>Phaseolus vulgaris</i>			DE	CV%	Blanco Tlaxcala
	Media	Mínimo	Máximo			
Peso 100 granos (g)	34,8	16,0	58,3	10,8	31,0	88,4
Volumen 100 granos (ml)	27,7	12,0	44,0	9,0	32,5	76,0
Capacidad de absorción de agua (%)	83,4	6,1	126,9	32,1	38,4	104,5
Testa (%)	8,2	5,5	11,4	0,9	11,1	8,7
Proteína (%)	23,5	20,4	29,0	2,0	8,7	18,4
Tiempo de cocción (min)	91,5	46,0	207,0	36,6	40,1	69,0
Sólidos en caldo (%) ¹	0,41	0,16	0,76	0,1	26,8	0,36
Digestibilidad <i>in vitro</i> (%)	85,3	82,1	89,1	1,8	2,1	86,2
Actividad de inhibidor de Tripsina (mg/g)	1,38	0,50	1,97	0,3	24,9	1,4

DE= Desviación estándar; CV = Coeficiente de variación (%)

¹ Incluye resultados de 46 genotipos que conservaron el grano íntegro después de la cocción

La digestibilidad *in vitro* de la proteína mostró la menor variación entre los genotipos estudiados. En el análisis estadístico del contenido de sólidos en caldo (tanto de estadísticas básicas, como análisis de varianza que se discute posteriormente) sólo se consideraron los resultados de 46 genotipos de *P. vulgaris* y 1 de *P. coccineus* que conservaron el grano entero después de la cocción, ya que los genotipos de *P. vulgaris* de grano grande Kaboon, Michigan Dark Red Kidney (MDRK) y A 193 presentaron valores muy altos para

este parámetro (5.7%, 5.7% y 1%) como resultado de la ruptura de grano antes de completarse su cocción.

Por otra parte, además de la digestibilidad *in vitro* de la proteína, los porcentajes de proteína y de testa mostraron los menores coeficientes de variación de todos los parámetros evaluados.

Los resultados obtenidos en la variedad Blanco Tlaxcala (*P. coccineus*) se presentan por separado en la Tabla 2, debido a sus características particulares en relación a los demás

genotipos estudiados de *P. vulgaris*.

En las Figuras 1 a 8, citadas en las siguientes secciones, se presentan los resultados obtenidos con genotipos de características contrastantes, para cada una de las variables analizadas.

Peso y volumen de 100 granos

La amplitud de las medias del peso y volumen de 100 granos de los genotipos de *P. vulgaris* estudiados se ubicaron en el intervalo de 16.0 a 58.3 g y 12.0 a 44.0 ml, respectivamente (Tabla 2). Estos resultados soportan la amplia variabilidad existente en los materiales analizados para dichos parámetros.

La variedad Blanco Tlaxcala de *P. coccineus*, comúnmente conocido como frijol ayocote, presentó el mayor tamaño de grano. Las semillas de *P. coccineus* son generalmente reniformes y de tamaño grande, siempre mayores a las de *P. vulgaris* (9). *P. coccineus* es una especie compatible con *P. vulgaris* y su inclusión en el grupo de progenitores tuvo por objetivo el desarrollo, a través de cruza interespecíficas, de genotipos de frijol con adaptación a sitios altos (>2400 msnm), en los que *P. coccineus* se adapta adecuadamente (9).

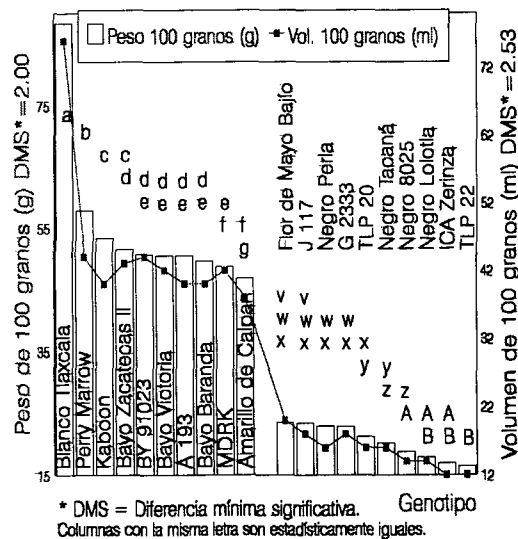
Dentro de los genotipos de *P. vulgaris* con grano más grande se encontraron genotipos de frijol tipo bayo, como Bayo Zacatecas, Bayo Victoria, Bayo Baranda y la línea BY 91023; materiales de grano blanco como Perry Marrow y Kaboon (diferenciales de antracnosis de origen andino, que poseen genes de resistencia a antracnosis muy efectivos en el Altiplano de México), además de la variedad Michigan Dark Red Kidney (MDRK) de grano rojo arriñonado, la línea A 193 (con grano rojo moteado crema) y la variedad criolla Amarillo de Calpan. Por otra parte, dentro de los genotipos de grano más pequeño predominaron los frijoles negros entre los que se encuentran Negro Lolotla (weedy type), Negro 8025, Negro Tacaná, Negro Perla y las líneas TLP 22 y TLP 20, además de los materiales ICA Zerinzza, G 2333, J 117 y Flor de Mayo Bajío, con diferente color y forma de grano (Figura 1). Estos resultados son similares a los obtenidos por Jacinto, Acosta-Gallegos y Ortega (1993), quienes al estudiar un grupo de 40 variedades mejoradas de frijol, encontraron que las variedades de frijol bayo se ubicaron dentro de las de mayor peso y volumen; mientras que las de grano más pequeño fueron las variedades de frijol negro tropical (3).

Capacidad de absorción de agua y contenido de testa

La capacidad de absorción de agua de los materiales estudiados mostró un amplio rango de variación, ubicándose entre valores promedio del 6.1% al 126.9% (Figura 2), con un C.V. del 38.4% (Tabla 2). De los 50 materiales analizados, 29 de ellos (el 57%) presentaron una absorción de agua su-

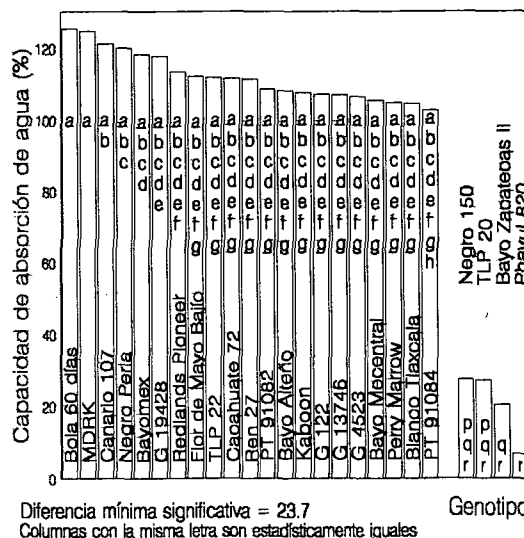
perior al 90%, que puede considerarse bastante adecuada para obtener tiempos de cocción menores a los 110 min; 12 genotipos absorbieron entre un 50% a 90% de su peso y sólo 10 menos del 50%; destacando la variedad criolla Durango 8 por su baja capacidad de absorción (6.8). Es conocida la baja capacidad de absorción de agua y dureza a la cocción de los genotipos de la región semiárida (10), de donde proviene la variedad Durango 8.

FIGURA 1
Genotipos con valores extremos de peso y volumen de 100 granos



* DMS = Diferencia mínima significativa.
Columnas con la misma letra son estadísticamente iguales.

FIGURA 2
Genotipos con valores extremos de capacidad de absorción de agua

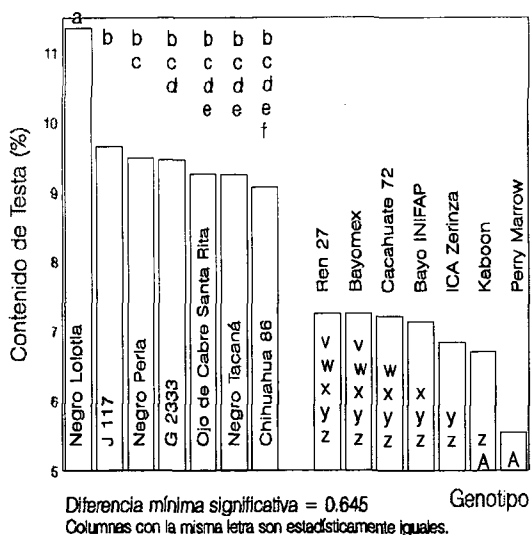


Diferencia mínima significativa = 23.7
Columnas con la misma letra son estadísticamente iguales

El contenido de testa fue el parámetro físico con menor variabilidad entre genotipos (C.V.= 11.1%), el cual representó entre un 5.5% a 11.4% del peso del grano (Tabla 2), encontrándose genotipos de frijol con contenidos de testa inferiores a los reportados por Jacinto, Acosta-Gallegos y Ortega (3). Dentro de los materiales evaluados, destacaron la variedad Negro Lolotla (weedy type) por su alto contenido de testa (11.4%) y los genotipos Perry Marrow, Kaboon, ICA Zerínza, Bayo INIFAP, Cacahuatate 72, Bayomex y REN 27, por contener una baja proporción de esta estructura, con valores inferiores al 7.5% (Figura 3).

FIGURA 3

Genotipos con valores extremos de contenido de testa



El contenido de testa, al parecer, fue una característica modificada en forma indirecta durante el proceso de domesticación, ya que los frijoles silvestres de *P. vulgaris* muestran diferentes grados de latencia, al parecer asociados a la impermeabilidad de la testa, similares al de Negro Lolotla (weedy type). Sin embargo, es probable que la impermeabilidad de la testa no sólo este dada por el porcentaje de la misma, ya que otros compuestos o estructuras intrínsecas de ésta, pudieran afectar la imbibición (11).

De acuerdo con los resultados de las Pruebas de Tukey (P=0.05) (datos no presentados), no se observó un patrón definido en la capacidad de absorción de agua de acuerdo al color o apariencia del grano. Sin embargo, en el caso del porcentaje de testa, dentro de los genotipos que presentaron el mayor peso de esta estructura del grano, se encontraron preferentemente frijoles negros brillantes (Negro Lolotla y N. Perla), negros opacos (N. Tacaná) y del tipo ojo de cabra (J 117, Ojo de Cabra Santa Rita y Chihuahua 86); mientras que aquellos grupos correspondientes a los de menor porcentaje de testa se ubicaron principalmente frijoles de color blanco tipo alubia (REN 27, ICA Zerínza y Kaboon).

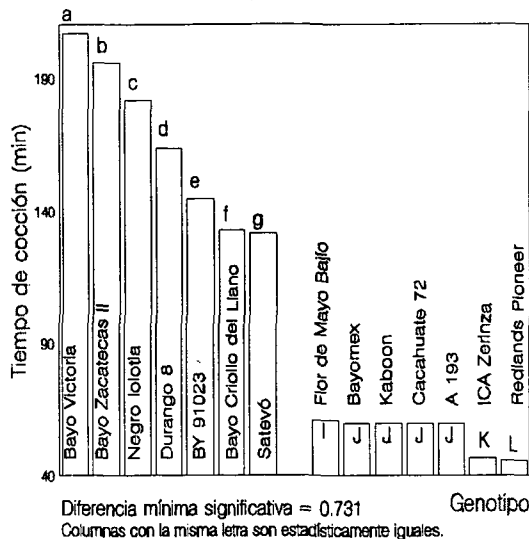
Tiempo de cocción

El tiempo de cocción constituye uno de los parámetros de calidad más importantes en el grano de frijol. La variabilidad observada en el tiempo de cocción fue alta (C.V.= 40.1%), con valores ubicados entre los 46 a 207 min (Tabla 2). Cuarenta y uno de los 50 genotipos evaluados (82%) mostraron tiempos de cocción menores a los 110 min. Sólo 7 genotipos superaron los 115 min de tiempo de cocción. De lo anterior se deduce que la mayoría de los materiales que se utilizan como progenitores en el programa de mejoramiento genético, poseen tiempos de cocción adecuados. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la calidad del frijol no sólo esta determinada por este parámetro, sino también por su apariencia, sabor, valor nutricional, etc. (3,12,13).

Los genotipos Redlands Pioneer e ICA Zerínza resultaron sobresalientes por su bajo tiempo de cocción de 46 y 47 min, respectivamente; así como las variedades Flor de Mayo Bajío, Cacahuatate 72, Kaboon y Bayomex, además de la línea A 193, que requirieron de un tiempo de cocimiento entre 60 y 61 min. Por lo anterior, estos genotipos deben utilizarse como progenitores para el desarrollo de variedades de rápida cocción (Figura 4). Además, Kaboon y A 193 son fuentes comprobadas de resistencia a la antracnosis (14).

FIGURA 4

Genotipos con valores extremos de tiempo de cocción



Por el contrario, las variedades Bayo Victoria, Bayo Zacatecas II, Negro Lolotla, Durango 8, la línea BY 91023, Bayo criollo del Llano y Satevó mostraron tiempos de cocción mayores a 130 min, con excepción de Negro Lolotla, todas provienen de la región del Altiplano semiárido de México; destacando las dos primeras variedades por requerir 207 y 196 min para cocerse, respectivamente.

La dureza a la cocción en los genotipos de frijol de la región semiárida de México ya ha sido señalada (3,10,15). Sin embargo, las variedades de lenta cocción arriba señaladas, poseen excelente adaptación a las condiciones erráticas climáticas de la región semiárida (resistencia a la sequía o estabilidad de rendimiento).

Espesor de caldo

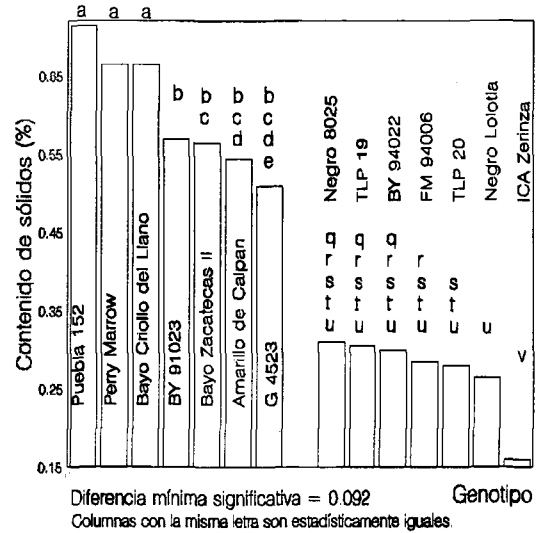
El espesor de caldo, evaluado en términos de porcentaje de sólidos en el caldo de cocción, presentó una variación entre el 0.16% al 0.76% en 47 de los 50 materiales estudiados, hecho que indica que la mayoría de los genotipos produjeron caldos poco espesos.

Los 3 genotipos restantes, Kaboon (tipo alubia), MDRK y A 193 (grano rojo y rojo moteado, respectivamente), presentaron porcentajes de sólidos en caldo de 5.71%, 5.70% y 0.99%, en el mismo orden. Lo anterior se debió a que los granos de estos materiales se rompieron antes de cocerse, favoreciendo la salida de sólidos del cotiledón hacia el caldo de cocción durante el tiempo restante requerido para completar la cocción, por lo anterior, dichos genotipos no se incluyeron en el análisis estadístico.

El rompimiento de los granos fue más notorio en las variedades Kaboon, que presentó un contenido relativamente bajo de testa (6.7%) y un tiempo de cocción corto (60 min), y en MDRK, con un porcentaje intermedio de testa (8.7%) y un tiempo de cocción ligeramente mayor (70 min). Esto sugiere que el contenido de testa no es factor determinante en la ruptura del grano durante la cocción, sino que la fragilidad de esta estructura y capacidad de hinchamiento del cotiledón al ser sometidos a la acción del calor en presencia de agua durante el cocimiento, pueden facilitar el rompimiento del grano; además de la naturaleza estructural del cotiledón que pueda favorecer la salida de sólidos al caldo de cocción. Lo anterior se refuerza en el hecho de que el genotipo A 193, con un contenido de testa intermedio (7.9%) y un tiempo de cocción de 60 min, a pesar de sufrir ruptura del grano durante el proceso de cocción, no permitió la salida de un porcentaje de sólidos tan grande como la variedad Kaboon, con el mismo tiempo de cocción.

Entre los 47 genotipos restantes, el mayor contenido de sólidos en el caldo lo presentaron genotipos de grano grande como Perry Marrow, Bayo Zacatecas, la línea BY 91023 y Bayo criollo del Llano; así como frijoles blancos tipo alubia con bajo porcentaje de testa (Perry Marrow y Kaboon). Entre los genotipos que produjeron los caldos más delgados se encuentran frijoles negros como Negro Lolotla (brillante) con el mayor porcentaje de testa (11.4%) y TLP 20, TLP 19 y Negro 8025 (opacos) (Figura 5), resultados que coinciden con datos reportados por otros autores (3).

FIGURA 5
Genotipos con valores extremos de sólidos en caldo de cocción

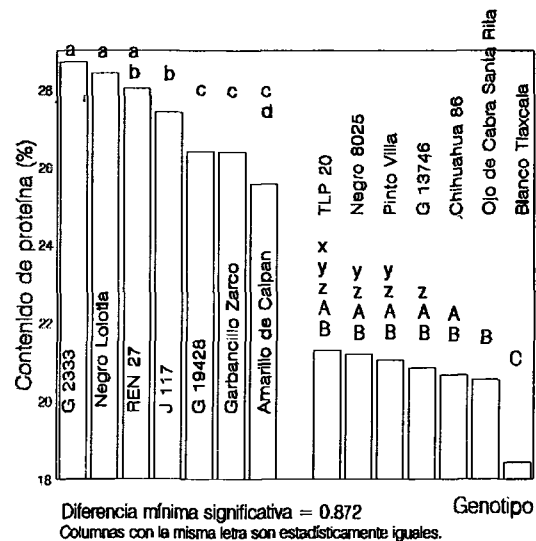


En nuestro país los frijoles negros se consumen preferentemente como frijoles refritos (16), por lo que la presencia de caldos ligeros para este tipo de materiales no afecta su aceptación por parte del consumidor. Por otra parte, en frijoles tipo bayo o alubia, la presencia de caldos más espesos resulta preferible desde el punto de vista sensorial.

Contenido de proteína

El contenido de proteína promedio de los materiales estudiados varió dentro de los límites de 20.4% a 29.0%, con un coeficiente de variación en los genotipos de *P. vulgaris* de 8.7% (Tabla 2 y Figura 6).

FIGURA 6
Genotipos con valores extremos de contenido de proteína



De acuerdo con Bressani, Mendez y Scrimshaw (17), la mayor parte de la literatura sobre el tema indica que los materiales de frijol presentan valores de proteína cruda en base seca que oscilan entre un 16% y 30%. Otros autores señalan que las variedades de *Phaseolus vulgaris*, más consumidas en Latinoamérica, tienen un contenido de proteína promedio del 20%, con un intervalo de variación del 19.3% al 35.2% (18), valores dentro de los cuales se ubicaron todos los materiales de *Phaseolus vulgaris* aquí evaluados.

La variedad Blanco Tlaxcala (*P. coccineus*), presentó un valor estadísticamente inferior (18.4%) a todos los demás genotipos estudiados, hecho que puede estar relacionado con el mayor tamaño del grano.

Los genotipos con mayor contenido de proteína fueron: G 2333, Negro Lolotla, REN 27, J 117, G 19428, Garbancillo Zarco y Amarillo de Calpan; mientras que los menores contenidos correspondieron a los genotipos Blanco Tlaxcala (*P. coccineus*), Ojo de Cabra Santa Rita, Chihuahua 86, G 13746, Pinto Villa, Negro 8025 y TLP 20 (Figura 6). Como puede observarse, el contenido de proteína no mostró relación con el color de grano.

Digestibilidad *in vitro* de la proteína

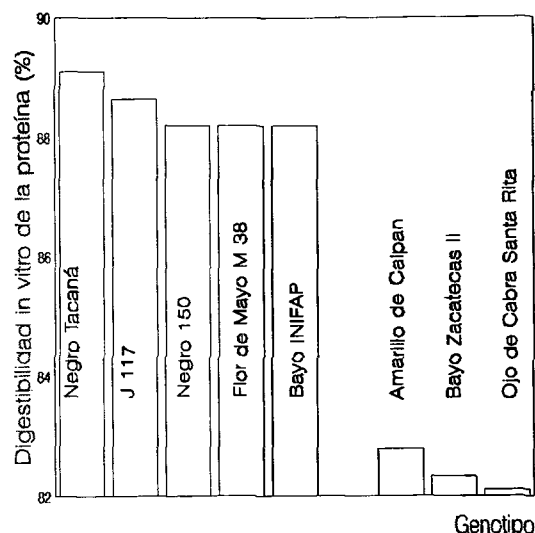
La digestibilidad *in vitro* de la proteína del frijol cocido en los genotipos estudiados se ubicó en el intervalo de 82.1% a 89.1%, con un coeficiente de variación para los materiales de *P. vulgaris* del 2.1%, lo que indica que la digestibilidad en los diversos genotipos de frijol es similar, incluyendo a la variedad Blanco Tlaxcala, que presentó un valor de digestibilidad cercana al valor promedio obtenido para los genotipos de *P. vulgaris* (Tabla 2). Estos valores fueron ligeramente menores a los detectados por Jacinto y Campos (19) al evaluar esta característica en siete variedades y una línea de diversos tipos de frijol común cocido, quienes además indicaron que la digestibilidad *in vitro* de la proteína fue más alta en el frijol cocido (84.1% al 93.2%) que en el frijol crudo (76.0% a 82.2%).

Se sabe que con la cocción la digestibilidad de la proteína del frijol aumenta, probablemente como resultado del incremento en la biodisponibilidad de los aminoácidos que forman la proteína. Adicionalmente, la acción térmica reduce considerablemente la actividad de algunos factores antinutricionales del grano de frijol, como el inhibidor de tripsina y las lectinas o fitohemaglutininas (20,21).

Dentro de los genotipos con mayor digestibilidad se encontraron Negro Tacaná, J 117, Negro 150, Flor de Mayo M 38 y Bayo INIFAP con valores superiores al 88%, mientras que los genotipos con menor digestibilidad fueron Ojo de Cabra Santa Rita y Bayo Zacatecas II, y Amarillo de Calpan con valores inferiores al 83% (Figura 7).

FIGURA 7

Genotipos con valores extremos de digestibilidad *in vitro* de la proteína en frijol cocido



El 90% de los genotipos estudiados presentaron niveles de digestibilidad *in vitro* de la proteína entre el 83.0% al 86.9%, intervalo muy estrecho, en comparación con la variabilidad observada en otras características. La variedad Blanco Tlaxcala (*P. coccineus*), presentó un valor de digestibilidad del 86.2%, comparable con los niveles observados en el grueso de la población estudiada.

Debido a la escasa variación observada en este parámetro, es difícil suponer la posibilidad del mejoramiento hacia la obtención de genotipos con proteína de mayor digestibilidad. La baja variación observada puede ser además resultado del efecto causado por la cocción, al reducir o desactivar algunos factores antinutricionales presentes en el frijol crudo. No se descarta sin embargo, la posibilidad de la existencia de diferencias en el valor nutricional de los genotipos de frijol estudiados, en cuanto a la presencia y disponibilidad de aminoácidos particulares u otros factores antinutricionales no cuantificados en el presente trabajo.

Actividad del inhibidor de tripsina

La actividad de inhibidor de tripsina en el grano cocido de los 49 genotipos de *P. vulgaris* analizados se ubicó en el intervalo de 0.50 a 1.97 mg/g de muestra, con un coeficiente de variación intermedio (24.9%). Estos valores superan los reportados por Jacinto y Campos (19), quienes detectaron niveles de este factor antinutricional de 0.21 a 0.78 mg/g de muestra.

La variabilidad observada en este factor antinutricional indica la posibilidad de realizar mejoramiento hacia la obtención de variedades con baja actividad de inhibidor de tripsina resistente al efecto térmico originado por la cocción:

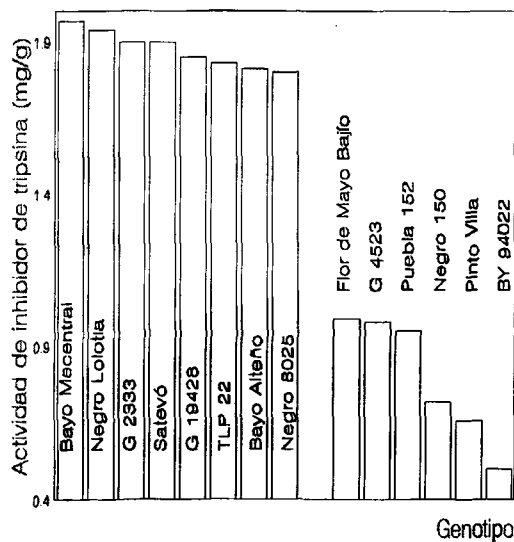
ya sea como resultado de una baja actividad de inhibidor inicial en el frijol crudo, o bien con una mayor susceptibilidad a la exposición al calor, durante el proceso de cocción del grano.

Sin embargo, la selección de estos materiales en grandes poblaciones, mediante el procedimiento utilizado en la presente investigación resultaría costoso, por lo que se sugiere utilizar este parámetro como criterio de selección de progenitores o bien en las últimas etapas de selección en generaciones avanzadas.

Los genotipos que destacaron por presentar los menores niveles de actividad del inhibidor de tripsina fueron BY 94022, Pinto Villa y Negro 150, con valores menores a los 0.75 mg/g; mientras que Bayo Mecertral, Negro Lolotla, G 2333 y Satevó presentaron los niveles más altos para este factor antinutricional (mayores o iguales a 1.90 mg/g), según se observa en la Figura 8.

FIGURA 8

Genotipos con valores extremos de actividad de inhibidor de tripsina en frijol cocido



La variedad Blanco Tlaxcala de *P. coccineus* presentó una actividad de inhibidor de tripsina cercana a la media de los genotipos de *P. vulgaris*.

Correlaciones entre características

El peso de 100 granos mostró una alta correlación positiva estadísticamente significativa con el volumen de 100 granos ($r= 0.99^{**}$), ya que ambos parámetros se encuentran relacionados con el tamaño de grano. En el caso de selección por tamaño del grano, cualquiera de esas dos características puede ser utilizada, puesto que ambas son fáciles de determinar.

El tiempo de cocción presentó una alta correlación

negativa estadísticamente significativa con la capacidad de absorción de agua ($r= -0.78^{**}$); esto indica que conforme el grano absorbe más agua durante el remojo previo a la cocción por un período de 18 h, el tiempo de cocción disminuye, tal como ha sido señalado por Castellanos y Guzmán-Maldonado (15) y Castellanos, Guzmán-Maldonado, González de Mejía y Acosta-Gallegos (13).

Otros autores han indicado que el porcentaje de testa es determinante en el tiempo de cocción del frijol y otras leguminosas (21-23); sin embargo la correlación observada entre estos dos factores fue baja ($r= 0.28$), de manera que la variación en los tiempos de cocción, depende en gran proporción de las diferencias en la capacidad de imbibición de las variedades de frijol, y no de otros componentes estructurales del grano, como es el porcentaje de testa, característica que podría estar más relacionada con la acción como una cubierta protectora a la invasión de patógenos y desde el punto de vista sensorial, con la textura del frijol cocido.

La capacidad de absorción de agua durante el remojo se puede utilizar en el proceso de selección para eliminar en generaciones tempranas aquellas líneas que absorben menor cantidad de agua. La capacidad de absorción de agua permite evaluar el grado de permeabilidad al agua del grano de frijol durante el remojo y detectar el fenómeno de testa dura, relacionado con tiempos de cocción prolongados (15).

Dado que la calidad del grano de frijol se ve influenciada, además del efecto genético, por un gran número de factores ambientales, como el tipo de suelo, región agroecológica de siembra, factores climáticos, manejo del cultivo, etc.; la calidad de esta leguminosa no sólo es reflejo de la información genética contenida dentro de un genotipo determinado, sino de la combinación de todo un conjunto de factores que deben tomarse en cuenta para la obtención de genotipos que satisfagan las necesidades de comercialización y del consumidor final.

CONCLUSIONES

La variedad Blanco Tlaxcala (*P. coccineus*) presentó el mayor tamaño de grano y más bajo contenido de proteína, valores característicos de esta especie, y diferentes a los de los genotipos de *P. vulgaris*.

La capacidad de absorción de agua y tiempo de cocción de la mayoría de los genotipos estudiados fueron adecuados (más del 90 % de agua absorbida y menos de 110 min). Lo anterior en parte asegura el progreso en este aspecto en el Programa de Mejoramiento Genético del Frijol.

Para incorporar caracteres de calidad, los genotipos Redlands Pioneer e ICA Zerinzta pueden utilizarse como fuente de rápida cocción; Perry Marrow, Kaboon e ICA Zerinzta pueden aprovecharse en la obtención de variedades

con bajo contenido de testa; mientras que desde el punto de vista nutricional: G 2333, Negro Lolotla, REN 27 y J 117 pueden emplearse como fuentes de genes para elevar el contenido de proteína y BY 94022, Pinto Villa y Negro 150 como fuentes de baja actividad de inhibidor de tripsina.

REFERENCIAS

1. Navarro SFJ. Marco de referencia del área. En: Frijol en el Noroeste de México (Tecnología de producción). Lépiz I.R. y S.F.J. Navarro (Eds). SARH, INIA, CIAPAN, CAEVAC. Comisión Permanente para la Investigación y Experimentación Agrícola en Sinaloa. Primera Edición. Culiacán, Sinaloa. México. 1983;p:1-28.
2. INEGI. Abasto y comercialización de productos básicos. Frijol. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). Secretaría de Programación y Presupuesto. México. 1989;63 p.
3. Jacinto HC, JA Acosta-Gallegos y AJ Ortega. Caracterización del grano de variedades mejoradas de frijol en México. *Agric Tec Mex*. 1993;19(2):167-179.
4. Guzmán-Maldonado H, C Jacinto H y JZ Castellanos. Manual de métodos para determinar características de calidad en frijol Común (*Phaseolus vulgaris L.*). SAGAR, INIFAP, Campo Experimental del Bajío. México. 1995;77 p.
5. Elías LG, A García-Soto y R Bressani. Métodos para establecer la calidad tecnológica y nutricional del frijol *Phaseolus vulgaris*. Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá (INCAP). Guatemala, C.A. 1986;42 p.
6. Larry LW and WG Charles. Total protein nitrogen measure automated technicon BD/AAL. Method Presented at the 88th Annual Meeting of the AOAC. 1974;50 p.
7. Hsu HW, DL Vavak, LD Satterlee and GA Miller. A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J Food Sci*. 1977;42:1269.
8. Smith C, W Van Megen, L Twaalfhoven and C Hitchcock. The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuffs. *J Sci Food Agric*. 1980;31:341-350.
9. Cárdenas RF. Clasificación preliminar de los frijoles en México. SARH, INIFAP. Folleto Técnico No. 81. 1984;59 p.
10. Castellanos JZ y JA Acosta-Gallegos. Calidad de cocción y contenido de proteína de 154 genotipos de frijol provenientes del altiplano semiárido. *Agrociencia*. (Serie Fitociencia) 1992;3:55-64.
11. Egley GH. Water-impermeable seed coverings as barriers to germination. In: Taylorson, R.B. (ed). Recent advances in the development and germination of seeds. Plenum Press. Series A: Life Sciences. Vol. 187. New York, USA. 1989;207-223.
12. Castellanos JZ, SH Guzmán-Maldonado, JA Acosta-Gallegos and JD Kelly. Effects of hardshell character on cooking time of common beans grown in the semiarid highlands of Mexico. *J Sci Food Agric*. 1995;69:437-443.
13. Castellanos JZ, SH Guzmán-Maldonado, E González de Mejía y JA Acosta-Gallegos. Efecto de la localidad de siembra sobre la aceptación sensorial y otras características nutricionales y de calidad del grano en frijol común. *Arch Latinoamer Nutr* 1995;45(1):50-55.
14. Pastor-Corrales MA. Estandarización de variedades diferenciales y de designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Abstracts) *Phytopatology* 1991;81:694.
15. Castellanos JZ y SH Guzmán-Maldonado. Effect of hard shell in cooking time of common beans in the semiarid highlands of Mexico. *Ann Rep Bean Improv Coop*. 1994;37:103-105.
16. Castellanos ZJ, MH Guzmán, A Jiménez, C Mejía, RJJ Muñoz, JA Acosta-Gallegos, G Hoyos, SE López, ED González, PR Salinas, AJ González, VJA. Muñoz, HP Fernández y B Cáceres. Hábitos preferenciales de los consumidores de frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) en México. *Arch Latinoamer Nutr* 1997;47(2):163-167.
17. Bressani R, J Méndez y NW Scrimshaw. Valor nutritivo de los frijoles centroamericanos III. *Arch Venez Nutr* 1960;10:71-84.
18. Nabhan GP, CW Weber and JW Berry. Variation in composition of Hopi Indian beans. *Ecology of Food and Nutrition* 1985;16:135-152.
19. Jacinto HC, EA Campos. Efecto de la cocción sobre algunas características nutricionales del frijol. *Agronomía Mesoamericana*. 1993;4:42-47.
20. Tobin G and KJ Carpenter. The nutritional value of the dry bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *Nutr Abstracts and Rev*. 1978;48:920.
21. Krista C, Shellie-Dessert and FA Bliss. Genetic improvement of food quality factors. In: Common Beans: Research for Crop Improvement. Van Schoonhoven, A. and O. Voyest (eds.) CAB International in association with CIAT, U.K. p.1994: 649-678.
22. Singh KB, PC Williams and H Nakkoul. Influence of growing season, location and planting time on some quality parameters of Kabuli Chickpea. *J Sci Food Agric*. 1990;53:429-441.
23. Jacinto HC y HP Fernández. Efecto de las heladas sobre factores nutrimentales y de calidad de frijol. *Rev Fitotec Mex*. 1993;16:91-101.

Recibido: 06-04-2001

Aceptado: 01-03-2002

Estabilidad de antocianinas en jugos pasteurizados de mora (*Rubus glaucus* Benth)

Mario José Moreno-Alvarez, Alfredo Vilorio Matos, Eliezer López, Douglas Belén C.

Laboratorio de Biomoléculas. Ingeniería de Alimentos, Universidad Simón Rodríguez- Estado Carabobo, Venezuela

RESUMEN. En esta investigación se evalúa la estabilidad química de antocianinas totales mediante la determinación de los espectros de absorción en el rango visible (400-580 nm) en tres jugos pasteurizados en presencia de diferentes proporciones de ácido ascórbico (Formulación A: 0,1%, Formulación B: 0,05% y Formulación C: 0,01%), elaborados a partir de 12% de pulpa de mora (*Rubus glaucus* Benth). Los parámetros fisicoquímicos analizados fueron: acidez titulable, sólidos solubles (°Brix) y pH. Se realizaron recuentos de hongos, levaduras, organismos aeróbicos mesófilos, coliformes totales (NMP/mL) y presencia de *Escherichia coli*. Los parámetros sensoriales (color, olor, sabor) se investigaron mediante escala hedónica a través de un panel no entrenado (Fridman, $P < 0,05$). Las evaluaciones se efectuaron durante un período de almacenamiento de 9 días. El contenido de antocianinas totales expresado como g de pelargonidina-3-glicosido/L no varió significativamente en ninguno de los tratamientos ($P > 0,05$). No se determinó desplazamiento bacterocrómico asociado a efectos oxidativos. Los valores de pH (3,4), acidez titulable (6,0 - 7,2 mL NaOH 0,079 N) y sólidos solubles (9,0 - 9,8 °Brix) no presentaron diferencias significativas durante las evaluaciones ($P > 0,05$). Los parámetros microbiológicos evaluados presentaron valores mínimos establecidos para productos pasteurizados (Hongos UFC/mL < 10 , Levaduras UFC/mL < 10 , NMP/mL coliformes UFC/mL < 10 y organismos mesófilos UFC/mL entre 120-140 para el primer día de pasteurización). No se detectaron diferencias significativas en las evaluaciones sensoriales (Fridman, $P > 0,05$).

Palabras clave: *Rubus glaucus*, pelargonidina-3-glucósido, pasteurización, estabilidad, antocianinas, mora.

SUMMARY. Stability of anthocyanins in pasteurized juice of blackberry (*Rubus glaucus* Benth). In this research the chemical stability of total anthocyanins in three pasteurized juices elaborated from 12% of blackberry (*Rubus glaucus* Benth) pulp, and addition of ascorbic acid (Formulation A: 0.1%, Formulation B: 0.05% and Formulation C: 0.01%), was evaluated by means of absorption visible spectra (400-580 nm). Physico-chemical characterization (acidity, soluble solids content in °Brix, pH), and count of mesophilic microorganism, fungi, yeasts, fecal coliforms (PMN/mL) and *Escherichia coli*, were evaluated. Sensorial parameters (color, smell, flavor) were investigated by means of un-trained panel using a hedonic scale (Fridman, $P < 0.05$). The study was performed during storage for 9 days. The total anthocyanins were reported as pelargonidin-3-glycoside g/L, and no significant differences were founded among the evaluated in each formulation during storage ($P > 0.05$). Bacterochromic effect due to oxidation as not observed. Acidity (6.0 - 7.2 mL NaOH 0.079 N), soluble solids content (9.0 - 9.8 °Brix) and pH (3.4) did not show significant differences ($P > 0.05$). The microbiological evaluation showed minimum values for pasteurized products (fungi CFU/mL < 10 , yeast CFU/mL < 10 , fecal coliforms CFU/mL < 10 and mesophilic microorganism CFU/mL between 120-140 on first day in storage). Sensorial analysis did not show significant differences (Fridman, $P > 0.05$).

Key word: *Rubus glaucus*, pelargonidin-3-glycoside, pasteurization, stability, anthocyanins, blackberry.

INTRODUCCION

Estudios epidemiológicos efectuados en varios países evidencian que el consumo de frutos y vegetales reducen enfermedades coronarias además de minimizar los riesgos de cáncer (1,2). Se ha descrito que algunos compuestos fenólicos de origen vegetal presentan dentro de la célula actividad antioxidante, reduciendo la concentración de radicales libres, y en algunos casos logran establecer grupos de quelación con iones metálicos (1-3). Los mecanismos involucrados de los agentes antioxidantes establecen donación de electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres. Los agentes antioxidantes presentes en alimentos pueden

reducir trombosis, activar macrófagos e inhibir la tendencia a la peroxidación (1). Entre los compuestos que han merecido dichos estudios se encuentran las antocianinas, debido a la presencia de sustituyentes -OH, los cuales son moléculas con poder antioxidante (5).

Las especies del género *Rubus* se han descrito como fuentes naturales de antocianinas, glucósidos de cianidinas y en algunos casos glucósidos de pelargonidina (6). La mayor concentración de los pigmentos se encuentran en los frutos, los cuales se comercializan para el consumo directo. En Venezuela se utilizan para la confección de mermeladas, la elaboración de licores o jugos en expendios comerciales en forma netamente artesanal (7). Debido a inadecuados manejos

postcosecha los frutos sufren deterioro acelerado minimizando los márgenes de comercialización.

Esta investigación tiene como objetivo central la formulación de tres jugos pasteurizados a partir de frutos de mora (*Rubus glaucus* Benth) condicionados en diferentes proporciones con ácido ascórbico. Se evaluaron algunos parámetros físico-químicos y microbiológicos que pueden estar asociados a eventos degradativos de las antocianinas. Debido a que en el mercado nacional no existen productos con estas características, esta investigación permitió evaluar la factibilidad técnica de la confección de un nuevo producto con potencial antioxidante natural y la utilización de un rubro marginal en el país.

MATERIALES Y METODOS

Selección de los frutos

Frutos de mora (*Rubus glaucus* Benth), con un peso promedio $6,56 \pm 1,62$ g fueron cosechados (Abril 2001) en la Colonia Tovar (500 msnm), el transporte se efectuó en cajas de cartón acondicionadas para tal fin. Los criterios de selección fueron: grado de madurez adecuado para consumo, color rojo homogéneo y sin daño físico aparente. El peso del lote fue de 8 kg. Se procesaron 24 h después de ser cosechados y mantenidos bajo refrigeración constante a $7,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Se sometieron a lavado con agua corriente seguido de un proceso de escaldado a una temperatura de $75 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 2 min. La pulpa fue extraída mediante equipo de extractor de jugo (EASTEM ELECTRICÒ, Modelo JX5000) para obtener un producto parcialmente libre de semillas.

Caracterización fisicoquímica de la pulpa

La acidez titulable se determinó mediante metodología AOAC (8). Los sólidos solubles se expresaron como °Brix y se evaluaron mediante refractómetro Baush & Lomb modelo ABBE-3L. El pH se determinó mediante potenciómetro HANNA Instruments, modelo pHep® 1. Todos los parámetros evaluados se analizaron por triplicado.

Evaluación del contenido de antocianinas totales en pulpa de mora (*Rubus glaucus* Benth)

Para determinar el contenido de antocianinas totales se peso 1 g de pulpa y se extrajo en 100 mL de MeOH acidificado con HCL al 1% v/v por triplicado. Los extractos se filtraron al vacío en embudos de porcelana (PYREX® USA, No. 36060, 15 mL, ASTM 10-15M) en completa oscuridad. El filtrado obtenido se enrasó a un volumen final de 100 mL en un balón aforado. Se midió la absorbancia en el espectro visible (400-580 nm) mediante spectronic 21 (Baush & Lomb). El contenido de antocianinas totales se determinó a 520 nm según procedimiento descrito por Díaz et al (9), expresados como g de pelargonidina-3-glucósido ($E^{1\text{cm}} 1\%$:

$31.600 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ y $\text{PM}: 433,2 \text{ g mol}^{-1}$) / kg de pulpa. Con la finalidad de investigar la presencia de compuestos antocianínicos con grupos hidróxilos en posición orto en el anillo B, se determinaron los espectros de absorción en presencia de AlCl_3 a muestras de los extractos.

Formulaciones de los jugos

Se elaboraron tres formulaciones de jugos de mora (*Rubus glaucus* Benth), adicionándoles diferentes proporciones de ácido ascórbico: 0,1% (A); 0,05% (B) y 0,01% (C). El contenido de pulpa fue de 12% p/v para cada tratamiento. La cantidad de sacarosa comercial añadida fue de 420 g para un volumen final de 4,2 L.

Proceso de pasteurización

Las diferentes formulaciones se pasteurizaron mediante equipo piloto Marca DOVER, Modelo TDB/7-20 de 18 L de capacidad a una temperatura de $60,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ durante 30 min. Las muestras se envasaron en recipientes de vidrio con capacidad de 250 mL previamente esterilizados y tapados herméticamente. Se codificaron y mantuvieron en refrigeración durante 9 días a una temperatura de $7,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Evaluaciones fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales a los jugos pasteurizados.

Las muestras se evaluaron después del proceso de pasteurización y consecutivamente al tercer y noveno día. La acidez titulable se determinó mediante metodología AOAC (8). Los sólidos solubles se expresaron como °Brix y se evaluaron en un refractómetro Baush & Lomb modelo ABBE-3L. El pH se determinó en un potenciómetro HANNA instruments, modelo pHep® 1.

Se realizaron recuentos de hongos, levaduras y organismos aeróbicos mesófilos según procedimiento descritos por COVENIN (10,11). Coliformes totales (NMP/mL) e investigación de presencia de *Escherichia coli* (12).

La evaluación sensorial se efectuó siguiendo la escala hedónica propuesta por el CIEPE (13). El número de panelistas no entrenado fue de cuarenta. Los atributos evaluados fueron: color, sabor y olor.

Evaluación del contenido de antocianinas totales en el jugo pasteurizado

Muestras de jugo de un volumen de 4 mL se concentraron mediante rota evaporador marca HEIDOLPH modelo VV2011 a presión reducida hasta la sequedad en total oscuridad a una temperatura de $40,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Se resuspendió en 20 mL de MeOH acidificado con HCL al 1% v/v. Se tomó 4 mL y se diluyó con 8 mL del mismo solvente. Este procedimiento se efectuó por triplicado. El contenido de antocianinas se determinó por el método propuesto por Díaz et al (9). Con la finalidad de detectar efecto degradativo

asociado a la oxidación se determinaron espectros de absorción en el rango visible (400-580 nm). Este procedimiento se efectuó paralelamente a las evaluaciones fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales.

Análisis estadísticos

Los resultados de cada uno de los tratamientos se evaluaron mediante análisis de varianza ($P < 0,05$), utilizando el paquete estadístico SAS (14). El análisis sensorial se evaluó mediante la prueba no paramétrica de Friedman ($P < 0,05$) (15).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la evaluación de la materia prima se presentan en la Tabla 1. Los valores de pH, sólidos soluble y acidez titulable son similares a los señalados por García-Viguera (16). Con relación al contenido de antocianinas totales en frutos de *Rubus glaucus* Benth, se encontró en 1,10 g pelargonidina-3-glucósido/ kg de pulpa. Al comparar estos valores con los señalados por Deighton et al (6) para 18 cultivares, se puede constatar que solo la especie *Rubus niveus* (1,186 g /kg de pulpa) presenta valores superiores que a los determinados en este estudio. En un estudio efectuado por Torre y Barriti (17), en los cuales analizaron 43 clones de *Rubus*, ninguna de las muestras presentaron valores superiores a los determinados para frutos de *R. glaucus* de origen venezolano, lo cual permite inferir que estos frutos presentan una importante capacidad antioxidativa.

TABLA 1
Caracterización de la materia prima

pH	Sólidos solubles*	Acidez titulable*	Antocianinas totales #
3,1	7,5	13,05	1,10

* expresados como°Brix

* mL de NaOH 0.076 N

g pelargonidina-3-glicósido/kg de pulpa

En la Figura 1 se representan el espectro de absorción visible del extracto metanólico de pulpa antes del proceso de pasteurización en MeOH + HCl al 1%. Se determinó un valor máximo de absorbancia a 520 nm (Tabla 3). Valor establecido con anterioridad por otros autores que sitúan las absorbancia máximas en un rango de 510 a 540 nm, característicos de estructuras antocianicas (9, 17- 20).

Según datos establecidos por Harborne (21), la relación entre la absorbancia a 440 nm y la absorbancia máxima logra establecer algunos índices que permiten la identificación de antocianinas. Según este criterio la pelargonidina presenta un pico máximos a 520 nm y un coeficiente de 39, ambos

valores muy semejantes a los determinados en esta investigación (520 nm y 35 respectivamente). El espectro de absorción obtenido, determinó la inexistencia de desplazamiento bacterocrómico (Tabla 2). Estos resultados permiten inferir la ausencia de cianidina, que en algunas especie de *Rubus* se ha descrito como mayoritaria (6), ya que esta estructura presenta grupos -OH en posición orto y se caracteriza por presentar desplazamiento bacterocrómico. Estos resultados permitieron expresar el contenido de antocianinas totales en función de la pelargonidina-3-glucósido.

FIGURA 1

Espectro de absorción del extracto de pulpa antes del proceso de pasteurización en MeOH+ HCl al 1%

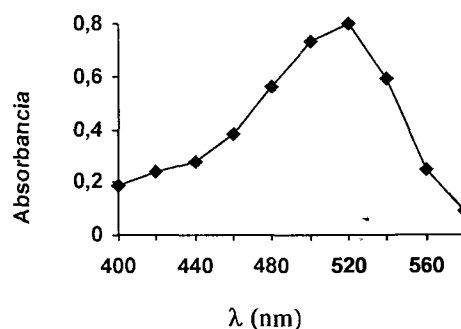


TABLA 2
Características espectrales de los pigmentos antocianos del fruto *Rubus glaucus* Benth

λ máxima	DO ₄₄₀ / DO _{máxima} X 100	AlCl ₃ *
520	35	0

0 indica que no hubo desplazamiento bacterocrómico

En las Figuras 2, 3 y 4 se representan los espectros de absorción de los jugos pasteurizados para las tres formulaciones. La tendencia generalizada es una alta estabilidad química de las antocianinas presentes, ya que no se encontró ningún desplazamiento bacterocrómico por efectos oxidativos o deterioro asociado a la pasteurización y/o almacenamiento. Todos los gráficos presentaron máximas absorbancia a 520 nm, valor similar al obtenido para la Figura 1 (sin pasteurizar).

En la Tabla 3 se presenta la concentración de antocianinas totales evaluadas en los diferentes tiempos. No se detectó diferencias significativas entre los tratamientos ($P > 0,05$), lo cual corrobora el hecho ya establecido que durante los 9 días de evaluaciones estos compuestos no presentaron degradación alguna ya que en los diferentes tratamientos la concentración no experimenta descenso.

FIGURA 2

Espectro de absorción del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus* Benth (0,1% de ácido ascórbico)

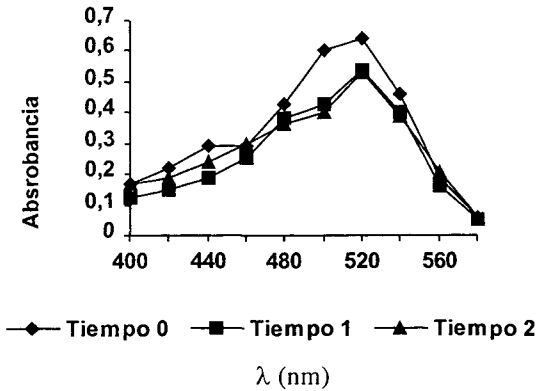


FIGURA 3

Espectro de absorción del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus* Benth (0,05% de ácido ascórbico).

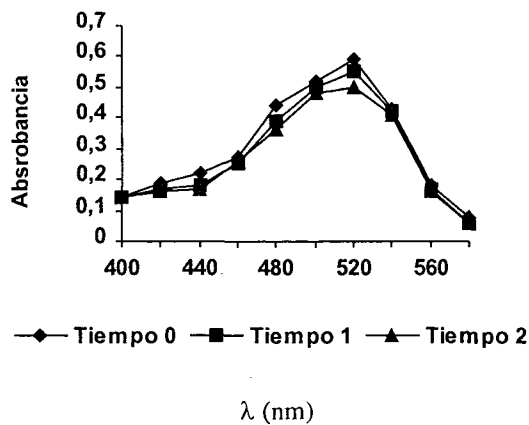


FIGURA 4

Espectro de absorción del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus* Benth (0,01% de ácido ascórbico).

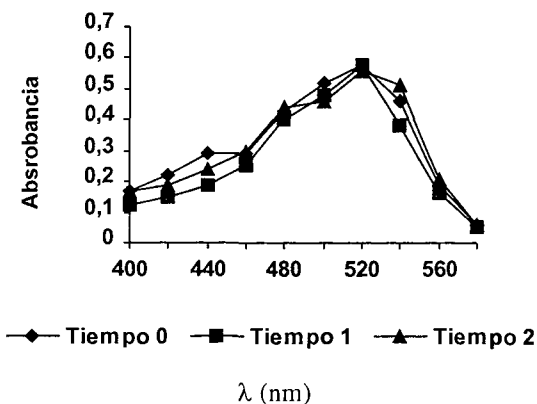


TABLA 3

Contenido de antocianinas totales * en jugos pasteurizados de *Rubus glaucus* Benth

Jugo	To	T1	T2
A	0,0041 ^a	0,0040 ^a	0,0039 ^a
B	0,0039 ^a	0,0038 ^a	0,0038 ^a
C	0,0040 ^a	0,0040 ^a	0,0038 ^a

Medias con diferentes letras en el super índice, dentro de una misma fila, indican diferencias significativas (P<0,05)

*g de pelargonidina-3-glicósido/L

En la Tabla 4 se representan los valores de pH, sólidos solubles y °Brix. La tendencia observada certifica que los productos pasteurizados no sufrieron cambios físico-químicos estadísticamente significativos (P>0,05).

TABLA 4

Evaluación de pH, sólidos solubles* y acidez titulable** de jugos pasteurizados de *Rubus glaucus* Benth

Jugo	pH			SS			AT		
	To	T1	T2	To	T1	T2	To	T1	T2
A	3,4 ^a	3,4 ^a	3,4 ^a	9,8 ^a	9,5 ^a	9,5 ^a	6,0 ^a	6,2 ^a	7,2 ^a
B	3,4 ^a	3,4 ^a	3,4 ^a	9,2 ^a	9,2 ^a	9,0 ^a	6,8 ^a	6,8 ^a	6,8 ^a
C	3,4 ^a	3,4 ^a	3,4 ^a	9,4 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a	6,2 ^a	6,5 ^a	6,0 ^a

pH: acidez ionica

SS: sólidos solubles (°Brix)

AT: acidez titulable (mL de NaOH 0,079 N)

Medias con diferentes letras en el super índice, dentro de una misma fila, indican diferencias significativas para un mismo parámetro (P<0,05).

Las evaluaciones microbiológicas de los productos pasteurizados se representan en las Tablas 5, 6 y 7. Los parámetros evaluados cumplieron con la Norma 1699 COVENIN (22). La norma establece valores máximos de 200 UFC/mL para organismos mesófilos en el primer día de pasteurización. En todos los casos los valores estuvieron comprendidos entre 120-140 UFC/mL. El resto de los microorganismos presentaron valores óptimos, asegurando que el proceso de pasteurización fue eficiente.

Las evaluaciones sensoriales efectuadas con el panel no entrenado, indicaron que no existieron diferencias significativas entre las formulaciones para los atributos color, olor y sabor. Lo cual indica que las concentraciones de ácido ascórbico ensayadas no fueron discriminadas por los panelistas (Friedman, P>0,05).

TABLA 5
Evaluación microbiológica de la formulación "A" del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus*

Microorganismo	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2
Aerobios mesófilos UFC/mL	140	160	200
Hongos UFC/mL	<10	<10	<10
Levaduras UFC/mL	<10	<10	<10
NMP/mL coliformes	<3	<3	<3
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND

ND: valores no detectados

TABLA 6
Evaluación microbiológica de la formulación "B" del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus*

Microorganismo	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2
Aerobios mesófilos UFC/mL	140	150	230
Hongos UFC/mL	<10	<10	<10
Levaduras UFC/mL	<10	<10	<10
NMP/mL coliformes	<3	<3	<3
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND

ND: valores no detectados

TABLA 7
Evaluación microbiológica de la formulación "C" del jugo pasteurizado de *Rubus glaucus*

Microorganismo	Tiempo 0	Tiempo 1	Tiempo 2
Aerobios mesófilos UFC/mL	120	140	300
Hongos UFC/mL	<10	<10	<10
Levaduras UFC/mL	<10	<10	<10
NMP/mL coliformes	<3	<3	<3
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-

ND: valores no detectados

CONCLUSIONES

Los jugos elaborados a partir de pulpa de mora (*Rubus glaucus*) condicionados con ácido ascórbico como único preservativo presentaron una estabilidad química mínima de nueve días a una temperatura de 7°C. La concentración de antocianinas totales expresados como g de pelargonidina-3-glicosido/L se mantuvo constante. Las variables fisicoquímicas evaluadas indican que el producto no sufrió

modificaciones de pH, sólidos solubles y acidez titulable ($P > 0,05$) lo cual evidencia que el proceso de pasteurización fue eficiente (corroborado con los análisis microbiológicos, los cuales fueron óptimos). Se concluye que existe factibilidad técnica para elaborar en el ámbito industrial bebidas pasteurizadas utilizando como materia prima un cultivo de casi nula explotación industrial, el cual presenta valores altos de compuestos potencialmente antioxidante, los cuales serían beneficiosos para la población venezolana.

REFERENCIAS

1. Kinsella JE, Frankel E, German B, Kanner J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Tech.* 1993; 85-89.
2. Langley-Evans SC. Consumption of black tea elicits an increase in plasma antioxidant potential humans. *International J Food Sci Nutr.* 2000; 51:309-315.
3. Martínez-Valverde I, Periago M, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch Latinoamer Nutr.* 2000; 50: 5-17.
4. Parr A, Bolweel P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agric.* 2000; 80: 985-1012.
5. Rodríguez-Saona L, Giusti M, Wrolstad R. Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. *J Food Sci.* 1998; 63:458-465.
6. Deighton N, Brennan R, Davies H. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. *J Sci Food Agric.* 2000; 80:1307-1313.
7. Avilan L, Leal F, Bautista D. Manual de fruticultura. Caracas, Editorial América, 1989: 1123 p.
8. AOAC. Official Methods of Analysis. Ass. Agric. Chem. 15 th. Washington, D.C. 1990.
9. Díaz L, Ureta F, Ruiz M. Estudio sobre los pigmentos antocianínicos y otros compuestos fenólicos en vinos tintos. *Alimentos.* 1985; 10:13-18.
10. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1337. Método para el recuento de hongos y levaduras. 1978: 6 p.
11. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 902. Método para el recuento de microorganismos aeróbicos en placa de petri. 1978: 5 p.
12. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1104. Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli*. 1984: 21 p.
13. Fundación Centro de Investigación del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE). Evaluación Sensorial de los Alimentos. Serie Manuales No. 2, Segunda edición. CIEPE, San Felipe. 1984.
14. SAS. SAS User's Guide: Statistics. Cary, N.C.: SAS Institute. 1990.
15. De Campos H. Estadística Experimental Não-paramétrica. Universidad de Sao Paulo, Piracicaba. 1983: pp 234-249.

16. García-Viguera C, Zafrilla P, Artés F, Romero F. Colour and anthocyanin stability of red raspberry jam. *J Sci Food Agric.* 1998; 78: 65-573.
17. Torre L, Barritt B. Quantitative evaluation of *Rubus* fruit anthocyanin pigments. *J Food Sci.* 1977; 42:488-490.
18. Baublis A, Spomer A, Berber-Jiménez MD. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *J Food Sci.* 1994; 59:1219-1233.
19. Rommel A, Heatherbell DA, Wrolstad RE. Red raspberry juice and wine: effect of processing and storage on anthocyanin pigment composition, color and appearance. *J Food Sci.* 1990; 55:1011-1017.
20. Zulin, S, Bassa I.A, Gabriel S, Francis FJ. Anthocyanin pigments of sweet potatoes-*Ipomoea batatas*. *J Food Sci.* 1992; 57:755-757.
21. Harborne JB. Spectral methods of characterizing anthocyanins. *Biochem J.* 1958; 70:5-12.
22. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1699 Jugo de naranja pasteurizado. Requisitos. 1981:7 p.

Recibido: 20-06-2001

Aceptado: 21-11-2001

Efecto del escaldado y recubrimiento higroscópico sobre la calidad de zanahorias (*Daucus carota* var. *Chantenay*) pre-cortadas durante el almacenamiento

Edgar Uquiche Carrasco, Luis Cisneros-Zevallos

Universidad de La Frontera. Temuco, Chile., Texas A&M University. College Station, USA.

RESUMEN. Se estudió el efecto individual y combinado del escaldado a baja temperatura (solución 1% de ácido cítrico, 50°C por 30 segundos) y la humectación con solución de glicerol (3% p/p, 20 segundos), sobre la calidad de zanahorias frescas peladas y pre-cortadas. Se establecieron cuatro tratamientos: (T1) inmersión por 30 segundos en agua destilada (testigo); (T2) muestras escaldadas; (T3) muestras humectadas con glicerol; (T4) muestras escaldadas y humectadas con glicerol. Durante el almacenamiento de las muestras se evaluó el cambio en el contenido de pigmentos carotenoides, color, sólidos solubles y pérdida de peso. Los tratamientos no afectaron significativamente el cambio en los pigmentos carotenoides ($p>0,10$) y sólidos solubles ($p>0,05$); pero sí la pérdida de peso ($p<0,05$) y el color ($p<0,05$). Tratamientos que incluyeron muestras escaldadas (T2 y T4) indujeron menos cambios en la intensidad del color naranja en comparación a los tratamientos T1 y T3 ($p<0,05$).

Palabras clave: Zanahorias, escaldado, recubrimiento higroscópico, mínimo procesamiento, carotenoides, pigmentos, color.

SUMMARY. Effect of blanching and hygroscopic coating on quality of fresh-cut carrots (*Daucus carota* var. *chantenay*) during storage. The effect of blanching at low temperatures (solution 1% acid citric, 50°C for 30 seconds) and the application of glycerol as humectant (3% p/p, 20 seconds) to preserve the quality of fresh-cut carrots (*Daucus carota*) were studied as individual or combined treatments. Four treatments were evaluated: a control by dipping samples for 30 seconds in distilled water (T1); blanching (T2); glycerol application (T3); and blanching plus glycerol application (T4). Total carotenoids content, color, soluble solids and weight loss were monitored during storage. Results showed no differences between treatments in carotenoids content ($p>0,10$) and soluble solids ($p>0,05$). However, differences were observed between treatments in weight loss ($p<0,05$) and color change ($p<0,05$). Blanched samples (T2 and T4) showed small changes in orange color intensity compared to treatments T1 and T3 ($p<0,05$).

Key words: Carrots, blanching, hygroscopic coating, minimally processed, carotenoids, pigments, color.

INTRODUCCION

Hoy por razones de costo, labor e higiene, las empresas de alimentación prefieren comprar frutas y verduras ya pelados, y posiblemente también rebanados, picados o desmenuzados, esto es, mínimamente procesado. El procesamiento mínimo de frutas y verduras, busca mantener el producto fresco, sin pérdida de valor nutritivo, y con una vida útil suficiente para su comercialización. Estudios sobre procesamiento mínimo de zanahorias han sido extensamente informados (1-6). Zanahorias mínimamente procesadas constituyen un producto interesante dado su aporte en pigmentos carotenoides y en fibra dietética. Estudios epidemiológicos han asociado el alto consumo de carotenoides con la reducción en la incidencia de enfermedades cardiovasculares y del cáncer (7,8). El nivel de estos nutrimentos es, en contraste con otras defensas antioxidantes, determinado por su presencia en la dieta (9). Además de su alto contenido de carotenoides, las zanahorias son altas en fibra dietética (10). Si bien el consumo de

alimentos mínimamente procesados es recomendable, su estabilidad, sin embargo, es limitada. Así, el deterioro de zanahorias mínimamente procesadas se caracteriza por el cambio de color superficial que sufren como consecuencia de dos mecanismos: uno reversible, originado por la deshidratación parcial de la superficie y que resulta en una apariencia blanca (5), y otro irreversible debido a una respuesta fisiológica (formación de lignina, oxidación de carotenoides, etc.) que origina un cambio de color de naranja intenso a naranja pálido (1,6,11,12). Para controlar el cambio de color se han ensayado diferentes métodos, tales como inhibir la lignificación mediante el escaldado, y reducir la deshidratación superficial mediante la humectación con agentes higroscópicos (por ejemplo, glicerol, propilenglicol). Ambos métodos, tanto el escaldado como la humectación, fueron aplicados como operaciones aisladas. Para el caso del escaldado, éste tiene que aplicarse a bajas temperaturas y por tiempos muy cortos para evitar daños en la calidad y fisiología del producto, debido a que las células aún viven durante el almacenamiento. Stanley et al. (13), informaron

que el escaldado en medio ligeramente ácido ($\text{pH} < 4,5$) permite procesar zanahorias a más baja temperatura (60°C), protegiéndolas de la degradación térmica. Así, Bolin (2), encontró que el escaldado de zanahorias a 60°C y a $\text{pH} 1$ (HCl) inhibió la lignificación por 3 a 6 semanas. El tratamiento térmico también puede afectar el contenido de carotenoides en zanahorias dependiendo de las condiciones del tratamiento (14-16). El blanqueamiento debido a la deshidratación superficial podría disminuirse por incremento de la humedad relativa (HR) en el almacenamiento, y mediante la aplicación de humectantes en la superficie de zanahorias antes de almacenar (5,6). Agentes tales como propilenglicol, glicerol, sorbitol y manitol son solubles en agua (17), y tienen aplicación en alimentos como agentes humectantes dado que poseen grupos funcionales hidróxilo.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto individual y combinado de las operaciones de escaldado a baja temperatura en medio ligeramente ácido, y la humectación superficial con glicerol, sobre el blanqueamiento superficial de zanahorias peladas y pre-cortadas durante el almacenamiento.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron zanahorias (*Daucus carota var. Chantenay*) recién cosechadas, sanas y libres de enfermedades, provenientes de la cooperativa agrícola Huetutukan, Temuco (Chile). Para los tratamientos de escaldado y humectación se utilizaron los reactivos: glicerol (Merck Chemical, Alemania) y ácido cítrico. Para la cuantificación de carotenoides se utilizó N,N-dimetilformamida (DMF) (Merck Chemical, Alemania).

Preparación de tratamientos

Zanahorias seleccionadas y lavadas con agua potable, se pelaron manualmente y se cortaron en fracciones cilíndricas cada una con peso aproximado de 30 ± 5 gramos. Se utilizaron cuchillos afilados obteniendo superficies lisas. Posteriormente se lavaron con agua destilada, siendo cada fracción una unidad experimental. Las muestras se sometieron a cuatro tratamientos:

T1: inmersión por 20 segundos dentro de agua destilada (testigo);

T2: muestras escaldadas (50°C por 30 s en sol. 1% ácido cítrico);

T3: muestras humectadas con glicerol (20 s de inmersión en sol. 3% p/p);

T4: muestras escaldadas y humectadas con glicerol (combinación de tratamientos T2 y T3).

Las zanahorias se escaldaron (dos unidades cada vez) en 500 mL de solución ácido cítrico al 1% (p/p) a 50°C por 30

segundos, utilizando una estufa de baño Memmert (Alemania). Luego se enfriaron en agua destilada por 30 s, se dejaron drenar durante 5 minutos. Para la humectación se preparó una solución de glicerol al 3% (p/p) en agua destilada, obtenida por mezcla a 1000 rpm durante 10 minutos mediante un agitador Heidolph (Alemania). La humectación de las muestras de zanahoria se realizó por inmersión durante 20 segundos en la solución de glicerol y se dejaron drenar por 5 minutos. Las muestras se envasaron en bolsas de polipropileno (dos unidades por bolsa) de dimensiones 15 x 25 cm, y espesor 0,04 mm (micrómetro Mitutoyo, Japón). Después de sellar las bolsas se almacenaron bajo refrigeración en una cámara Verstfrost FKG 371 (Dinamarca) a $10 \pm 1^\circ\text{C}$, de $0,64\text{m}^3$ de capacidad. Durante el almacenamiento (19 días) se extrajeron, en intervalos de días, dos bolsas de cada tratamiento para evaluar el contenido de carotenoides, medición del color superficial (parámetros L^* , a^* , b^*), pérdida de peso y el cambio en los sólidos solubles.

Pigmentos carotenoides

Para la medición de los carotenoides (18,19), una muestra aproximada de 0,25 g de zanahoria se colocó en un frasco (5 mL de volumen total) de vidrio opaco (para evitar la luz UV) y se adicionó 3 mL de disolvente N,N-dimetilformamida (DMF) para la extracción de los pigmentos, luego se cerró herméticamente y se mantuvo en refrigeración ($\pm 5^\circ\text{C}$) por 14 horas. Se determinó el contenido de pigmentos en el disolvente sobrenadante mediante un espectrofotómetro Hewlett Packard UV 8452A (USA). La concentración de pigmentos en la fase del disolvente (c) se calculó mediante la ecuación: $c = 0,25 \cdot (A_{450} - A_{750})$ (nmol/mL); donde: A_{450} y A_{750} son las absorbancias a 450 nm y 750 nm, respectivamente, del disolvente sobrenadante conteniendo los pigmentos extraídos. La concentración de pigmentos se calculó en la muestra (C), se calculó de acuerdo a: $C = (c \cdot V) / g$ (nmol/g); siendo V: volumen de solución de extracción (mL); g: gramos de muestra en base seca. El contenido de humedad se determinó en forma gravimétrica por secado hasta peso constante en una estufa a 105°C (20). La medición de pigmentos fue realizada en cuatro muestras y por duplicado para cada tratamiento. Los valores informados son el promedio de las ocho mediciones.

Evaluación del color

El color se midió mediante un colorímetro CR200 (Minolta Camera Co., Japón) calibrado con un estándar ($L^*=70,1$, $a^*=18,23$, $b^*=32,02$). De acuerdo a la escala de color CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) se determinaron los valores L^* , a^* , b^* . La medición se realizó en seis muestras y por duplicado (sobre superficies opuestas a la muestra) para cada tratamiento. Los resultados se expresaron como el promedio de doce valores IB (Índice de

blanqueamiento) (1,6): $IB = 100 - ((100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$; y también como cambios en los índices cromáticos y ángulo Hue (21): $croma = (a^2 + b^2)^{0.5}$; $\text{ángulo Hue} = \arctan b/a$.

Pérdida de peso y sólidos solubles

Seis muestras de cada tratamiento se pesaron durante el almacenamiento en una balanza analítica $\pm 0,001$ g de precisión (Hanau, Alemania). Se calculó la razón de pérdida de peso respecto al peso inicial de las muestras, informándose los resultados como el promedio de las seis mediciones. El porcentaje de sólidos solubles (SS) fue determinado en cuatro muestras por tratamiento, efectuando lecturas por duplicado (20°C) de el jugo extraído por presión manual y filtrado, de cada muestra. Se utilizó un refractómetro ABBE Mark II modelo 10481 (Leica Inc., N.Y.). Los valores de SS se informaron como el promedio de las ocho lecturas.

Análisis estadístico

Los resultados para las determinaciones del contenido de pigmentos carotenoides, color, pérdida de peso y sólidos solubles, se analizaron estadísticamente para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos. Se aplicó análisis de varianza (ANVA) a los residuos del ajuste por regresión lineal de las mediciones efectuadas durante el almacenamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Color superficial de las zanahorias

El cambio de color medido se expresó mediante los índices IB, ángulo Hue y cromáticos. Un ángulo Hue de 0° representa un rojo puro, mientras que un ángulo Hue de 180° representa un verde puro. El valor cromático representa la intensidad del color. El índice IB se utiliza para evaluar el blanqueamiento superficial en zanahorias, puesto que correlaciona mejor con el desarrollo visual del blanqueamiento en comparación a los valores CIE (L^* , a^* , b^*) y los valores de cromáticos (1). Sin embargo, cuando el índice IB se encuentra entre valores de 31 y 37, generalmente no se ve formación blanca en la superficie de la zanahoria, pero sí un cambio de color de naranja intenso a naranja pálido (6).

En el presente trabajo no se observó formación blanquecina en la superficie de las zanahorias, obteniendo valores de IB en el rango de 32 a 38 (Figura 1). El cambio de color observado fue básicamente de un naranja intenso a naranja pálido, que coincidieron con una reducción en los valores de cromáticos al final del almacenamiento, para todos los tratamientos (Tabla 1). Sin embargo no hubo diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). Los valores de ángulo Hue no cambian significativamente durante el almacenamiento, encontrándose dentro de los límites de 54,1 a 56,5 (Tabla 1). En la Figura 1 se observa que al final del almacenamiento

los valores del índice IB más altos, que corresponden al naranja pálido, son mayores en el testigo (T1) y en las muestras humectadas con glicerol (T3).

FIGURA 1

Blanqueamiento superficial (índice IB) en las zanahorias durante el almacenamiento: (◆) T1, control; (□) T2, escaldadas; (▲) T3: humectadas; (○) T4: escaldadas y humectadas

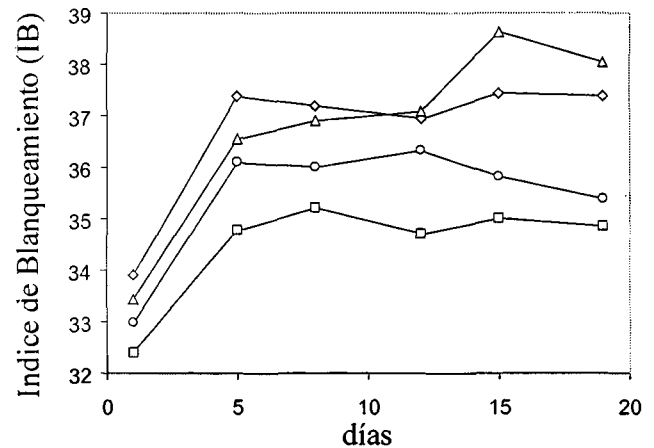


TABLA 1

Variaciones en el color durante el almacenamiento (días 1 y 19)

Tratamiento	cromáticos		ángulo Hue	
	1	19	1	19
T1: control	49,2a	47,4b	54,9c	55,1d
T2: escaldadas	53,1a	46,7b	55,2c	55,3d
T3: humectadas	53,1a	47,1b	56,5c	55,7d
T4: escald/humect.	51,0a	46,9b	54,1c	55,1d

Letras iguales en la misma fila indican ninguna diferencia significativa entre los tratamientos ($p=0,05$).

Según nuestros resultados, a pesar de la apariencia aún húmeda en las muestras no escaldadas, se produce un cambio en la intensidad del color naranja que podría estar asociado a los cambios fisiológicos como la formación de lignina y la oxidación de carotenoides. Los tratamientos que implicaron el escaldado de las muestras; es decir T2 y T4, experimentan menor cambio en el color naranja en comparación con el testigo y las muestras humectadas con glicerol (Figura 1). Por lo tanto, tratamientos de escaldado aparentemente permitirían disminuir la respuesta irreversible de cambio de color (como la formación de lignina y oxidación de carotenoides), mientras que tratamientos con humectantes o

sistemas higroscópicos solo ejercerían protección cuando el índice IB esta por encima de 37, pero no afectaría necesariamente la respuesta irreversible de cambio de color. La poca diferencia observada en el cambio de color puede deberse a las condiciones del experimento: alta humedad relativa en las bolsas y una superficie lisa producto de cortes con cuchillo de hoja afilada.

Para verificar si existen efectos de los tratamientos en la componente irreversible del cambio de color, se determinó el contenido de carotenoides en las zanahorias. También se determinó pérdida de peso entre tratamientos para observar su efecto en el cambio de color.

Pigmentos carotenoides

La variación en la concentración de carotenoides (nmol/g) durante el almacenamiento se presenta en la Tabla 2. El ANVA señala que no existe diferencia significativa entre los cuatro tratamientos ($p > 0,10$) tanto al inicio como al final del almacenaje. Según esto, el escaldado a baja temperatura y/o los recubrimientos higroscópicos no afectarían los niveles de carotenoides en zanahorias peladas y pre-cortadas durante el almacenamiento. Estos resultados indicarían que el cambio de color de naranja intenso a pálido observado durante almacenamiento no se debería a cambios en el contenido de carotenoides de las zanahorias enteras. Sin embargo, no se puede descartar que se puedan producir oxidación de los carotenoides en forma localizada al nivel de la superficie, lo cual podría explicar los cambios de color observados (Figura 1, Tabla 2).

TABLA 2
Variación de carotenoides (nmol/g) y sólidos solubles durante el almacenamiento (días 1 y 19)

Tratamiento	carotenoides*		sólidos solubles	
	1	19	1	19
T1: control	6,8a	7,2b	7,2c	6,4d
T2: escaldadas	7,8a	7,5b	5,9c	5,6d
T3: humectadas	7,5a	8,0b	6,6c	5,9d
T4: escald/humect.	8,6a	7,6b	7,1c	6,3d

Letras iguales en la misma fila indican ninguna diferencia significativa entre los tratamientos (* $p = 0,10$), ($p = 0,05$).

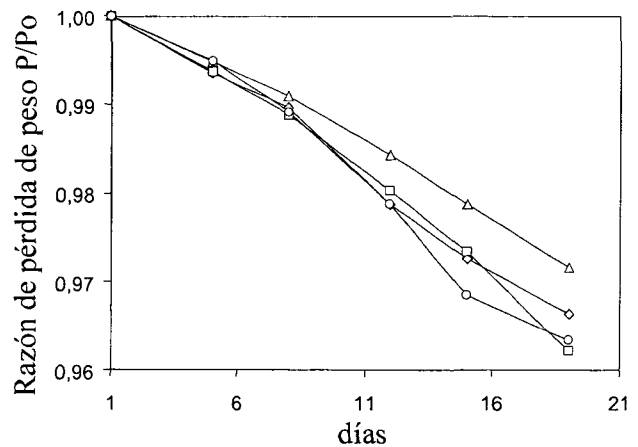
Pérdida de peso

La pérdida de peso (P/P_0) durante el almacenamiento se comparó entre los cuatro tratamientos (Figura 2), donde P_t es el peso en el tiempo t ; y P_0 es el peso inicial. La pérdida de peso en zanahorias humectadas con glicerol (T3) fue menor en comparación al resto de tratamientos ($p < 0,01$), lo que indica una mayor retención de humedad y menor deshidratación. Esta mayor retención de humedad sería al

nivel de la superficie debido a las propiedades higroscópicas del glicerol. Sin embargo, todos los tratamientos presentaban apariencia húmeda al final del estudio debido principalmente a las condiciones de humedad relativa altas al interior de las bolsas plásticas. La pérdida de peso de los tratamientos no explicaría los cambios de color observados anteriormente debido a que no hay formación blanca a causa de la deshidratación (Figura 1). Estos resultados refuerzan la idea que bajo las condiciones de estudio del presente trabajo, los cambios de color naranja observados son producto de las respuestas fisiológicas debido al corte o procesamiento. Si la pérdida de carotenoides no puede explicar los cambios de color, serían necesarios estudios enzimáticos relacionados a formación de lignina para establecer las relaciones con los cambios observados en el color naranja. Estudios sobre inactivación enzimática han demostrado que el escaldado inhibe enzimas asociadas a la lignificación (11).

FIGURA 2

Razón de pérdida de peso P_t/P_0 de las zanahorias durante el almacenamiento: (◆) T1, control; (□) T2, escaldadas; (▲) T3: humectadas; (○) T4: escaldadas y humectadas



Estabilidad y sólidos solubles

En el presente estudio, las zanahorias sometidas a escaldado sufrieron contaminación microbiana a los 12 días de almacenamiento, exhibiendo la formación de una superficie viscosa y blanda. Un primera explicación sería las pérdidas de compuestos fenólicos solubles durante el escaldado, la inhibición del proceso de lignificación, o la reducida acumulación de fenólicos que afectaría la estabilidad microbiológica de las muestras escaldadas. Matern y Kneusel (22), señalan que la acumulación de compuestos fenólicos (ácido caféico, clorogénico, ferúlico, cumárico, etc.) se relaciona con la formación de lignina, y la pérdida de fenólicos puede asociarse a la pérdida de autodefensas en los tejidos,

por lo que éstos serían más fácilmente contaminados por bacterias (23). Varios autores han señalado que zanahorias peladas y pre-cortadas pueden presentar contaminación, caracterizada por el incremento de exudaciones, pérdida de firmeza y desarrollo de malos olores (1,4,6).

Dependiendo de la severidad del tratamiento térmico, éste podría afectar los niveles de azúcares (por ejemplo, glucosa y fructosa) y fenoles totales solubles en muestras de zanahorias (14). Sin embargo en el presente estudio, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los cuatro tratamientos con relación a sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) durante el almacenamiento (Tabla 2). El escaldado utilizado no fue un tratamiento severo que incrementó o disminuyó los sólidos solubles, pero es posible que el tratamiento haya causado la muerte de las células superficiales creando un sustrato apropiado para el crecimiento microbiano. Esta sería una explicación alternativa para la contaminación observada en las muestras. Si a esto se añade la alta humedad relativa al interior de las bolsas y las fluctuaciones de temperatura en las cámaras, factores que podrían causar condensaciones dentro de las bolsas plásticas, se explicaría la limitada conservación del producto. Estos son puntos críticos que se recomienda estudiar pues la utilización de tratamientos mínimos de proceso debe garantizar la viabilidad de las células del tejido durante el almacenamiento.

CONCLUSIONES

Zanahorias peladas y pre-cortadas constituyen un producto interesante debido a su aporte en pigmentos carotenoides y fibra dietética, y si bien su consumo es recomendable, su estabilidad, sin embargo, es limitada. En este trabajo se demostró que las zanahorias escaldadas (T2) y, zanahorias escaldadas y humectadas (T4) mostraron un menor cambio en la intensidad de color superficial, de un naranja intenso a un naranja pálido, en comparación con el testigo (T1) y zanahorias tratadas sólo con humectantes (T3) ($p < 0,05$). No se observaron cambios de color por blanqueamiento superficial en ninguno de los tratamientos. Los resultados indicarían que el cambio en la intensidad de color naranja no está asociado a cambios en el contenido de carotenoides o a la pérdida de humedad. Es probable que el cambio en la intensidad del color naranja se deba a la actividad enzimática en la formación de lignina. Son necesarios estudios enzimáticos para aclarar este punto observado. No hubo diferencias entre tratamientos con relación a sólidos solubles ($p > 0,05$). La estabilidad microbiológica de las muestras escaldadas durante el almacenamiento podría estar relacionada a la viabilidad de las células superficiales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad de La Frontera (DIDUFRO) por el financiamiento al presente trabajo, a través del Proyecto IN 09/98.

REFERENCIAS

1. Bolin HR, Huxsoll CC. Control of minimally processed carrot (*Daucus carota*) surface discoloration caused by abrasion peeling. *J Food Sci.* 1991;56: 416-418.
2. Bolin HR. Retardation of surface lignification on fresh peeled carrots. *J Food Proc Pres.* 1992;16:99-103.
3. Babic I, Amiot C, Nguyen-the, Aubert S. Changes in phenolic content in fresh ready-to-use shredded carrots during storage. *J Food Sci.* 1993;58:351-356.
4. Howard LR, Griffin LE, Lee Y. Steam treatment of minimally processed carrot sticks to control surface discoloration. *J Food Sci.* 1994;59:356-358, 370.
5. Cisneros-Zevallos L, Saltveit ME, Krochta JM. Mechanism of surface white discoloration of peeled (minimally processed) carrots during storage. *J Food Sci.* 1995;60:320-333.
6. Cisneros-Zevallos L, Saltveit ME, Krochta JM. Hygroscopic coatings control surface white discoloration of peeled (minimally processed) carrots during storage. *J Food Sci.* 1997;62:363-366.
7. Micozzi MS, Beecher GR, Taylor PR, Khachik F. Carotenoid analyses of selected raw and cooked foods associated with a lower risk for cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82:282.
8. Jacobs MM. Diet, nutrition and cancer research: An overview. *Nutr Today.* May/Jun:19. 1993.
9. Antioxidantes vitamínicos en los alimentos. *Industria Alimenticia.* 1998; 9(1): 31,61.
10. Englyst HN, Cummings JH. Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *J Assoc Off Anal Chem.* 1988;71:808-814.
11. Howard LR, Griffin LE. Lignin formation and surface discoloration of minimally processed carrot sticks. *J Food Sci.* 1993;58:1065-1067, 1072.
12. Howard LR, Dewi T. Minimal processing and edible coating effects on composition and sensory quality of mini-peeled carrots. *J Food Sci.* 1996;61:643-645.
13. Stanley DW, Bourne MC, Stone AP, Wismer WV. Low temperature blanching effects on chemistry, firmness and structure of canned green beans and carrots. *J Food Sci.* 1995;60:327-333.
14. Howard LR, Braswell DD, Aselage J. Chemical composition and color of strained carrots as affected by processing. *J Food Sci.* 1996;61:327-330.
15. Paulus K, Saguy I. Effect of heat treatment on the quality of cooked carrots. *J Food Sci.* 1980;45:239-241.
16. Simon PW, Lindsay RC. Effects of processing upon objective and sensory variables of carrots. *J Amer Soc Hort Sci.* 1983;108:928-931.

17. Lindsay RC. Food additives. In: O. Fennema (Ed.). Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc. New York., 1986:658-660.
18. Moran R, Porath D. Chlorophyll determination in intact tissues using N,N-dimethylformamide. Plant Physiol. 1980;65:478-479.
19. Ihl M, Shene C, Scheuermann E, Bifani V. Correlation for pigment content through colour determination using tristimulus values in a green leafy vegetable, swiss chard. J Sci Food Agric. 1994;66:527-531.
20. The Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC. 13th Edition. Washington D.C. The Association, 1990.
21. McGuire R. Reporting of objective color measurements. HortScience 1992;27:1254-1255.
22. Matern U, Kneusel, RE. Phenolic compounds in plant disease resistance. Phytoparasitica. 1988;16:153.
23. Howard LR, Braswell D, Heymann H, Lee Y, Pike LM, Aselage J. Sensory attributes and instrumental analysis relationships for strained processed carrot flavor. J Food Sci. 1995;60:145-148.

Recibido:15-02-2001

Aceptado: 12-03-2002

Aminoácidos esenciales y no esenciales de harinas de cereales infantiles en distintas fases de procesamiento industrial y su relación con índices químicos de la calidad proteica

Darío Pérez Conesa, Gaspar Ros Berrueto, María Jesús Periago Castón

Facultad de Veterinaria-Universidad de Murcia. Campus de Espinardo. Murcia, España

RESUMEN. Se ha estudiado el efecto del procesamiento tecnológico sobre el contenido de aminoácidos esenciales y no esenciales en cereales infantiles, la adecuación de la proteína y de los aminoácidos esenciales a las recomendaciones dietéticas infantiles, así como su calidad proteica mediante el uso de índices químicos. Se evaluaron la harina cruda, harina tostada, film y papilla de cuatro tipos de cereales infantiles: "Multicereales" y "Trigo" (ambos con gluten), "Crecimiento" y "Arroz y zanahoria" (añambos sin gluten). El tratamiento tecnológico sólo afecta de forma significativa al contenido de los aminoácidos lisina, arginina ($P < 0,05$) y valina ($P < 0,01$) en "Arroz y zanahoria". La proteína de cualquiera de las papillas estudiadas cubre los requerimientos del niño hasta los 3 años edad en un 17,4%, mientras que los aminoácidos esenciales entre un 25 y un 200%. Como era previsible, el aminoácido limitante fue la lisina en todas las harinas. Los índices químicos sólo se vieron afectados por el tratamiento tecnológico en el cereal "Arroz y zanahoria", mostrando los cereales sin gluten valores superiores (36,7-69,5%) a los cereales con gluten (18,1%-30,7%) al final del tratamiento. Destacando la harina "Crecimiento", por su mayor contenido en lisina respecto a los otros cereales infantiles debido a los ingredientes mayoritarios arroz y maíz.

Palabras clave: Cereales infantiles, aminoácidos esenciales y no esenciales, digestibilidad in vitro de la proteína, índice químico, índice químico corregido mediante la digestibilidad de la proteína.

SUMMARY. Essential and non-essential amino acid content of infant cereals in different stages of industrial processing and its relationship with chemical scores of protein quality. The effect of technological process on essential and non essential amino acid contents in infant cereals, the protein and essential amino acids infant dietary requirements cover by infant cereals, and its quality using some chemical scores has been studied. Mix of raw flours, mix of roasted flours, mix of enzymatically, hydrolysed and drum dried flours and commercial infant cereals of four different types of infant cereals: "Multicereal" and "Wheat" (both with gluten), "Growth" and "Rice and carrot" (both gluten free) were evaluated. The technological process only show a significant effect on lysine, arginine ($P < 0,05$) and valine ($P < 0,01$) contents in "Rice and carrot" infant cereal. Protein of any studied infant cereals covers 17,4% of the daily infant requirements in, while for essential amino acids will cover about 25 to 200% until the third year of life. As we expected, the limitant amino acid was lysine in all flours. Chemical scores only were affected by technological treatment in "Rice and carrot" infant cereal, showing the gluten-free infant cereals higher values (36,7-69,5%) than gluten infant cereals (18,1%-30,7%) at the end of the processing. It should be standing out "Growth" infant cereal, because of it has a higher lysine content than other infant cereals due to the main ingredients rice and corn.

Key words: Infant cereals, essential and non-essential amino acids, in vitro protein digestibility, chemical score, protein digestibility-corrected amino acid scoring.

INTRODUCCION

La infancia constituye un periodo de vida con una gran demanda nutricional, pues el peso corporal del niño se duplica entre el 4° y el 6° mes de vida, y se triplica al finalizar el año (1). En esta etapa, los cereales son los alimentos habitualmente recomendados para iniciar la alimentación complementaria (2), suministrados de forma habitual como harinas, vehiculados generalmente en leche de vaca, fórmula, agua o caldo, y adicionados con algo de azúcar (3). Normalmente, los cereales de los preparados comerciales infantiles se hallan previamente tratados con objeto de facilitar su digestión y su dilución. Desde el punto de vista

nutricional, el contenido y la composición proteica de la harina de cereales son los principales determinantes de su calidad (4,5). Las cantidades de aminoácidos esenciales presentes en los cereales infantiles, tales como lisina (Lys), triptófano (Trp) y Treonina (Thr), son las que limitan el valor biológico de las proteínas de los cereales (6), así como su biodisponibilidad en el organismo (7). No sólo es importante la fuente proteica, sino también lo es el procesado y la interacción de estos aminoácidos con otros componentes de la dieta (8). En concreto, a las harinas de cereales infantiles se les somete a la acción del calor (obteniendo harinas dextrinadas), y otras a la acción de diversas enzimas (harinas malteadas). Como ejemplo del primero tenemos el tostado

(tratamiento por aire caliente estático), proceso que utiliza alta temperatura (>100°C) en un tiempo corto (1,5-2,5 min.), empleado para inactivar el crecimiento de microorganismos contaminantes (9), aunque también altera la naturaleza de muchos de los constituyentes, cambiando sus propiedades físico-químicas y nutricionales, tal y como es la biodisponibilidad de las proteínas, hidratos de carbono, lípidos y vitaminas. No existen referencias bibliográficas sobre el efecto del tratamiento enzimático en estas harinas, aunque es presumible que el efecto sea aún mayor que el tostado. Por todo esto, el objetivo del presente estudio ha sido conocer el efecto que ejerce el procesado tecnológico sobre la calidad nutricional de los aminoácidos de los cereales infantiles, sobre la calidad de la proteína evaluada mediante índices químicos, y finalmente estimar los requerimientos que realmente serían cubiertos por estos alimentos en el primer año de vida.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron cuatro tipos de cereales infantiles no lacteados, preparados experimentalmente por Hero España S.A. (Alcantarilla, España), y denominados “Multicereales” y “Trigo” (ambos con gluten de forma natural en su composición), y “Crecimiento” y “Arroz y zanahoria” (sin gluten). Para los primeros se recomienda su incorporación en alimentación infantil a partir del 4º mes de edad, y para los segundos, a partir del 6º mes. La Tabla 1 muestra los ingredientes utilizados para la fabricación de cada uno de ellos. La Figura 1 presenta el diagrama de fabricación, en el que se señalan las cuatro fases: mezcla de las harinas (harina cruda), tratamiento térmico de tostado (harina tostada), secado en rodillo (film) (éstas dos últimas a una temperatura superior a 100°C) y obtención del producto final (papilla) que fueron muestreadas para la realización del estudio. Las muestras fueron recogidas directamente en fábrica durante el proceso de elaboración de los cereales infantiles. Posteriormente fueron almacenados a temperatura ambiente, en recipientes de plástico herméticamente cerrados y aislados de la humedad exterior, listas de este modo para su posterior análisis de forma directa (sin adicionar leche a la fase de papilla comercial).

Métodos analíticos

El perfil de aminoácidos totales fue determinado mediante el analizador de aminoácidos LKB Alpha Plus (Pharmacia LKB Biochrom Ltd., Cambridge, Inglaterra) siguiendo la técnica descrita por Moore y Stein (10) tras una hidrólisis con HCl 6N a 110°C durante 24 horas en tubos sellados al vacío. Una solución standard de aminoácidos (ref. A-9656, Sigma) fue usada como referencia para calibrar el analizador. Para la determinación del Trp se realizó una hidrólisis básica seguida de cuantificación colorimétrica (11). La recta patrón de referencia se preparó a partir de una solución standard de

Trp (10 µg/ml) (Sigma), con distintas concentraciones (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 µg Trp/ml), usando la siguiente ecuación de regresión: $Y = 2,3294 \cdot 10^{-3} + 1,3385 X$, donde Y es la concentración de Trp (µg/ml), y X la absorbancia. La digestibilidad in vitro de la proteína (DIVP) se determinó según el procedimiento descrito por Satterlee y col. (12). La muestra fue sometida a una doble digestión enzimática. La primera a 37°C durante 10 min. con una solución enzimática a base de tripsina pancreática porcina (17,46 mg/10 ml) (ref. T-0134, Sigma), quimotripsina pancreática bovina (46,5 mg/10 ml) (ref. C-4129, Sigma) y peptidasa intestinal porcina (10,40 mg/10 ml) (ref. P-7500, Sigma). La segunda a 55°C durante 9 min. con pronasa bacteriana «P» (16,25 mg/10 ml) (ref. P-5147, Sigma). La DIVP se valoró en función de la variación del pH de las muestras medido a 37°C, 1 min. después de la segunda digestión enzimática. Este mismo proceso fue realizado con un patrón de caseína (Sigma), con la que se obtiene un pH final de referencia de 6,42±0,05. Finalmente, el porcentaje de DIVP se obtiene aplicando la ecuación: $DIVP(\%) = 234,84 - 22,56X$

$DIVP(\%) = 234,84 - 22,56X$

Donde X es el pH medido a los 20 min. de finalizar la digestión enzimática.

FIGURA 1
Diagrama de flujo de la fabricación de los cereales infantiles

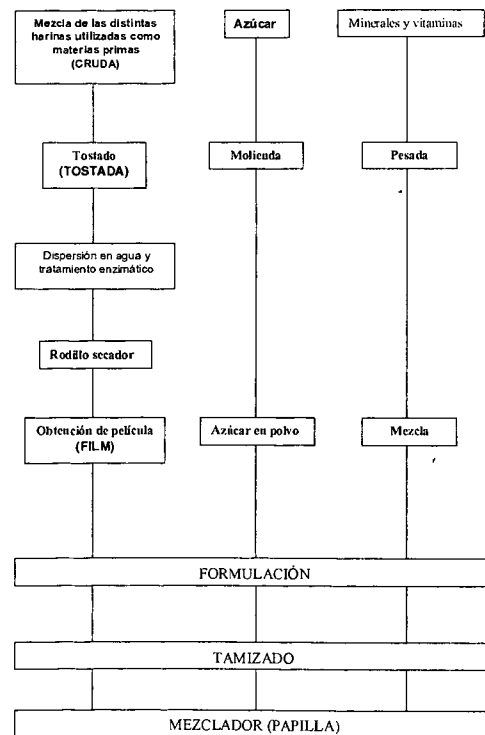


TABLA 1
Ingredientes de los cereales infantiles evaluados en el presente estudio

Ingredientes	Cereales infantiles			
	Con gluten	Sin gluten		
	Multicereales	Trigo	Crecimiento	Arroz y zanahoria
Cereales				
Trigo	+ ¹	+	- ²	-
Mijo	+	-	-	-
Cebada	+	-	-	-
Centeno	+	-	-	-
Sorgo	+	-	-	-
Arroz	+	-	+	+
Avena	+	-	-	-
Mafz	+	-	+	+
Otros ingredientes				
Zanahoria	-	-	-	+
Frutas atomizadas	+	-	-	-
Almidón de tapioca	-	-	+	-
Almidón de mafz	-	-	+	-
Extracto de malta	-	+	-	-
Vainilla	+	+	+	-
Sacarosa	+	+	+	+
Minerales y vitaminas				
Hierro reducido	+	+	+	+
Fosfato bicálcico	+	+	+	+
Yoduro potásico	-	-	+	-
Complejo vitamínico ³	+	+	+	+

¹ Ingrediente presente en la composición de los cereales infantiles.

² Ingrediente no presente en la composición de los cereales infantiles.

³ El complejo vitamínico aparece en todas por igual y consta de: vitamina A 1000UI; vitamina D 300UI; vitamina E 10 mg; vitamina C 90 mg; vitamina B₁ 1 mg; vitamina B₂ 1,2 mg; vitamina B₆ 1 mg; vitamina B₁₂ 1,2 µg; niacina 12 mg; ácido pantoténico 6 mg; ácido fólico 30 µg; biotina 40 µg.

Cálculo de los índices químicos

Otros parámetros ampliamente utilizados en la evaluación de la calidad de la proteína son el cálculo de índices químicos (IQ) o valores índice de una proteína (13,14). En el presente estudio se emplearon:

$$IQ = \frac{\text{mg aa limitante por g de proteína estudiada}}{\text{mg del mismo aa de proteína de referencia}} \times 100$$

$$IQCDP = \frac{IQ \times DIVP}{100}$$

En el caso del IQ el perfil de aminoácidos de la proteína de referencia, fue considerado el patrón de requerimientos para 2-5 años de edad (15).

Cálculo de la medida en que el contenido de proteína y aminoácidos esenciales de las harinas infantiles cubriría las raciones dietéticas recomendadas de los mismos en la edad infantil

Tomando como referencia los valores propuestos por la FAO/OMS (15) para niños de 3-4 meses y 5-24 meses, se calculó el porcentaje de las necesidades de aminoácidos esenciales que serían cubiertas por la proteína de la papilla de los distintos cereales infantiles estudiados.

El cálculo del aporte necesario de proteína de cada una de las papillas de cereales infantiles para cubrir las necesidades de niños a las edades de 0-5 meses, 5-12 meses y 12-36 meses de edad, se realizó mediante la siguiente fórmula (13):

$$\text{Aporte requerido de una mezcla proteica} = \frac{\text{Aporte recomendado según las proteínas del huevo}}{\text{Índice químico de la mezcla proteica}} \times 100$$

La determinación del porcentaje de proteína que garantizaría las necesidades proteicas mediante el consumo de las cuatro harinas de cereales infantiles hasta los 36 meses de edad, divididos en 3 periodos (0-5, 5-12 y 12-36 meses, respectivamente) se realizó con el valor del aporte de proteína requerida (Tabla 4), según las Raciones Dietéticas Recomendadas (RDR) del Food and Nutrition Board de EEUU (16). Para ello se tuvo en cuenta el peso medio de los niños a esas edades (6,8; 8,9 y 12,6 kg, respectivamente) (2), y el contenido en proteína de las harinas de cereales infantiles “Multicereales”, “Trigo”, “Crecimiento” y “Arroz y zanahoria” en la fase de papilla (9,1; 10,31; 6,32 y 7,06%, respectivamente). También se consideraron las recomendaciones del fabricante en cuanto a las cantidades de papilla ingeridas según la edad del niño. Así a los 4 meses se consume como mínimo 40 g de papilla al día (4 cucharadas de 5 g por papilla en dos tomas), a los 5 meses se consume como mínimo 50 g de papilla al día (5 cucharadas de 5 g por papilla en dos tomas) y de los 6 a los 24 meses de edad el consumo se estima como mínimo 60 g de papilla al día (6 cucharadas de 5 g por papilla en dos tomas).

Análisis estadístico

Para el estudio de los datos obtenidos, se ha realizado un análisis de varianza unifactorial (ANOVA) empleando los intervalos de confianza del 95%, 99% y 99,9%, para comprobar si las diversas variables dependen de los efectos aleatorios derivados del tipo de muestra (harina cruda, harina tostada, film y papilla) influidos por el procesado tecnológico

de los cuatro tipos de harinas de cereales infantiles. Una vez rechazada la hipótesis de igualdad entre medias para las distintas muestras, se realizó un test de separación de medias con intervalos de confianza al 95%, según la técnica de Tuckey. El paquete estadístico empleado fue el SYSTAT para Windows versión 5.0 (17).

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto del procesamiento tecnológico sobre el perfil de aminoácidos esenciales y no esenciales de cereales infantiles y perfil aminoacídico de las papillas

Aunque a priori se esperaban mayores cambios, en líneas generales el tratamiento tecnológico no afectó de forma significativa ni al contenido en aminoácidos esenciales ni al de no esenciales en los cereales infantiles «Multicereales», «Trigo» y «Crecimiento». Sólo en los cereales «Arroz y zanahoria» se aprecia un efecto estadísticamente significativo de $P < 0,05$ para los aminoácidos, Lys (de $3,64 \pm 0,33$ en harina cruda a $3,15 \pm 0,23$ g/100 g de proteína en papilla) y arginina (Arg) (de $4,81 \pm 0,36$ en harina cruda a $5,36 \pm 0,43$ g/100 g de proteína en papilla), y de $P < 0,001$ para valina (Val) (de $6,55 \pm 0,13$ en harina cruda a $5,13 \pm 0,22$ g/100 g de proteína en papilla) (18). Debido a la inexistencia en líneas generales de diferencias estadísticamente significativas en el contenido

de aminoácidos esenciales como consecuencia del procesamiento tecnológico, en la Tabla 2 se muestran únicamente los valores obtenidos en la fase de papilla de los cereales infantiles, que al fin y al cabo es la que va a ser tomada por el niño, así como el patrón de requerimientos en aminoácidos esenciales propuesto por la FAO/OMS en 1985 (15) para niños de 3-4 meses y 5-24 meses de edad. En cuanto al perfil de aminoácidos de las distintas harinas de cereales, hemos observado que entre los aminoácidos esenciales los que presentaron valores más elevados en todas las harinas fueron tirosina+fenilalanina (Tyr+Phe) (de 5,69 a 9,3 g/100g de proteína) y leucina (Leu) (de 6,07 a 6,88 g/100g de proteína), llegando incluso a 9,63 g/100g de proteína en "Crecimiento". Entre los aminoácidos esenciales que mostraron los niveles más bajos estuvieron histidina (His) (de 1,27 a 2,45 g/100 g de proteína) y Lys (de 1,72 a 4,03 g/100 g de proteína). En cuanto a los aminoácidos azufrados (Cys+Met) todas las harinas mostraron niveles aceptables, con valores entre 3,44 y 4,03 g/100g de proteína. El contenido de los aminoácidos Cys+Met, Ile y Thr no mostraron diferencias significativas entre las cuatro papillas de cereales, mientras que el resto de aminoácidos fue significativamente superior (de $P < 0,05$ a $P < 0,001$) en las harinas de cereales sin gluten, destacando la harina "Crecimiento".

TABLA 2
Composición de aminoácidos (aa) esenciales (g/100 g proteína) en la fase de papilla de las cuatro harinas de cereales infantiles estudiadas

Aminoácidos	Multicereales	Trigo	Crecimiento	Arroz y zanahoria	Significación ¹	FAO/OMS ²	
						3-4m	5-24m
Cys+Met	3,82±1,43a	4,03±1,01a	3,37±1,31a	3,44±0,24a	NS	3,3	2,5
His	1,92±0,30ab	1,27±0,17b	2,45±0,50a	2,16±0,24a	*	1,6	1,9
Ile	3,73±0,81a	2,56±0,80a	4,05±0,69a	3,82±0,40a	NS	4,0	2,8
Leu	6,77±0,24b	6,07±1,32b	9,63±1,24a	6,88±0,52b	**	9,3	6,6
Lys	1,72±0,09c	1,49±0,30c	4,03±0,27a	3,15±0,23b	***	6,0	5,8
Thr	3,53±0,73a	3,43±0,21a	4,16±0,41a	3,73±0,14a	NS	5,0	3,4
Trp	1,43±0,03ab	1,08±0,34b	1,99±0,53a	0,87±0,15b	*	1,0	1,1
Tyr+Phe	5,78±0,87b	5,69±1,09b	9,30±0,41a	8,05±0,91a	**	7,2	6,3
Val	3,98±0,86ab	2,48±0,75b	5,32±0,99a	5,31±0,22a	**	5,4	3,5

¹ Nivel de significación: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, NS= no significación.

² Perfil de requerimientos de aminoácidos (g/100g proteína) en niños de 3-4 meses de edad y 5-24 meses de edad, datos de FAO/OMS (15).

a-c Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma fila muestran diferencias significativas para $P < 0,05$.

En la Tabla 3 se muestran el contenido de aminoácidos no esenciales en la fase de papilla de los cereales infantiles. El ácido glutámico (Glu) (con valores de 17,01 a 29,53 g/100g de proteína), junto con prolina (Pro) (de 3,91 a 9,46 g/100g de proteína), fueron los aminoácidos más abundantes en todos los cereales infantiles estudiados. En este caso, el

contenido de todos los aminoácidos no esenciales mostró diferencias significativas entre las distintas harinas de cereales, siendo alanina (Ala), Arg, ácido aspártico (Asp) ($P < 0,001$), serina (Ser) ($P < 0,01$) y glicina (Gly) ($P < 0,05$) mayoritarios en los cereales sin gluten, mientras que Glu ($P < 0,001$) y Pro (0,05) lo fueron en los cereales con gluten.

TABLE 3
Composición de aminoácidos no esenciales (g/100 g proteína) en la fase de papilla de las cuatro harinas de cereales infantiles estudiadas

Aminoácidos	Multicereales	Trigo	Crecimiento	Arroz y zanahoria	Significación ¹
Ala	3,29±0,52b	2,56±0,48b	5,48±0,55a	5,19±0,05a	***
Arg	2,69±0,51b	2,38±1,04b	4,64±0,46a	5,36±0,43a	***
Asp	1,88±0,74b	0,86±0,12b	7,26±0,27a	7,62±0,58a	***
Glu	25,48±3,63a	29,53±3,80a	17,37±0,20b	17,01±1,07b	***
Gly	2,99±0,44ab	2,67±0,65b	3,97±0,28a	3,85±0,22a	*
Pro	9,46±1,99a	6,50±2,52ab	3,91±0,85b	5,05±0,39b	*
Ser	3,34±1,22b	2,61±0,48b	5,28±0,10a	4,21±0,07ab	**

¹ Nivel de significación: *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, NS= no significación.

a-b Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma fila muestran diferencias significativas para P<0,05.

Requerimientos de aminoácidos esenciales cubiertos por cereales infantiles durante el primer año de vida

No se conocen con total exactitud las necesidades diarias de aminoácidos esenciales para el hombre (13), aunque existen valores de ingesta recomendados por parte de organismos como la FAO y la OMS (15). Tomando como referencia los valores propuestos por este organismo para niños de 3-4 meses y 5-24 meses (Tabla 2), se ha calculado qué porcentaje de estas necesidades sería cubierto por la proteína de la harina de los distintos cereales infantiles estudiados en la fase de papilla por ser la forma comercial del producto (Figura 2). En todas las harinas de cereales se observó que las necesidades en aminoácidos, tanto en niños de 3-4 meses (Figura 2a) como de 5-24 meses de edad (Figura 2b), serían cubiertas en menor medida por Lys (de 24,83% en "Trigo" a la edad de 3-4 meses hasta 69,48% en "Crecimiento" a la edad de 5-24 meses), mientras que dependiendo del tipo de harina y de la edad, los aminoácidos cuyas necesidades serían cubiertas en mayor medida serían Trp (de 79,09% en "Arroz y zanahoria" a la edad de 5-24 meses hasta 199% en "Crecimiento" a la edad de 3-4 meses), Cys+Met (de 122,12% en "Crecimiento" a la edad de 3-4 meses hasta 161,2% en "Trigo" a la edad de 5-24 meses) e His (de 66,84% en "Trigo" a la edad de 5-24 meses hasta 153,12% en "Crecimiento" a la edad de 3-4 meses). En general, las necesidades de los aminoácidos en niños de 5-24 meses estarían cubiertas en mayor medida que a los 3-4 meses de edad puesto que para estos últimos las recomendaciones son mayores, excepto para los aminoácidos His y Trp, hecho que puede ser observado en todas las harinas. Tanto para la edad de 3-4 meses como para 5-24 meses, las necesidades de aminoácidos esenciales que cubrirían las harinas de cereales infantiles no mostraron diferencias

significativas (P<0,001) en cuanto al tipo de cereal utilizado para los aminoácidos Cys+Met, Ile y Thr. Sin embargo, sí que mostraron diferencias significativas los aminoácidos Lys (P<0,001), Leu, Tyr+Phe y Val (P<0,01), His y Trp (P<0,05) dependiendo de la harina utilizada. De este modo los requerimientos en estos aminoácidos serían cubiertos en mayor medida por las harinas de cereales sin gluten, especial por la harina "Crecimiento", que las con gluten.

Evaluación de la calidad de la proteína de cereales infantiles mediante índices químicos

Entre los numerosos procedimientos ideados para evaluar la calidad de una proteína, uno de los más utilizados es la determinación de la cantidad de aminoácido esencial menos abundante en la proteína en estudio (aminoácido limitante), que nos permite calcular el índice químico (IQ) o valor índice (13).

En la Tabla 4 se muestra tanto los índices químicos (IQ e IQCDP) como los aminoácidos limitantes de las cuatro fases del procesado tecnológico de las harinas de cereales infantiles seleccionadas para el estudio. Los índices químicos basados en la Lys, aminoácidos azufrados (Met+Cys), Trp y Thr son, probablemente, los de mayor importancia práctica ya que parece ser que son los únicos que resultan limitantes en la mayoría de los regímenes humanos (13). En nuestro caso, y como era de esperar, para todas las harinas de cereales infantiles y en todas las fases, tanto en los requerimientos para niños de 3-4 como de 5-24 meses de edad, el aminoácido limitante fue la Lys. Este es también el aminoácido limitante del trigo, cebada, avena, maíz, arroz (19), sorgo, mijo y centeno (20), todos ellos utilizados como materias primas de los distintos cereales infantiles estudiados.

FIGURA 2

Porcentaje de aminoácidos esenciales que serán garantizados por la proteína de las harinas de cereales infantiles «Multicereales», «Trigo», «Crecimiento» y «Arroz y zanahoria» según las recomendaciones establecidas por la FAO/OMS (15) respecto a las necesidades de niños de 3-4 meses y 5-24 meses de edad. Cisteína+Metionina (Cys+Met), Histidina (His), Isoleucina (Ile), Lisina (Lys), Treonina (Thr), Triptófano (Trp), Tirosina+Fenilalanina (Tyr+Phe), Valina (Val). ^{a-c} Letras distintas en los valores medios de cada aminoácido muestran diferencias significativas para $P < 0,05$ con los de las otras harinas de cereales dentro del mismo periodo de edad

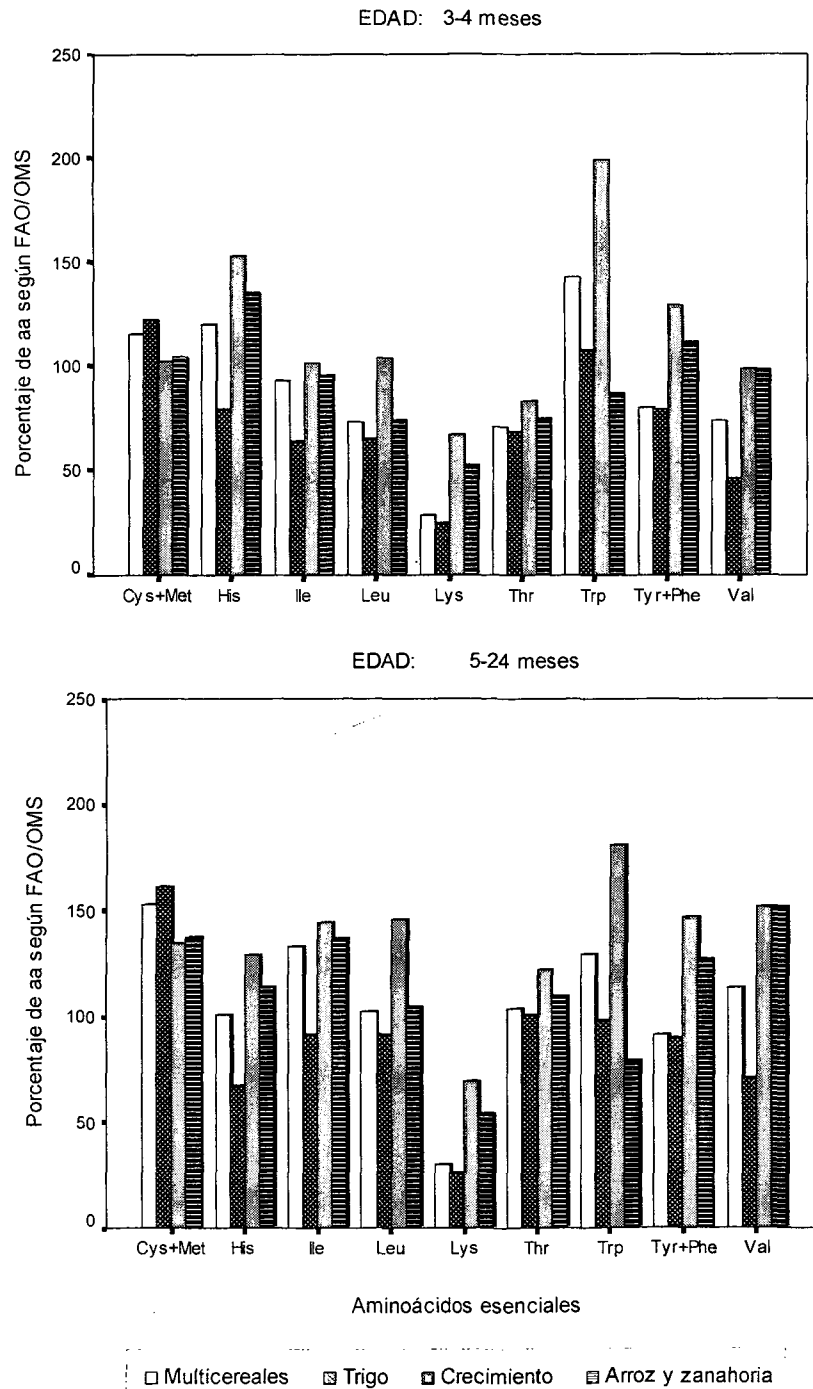


TABLA 4

Índice químico (IQ), Digestibilidad *in vitro* de la proteína (DIVP), Índice químico corregido mediante la digestibilidad de la proteína (IQCDP) y Aminoácido (aa) limitante de las cuatro fases (harina cruda, harina tostada, film y papilla) de los cereales estudiados, respecto a los valores propuestos por la FAO/OMS (15) para niños de 3-4 y 5-24 meses de edad. También se incluyen los aportes requeridos en proteína (g/kg/día) de estas harinas de cereales para niños de 0-5, 5-12 y 12-36 meses de edad (16)

Etapa del procesado/ Indicador calidad proteica	Harinas de cereales infantiles			
	«Multicereales»	«Trigo»	«Crecimiento»	«Arroz y zanahoria»
H. Cruda				
IQ (%)	26,03±6,03b	26,38±5,69b	63,27±6,55a	62,76±5,69a
DIVP (%)	79,62±4,64	91,87±0,10	97,83±7,50	81,57±3,38
IQCDP (%)	20,82±5,66b	24,23±5,24b	62,07±9,98a	51,26±6,10a
Aa limitante	Lys	Lys	Lys	Lys
H. Tostada				
IQ (%)	30,69±6,20b	23,62±4,83b	58,62±8,27a	68,79±6,2a
DIVP (%)	83,31±1,11	97,01±1,57	95,97±2,74	83,48±7,23
IQCDP (%)	25,59±5,38b	22,94±4,92b	56,33±8,97a	57,58±9,06a
Aa limitante	Lys	Lys	Lys	Lys
FILM				
IQ (%)	27,76±0,52b	20,34±3,96b	50,34±8,44a	45,69±6,03a
DIVP (%)	79,37±3,59	88,71±2,10	88,74±3,07	80,04±5,87
IQCDP (%)	22,04±1,26bc	18,07±3,79c	44,76±8,51a	36,69±6,80ab
Aa limitante	Lys	Lys	Lys	Lys
PAPILLA				
IQ (%)	29,66±1,55c	25,69±5,17c	69,48±4,65a	54,31±3,97b
DIVP (%)	76,54±0,72	91,30±0,47	90,33±0,32	74,48±4,08
IQCDP (%)	22,70±1,31c	23,46±4,80c	62,77±4,33a	40,50±4,59b
Aa limitante	Lys	Lys	Lys	Lys
Aporte requerido¹				
(0-5 meses)	7,42	8,56	3,17	4,05
(6-12 meses)	5,39	6,23	2,30	2,94
(12-36 meses)	4,05	4,67	1,73	2,21

a-b Letras distintas como superíndice de los valores medios dentro de la misma fila muestran diferencias significativas para $P < 0,05$ para un mismo parámetro entre las diferentes harinas.
1 g/kg/día.

Los índices químicos mostraron una clara tendencia dependiendo del tipo de harina de cereal utilizado. En las harinas de cereales con gluten, estos índices (IQ e IQCDP) no se vieron afectados significativamente por el tratamiento tecnológico. En el caso de las harinas de cereales sin gluten, si se produjo un cambio significativo pero sólo en la harina de "Arroz y zanahoria" (de 62,76% a 45,69%).

Diversas experiencias realizadas con niños en crecimiento han demostrado que el IQ permite una predicción correcta de la cantidad de proteína que se precisa para cubrir las necesidades en aminoácidos indispensables durante el periodo

de crecimiento (21). Así, hemos calculado cuál sería la cantidad necesaria de proteína de cada una de las harinas de cereales infantiles analizadas (Tabla 3) para cubrir las necesidades de niños a las edades de 0-5 meses, 5-12 meses y 12-36 meses de edad, según las recomendaciones del National Research Council de EEUU, que las sitúa en 2,2, 1,6 y 1,2 g por kg de peso y día, respectivamente (16). Los resultados muestran que, debido a que las necesidades proteicas y aminoacídicas varían rápidamente y lo hacen de forma decreciente conforme el niño va teniendo más edad, el aporte proteico requerido va decreciendo según el niño

avanza en edad en las cuatro harinas de cereales (Tabla 3). Hay que destacar que las proteínas de las harinas de cereales «Crecimiento» y «Arroz y zanahoria» fueron las más adecuadas, con unos requerimientos de 3-4 g por kg de peso y día en cualquiera de las edades consideradas (0-3 años), siendo menores en la harina «Crecimiento». Por el contrario, las harinas de cereales «Multicereales» y «Trigo» mostraron una proteína de menor valor nutritivo, con unos requerimientos a la edad de 0-5 meses por encima de los 7 g, aunque a una edad superior (1-3 años) el aporte requerido de proteína para cubrir las necesidades no sería superior a 5 g por kg y día.

Anteriormente se consideró el IQ como un parámetro de medida de la calidad de la proteína. Sin embargo, este método posee algunos inconvenientes como son el no aclarar los efectos negativos del exceso de aminoácidos o los factores antinutricionales presentes en el alimento proteico (13). Así, la Food and Drug Administration (22) ha propuesto el llamado «Índice químico corregido mediante la digestibilidad de la proteína» (IQCDP) («Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scoring») como un parámetro que podría definir mejor la calidad de la proteína. Aunque este índice se calcula realmente respecto a la digestibilidad de la proteína in vivo, en nuestro caso hemos optado por utilizar los ensayos in vitro porque constituyen una alternativa menos costosa y más fácil, tanto de realizar como de interpretar. Además, poseen una elevada exactitud respecto al Coeficiente de Eficacia Proteica (PER) empleado como método de referencia en la evaluación de la calidad proteica (23, 24).

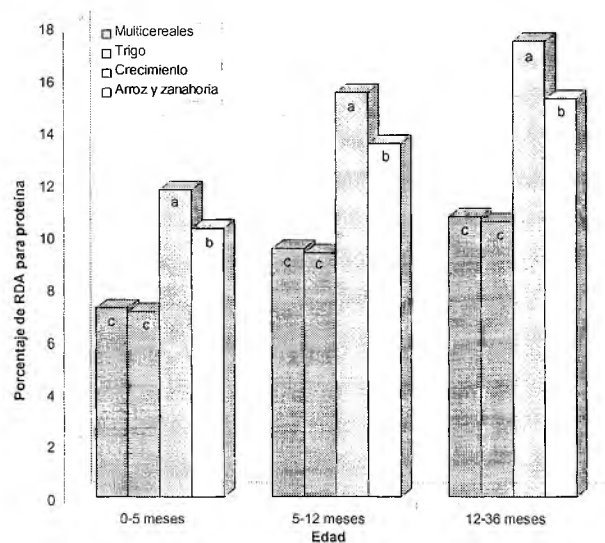
En general los índices de digestibilidad son bastante adecuados, correspondiendo los más bajos a las harinas de cereales «Multicereales» y «Arroz y zanahoria» (entorno a 75%), y los valores más altos a las harinas de cereales «Trigo» y «Crecimiento» (entorno a 91%). En cuanto al IQCDP, se observa la misma tendencia que la mostrada por el IQ, y es que las harinas de cereales infantiles con gluten no se vieron afectadas significativamente por el procesado tecnológico, presentando una menor calidad proteica, en comparación con las harinas de cereales sin gluten. En éstas, igual que anteriormente, con el tratamiento el valor del IQCDP tampoco se modifica significativamente en la harina «Crecimiento» (44,76% a 62,77%) y disminuye significativamente ($P<0,05$) de 51,26% a 36,69% en «Arroz y zanahoria».

Comparando el comportamiento de ambos índices químicos (IQ e IQCDP) en las distintas fases de procesado de las harinas de cereales, se observa que en todos los casos hubo diferencias estadísticamente significativas ($P<0,001$), excepto en el IQCDP para la fase de film, en la que las diferencias no fueron tan marcadas ($P<0,01$). Así, IQ e IQCDP se mostraron siempre superiores en las harinas de cereales infantiles sin gluten que con gluten, sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas entre ambos índices

en todas las etapas del procesado previas a la fase de papilla. En definitiva, es la harina de cereales «Crecimiento» la que posee la proteína de mayor calidad, con unos IQ e IQCDP finales de 69,72% y 62,77%, respectivamente. Por el contrario, la proteína de la harina «Trigo», a pesar de tener una elevada digestibilidad (91,3%) en la fase papilla, similar a la de la harina «Crecimiento», mostró un IQCDP final (23,46%), tan bajo como el de «Multicereales» (22,70%) con una digestibilidad de 76,54%.

FIGURA 3

Porcentaje de proteína que sería garantizada por las harinas de cereales infantiles «Multicereales», «Trigo», «Crecimiento» y «Arroz y zanahoria» según las recomendaciones establecidas por el Food and Nutrition Board (16) respecto a las necesidades de niños de 0-5, 5-12 y 12-36 meses de edad. ^{a-c} Letras distintas en los valores medios de cada aminoácido muestran diferencias significativas para $P<0,05$ con los de las otras harinas de cereales dentro del mismo periodo de edad



Aunque puedan parecernos algo bajos los IQCDP obtenidos (inferiores a 100, que sería el considerado como óptimo), hay que tener en cuenta que estos índices no se refieren a una proteína pura (como pueda ser el caso de la caseína), sino a una mezcla de varias fuentes proteicas vegetales. También puede influir el hecho de que las harinas con un mayor índice hayan sido las que contenían una mayor proporción de arroz en su composición («Crecimiento» y «Arroz y zanahoria»), ya que en el caso de este cereal el aminoácido limitante (Lys) se encuentra en mayor cantidad que en el resto (exceptuando la avena) (19), lo que desde un punto de vista nutricional hace que la harina tenga un mayor valor biológico. Este comportamiento es similar al observado con relación a las necesidades de proteínas cubiertas por las

distintas harinas (Figura 3). Las harinas sin gluten, compuestas a partir de arroz principalmente, cubren un mayor porcentaje (10,25%-17,41%) de las necesidades proteicas cualquier edad y con diferencias significativas ($P<0,001$) con respecto al resto de harinas infantiles (7,08%-10,69%). Como era previsible, las necesidades proteicas a mayor edad (6-24 meses) se cubrirían significativamente ($P<0,001$) en mayor medida que los requerimientos de las mismas a edades más tempranas (4 y 5 meses).

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se ha evaluado en qué medida el procesado tecnológico influye en la calidad de la proteína de las harinas de cereales infantiles a través de sus aminoácidos esenciales, mediante el uso de diferentes parámetros de calidad proteica de un alimento. De forma general el contenido de aminoácidos esenciales no se ve afectado como consecuencia del tratamiento tecnológico, siendo capaces de cubrir entre un 50% y 200% las necesidades aminoacídicas desde los 3 hasta los 24 meses de edad. Únicamente se observó un descenso significativo, de relevancia en la calidad proteica, en el aminoácido Lys en la harina de cereales infantiles «Arroz y zanahoria». A pesar de ello, los índices químicos (IQ e IQCDP) son clara y significativamente superiores en las harinas de cereales sin gluten, mostrando la harina «Crecimiento» la mayor calidad proteica debido a que presentó un mayor contenido en aminoácidos esenciales y al estar formuladas con arroz (cereal de mayor contenido en Lys). Por el contrario, las harinas de cereales con gluten mostraron unos índices químicos inferiores, debido a su menor contenido en Lys y, aunque la harina «Trigo» presenta una digestibilidad *in vitro* de la proteína bastante elevada (88,71%-97,87%), no fue suficiente para obtener un IQCDP similar al de las harinas sin gluten (36,69%-62,77%). Por todo ello, el aporte de proteína requerido en las harinas de cereales para cubrir las necesidades proteicas hasta los 3 años de edad es menor en los cereales sin gluten ya que su proteína es capaz de cubrir los requerimientos en mayor medida que los cereales con gluten. Así, podemos concluir que la harina de cereales cuya proteína se afecta menos por el tratamiento tecnológico, y por tanto posee una elevada digestibilidad y un mayor contenido en aminoácidos esenciales para cubrir las necesidades infantiles fue la harina denominada «Crecimiento» compuesta principalmente por arroz y maíz.

AGRADECIMIENTOS

A Hero España, S.A. (Murcia, España) por proporcionar las muestras empleadas y su apoyo económico en este estudio (Proyecto UMU 3115), y al gobierno español por la beca de investigación (IN92-D34803105) de Darío Pérez-Conesa.

REFERENCIAS

1. Milner JA. Trace mineral in the nutrition of children. *J Pediatr* 1990;117 Suppl :147-55.
2. Committee on International Nutrition Programs: Maternal and infant nutrition in developing countries. Food and Nutrition Board. National Academy Press. Washington, USA, 1983.
3. Casado de Frías E, Maluenda C, Casado E. Alimentación del niño. En: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, editores. Nutrición y dietética, aspectos sanitarios. Madrid, España. 1993: 383-403.
4. MacRitchie F. Physicochemical properties of wheat proteins in relation to functionality. *Adv in Food Nutr Res* 1992;36: 2-87.
5. Graybosh RA, Peterson CJ, Baenziger PS, Shelton DR. Environmental modification of hard red winter wheat flour protein composition. *J Cereal Sci* 1995;22:45-51.
6. Martí-Hennerberg C. Nutrición en pediatría. En: Cruz Hernandez, M, editor. Tratado de pediatría. Barcelona, España. 1993: 639-654.
7. Owusu-Ansah YJ, McCurdy SM. Pea protein: a review of chemistry, technology of production and utilization. *Food Rev Int* 1991;7(1):103-4.
8. Friedman M. Nutritional value of proteins from different food sources: a review. *J Agric Food Chem* 1996;(1): 6-29.
9. Srivastav PP, Das H, Prasad S. Effect of roasting process variables on *in vitro* protein digestibility of bengalgram, maize and soybean. *Food Chem* 1990;35: 31-37.
10. Moore S, Stein WH. Chromatographic determination of aminoacids by the use of automatic recording equipment. *Methods of Enzymol* 1963;(6): 819-831.
11. Sastry CSP, Tumuru MK. Spectrophotometric determination of tryptophan in proteins. *J Food Sci Tech* 1985;22:146-7.
12. Atterlee LD, Bodwell CE, Hackler LR. Protein quality in humans: assessment and *in vitro* estimation. In: Bodwell, CE, Adkins, JS, Hopkins, DT, editors. AVI Publishing Co., Inc. Westport, CT. 1981:316-8.
13. Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D. Proteínas alimentarias. En: Acribia S.A. edición. Zaragoza, España. 1989.
14. Henley EC, Kuster JM. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring. *Food Technol* 1994; (4): 74-77.
15. FAO/OMS. Informe de la reunión consultiva sobre Necesidades de energía y proteínas. Serie informes técnicos. Ginebra, Suiza, 1985:724.
16. National Research Council (NRC). Raciones dietéticas recomendadas. En: Consulta, S.A edición. 1ª edición española de la 10ª edición original., Barcelona, España. 1991.
17. Wilkinson H, Howe P. Systat for Windows 5.0. Evanston, IL. 1992.
18. Pérez D. Calidad de la proteína en las distintas fases de procesado de las harinas de cereales infantiles. Murcia: Universidad de Murcia, 1998.
19. Lintas C, Mariani-Constantini A. Cereal foods: wheat, corn, rice, barley and other cereals and their products. In: Spiller, G.A editor. The Mediterranean diets in health and disease. Van Nostrand Reinhold, New York, USA. 1991:59-101.

20. Kent NL. Tecnología de los cereales. En: Acribia, S.A edición. Introducción para estudiantes de ciencia de los alimentos y agricultura. Zaragoza, España, 1987.
21. Harper AE. Mc Collum and directions in the evaluation of protein quality. *J Agric Food Chem* 1981;29: 429-35.
22. Food and Drug Administration. Food labelling. General provisions; Nutrition labelling; Label format; Nutrient content claims; Health claims; Ingredient labelling; State and local requirements and exemptions. Final rules. *Food and Drug Admin Fed Reg* 1993;58 (3): 2101-2106.
23. Alsmeyer RH, Cunningham, AE, Happich, ML. Equations predict PER from amino acid analysis. *Food Technol* 1974;(7): 34-40.
24. Walker AF. The estimation of protein quality. In: Hudson, B.J.F, editor. *Developments in food proteins*. Vol. 2. Applied science publishers Ltd. London, UK. 1983:293-319.

Recibido: 29-08-2001

Aceptado: 02-04-2002

Cholesterol and fatty acids profile of Brazilian commercial chicken giblets

Nádia Rosa Pereira, Edvani Curti Muniz, Makoto Matsushita & Nilson Evelázio de Souza

Department of Chemistry, State University of Maringá-Maringá, Paraná State, Brazil

SUMMARY. This study was carried out to determine the chemical composition, cholesterol contents and fatty acids profile of Brazilian commercial chicken giblets. The analysis were performed in gizzard, liver and heart *in natura* and also in cooked gizzard, fried liver and roasted heart. Fat and cholesterol contents ranged from 0.88% and 72.68 mg/100g, in cooked gizzard, to 22.19% and 213.18 mg/100g, in roasted heart. As the fat content gets higher, so does the cholesterol content. Palmitic (C16:0) and stearic acids (C18:0) were the predominant saturated fatty acids (SFA). The C16:0 ranged from 6.39% in cooked gizzard to 18.51% in fried liver. The C18:0 level ranged from 6.62% in roasted heart to 19.19% in cooked gizzard. Linoleic acid (C18:2 ω 6) was the predominant polyunsaturated fatty acid (PUFA). The data revealed that the three different analysed giblets presented a good PUFA/SFA ratio, with values of 1.11, 1.14 and 1.40 for cooked gizzard, fried liver and roasted heart, respectively.

Key words: Chicken; giblets; fatty acids; cholesterol.

RESUMEN. Colesterol y perfil de ácidos grasos en vísceras de pollos comerciales brasileños. Este estudio fue realizado para determinar la composición química, contenido de colesterol y perfil de ácidos grasos en vísceras de pollos comerciales brasileños. Los análisis fueron hechos en mollejas, hígados fritos y corazones asados a las brasas. El contenido de grasas y colesterol varió de 0,88g/100g y 72,68 mg/100g en mollejas cocidas a 22,19g/100g y 213,18 mg/100g en corazones asados a las brasas. Se observó que a mayor contenido de grasa, mayor el contenido de colesterol. Entre los ácidos saturados (AGS) presentes, los principales fueron los ácidos palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0). El nivel de C18:0 varió de 6,39% en molleja cocida hasta 18,51% en hígado frito. El nivel de C18:0 varió de 6,62% en corazón asado a la brasa hasta 19,19% en hígado cocido. Entre los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), el predominante fue el ácido linoleico (C18:2 ω 6). Los resultados mostraron que los tres tipos de vísceras analizadas presentaron una buena relación AGPI/AGS, a cuales fueron 1,11, 1,14 y 1,40 para mollejas cocidas, hígados fritos y corazones asados, respectivamente.

Palabras clave: Pollos, vísceras, ácidos grasos, colesterol.

INTRODUCTION

During the 80's Brazil presented a chicken meat production of about one million tons per year and a per capita consumption of 8.7 kg per year. By increasing its production, in 1998 production went up 4.5 million tons per year and a per capita consumption of 24.0 kg (1). Nowadays Brazil is the third largest producer and consumer of chicken meat, behind the United States of American and China. Brazil is the country that the higher exportation rate, that is 0.6 million tons in 1998 (2).

In Brazil, chicken meat is sold as a whole chicken or in separated pieces, such as wing, thigh, back, breast, heart, gizzard and liver. The gizzard, liver and heart are consumed cooked, fried and roasted, respectively. Consumers have increasingly become aware of the health quality of the foods they consume. Lipid composition, in particular, is the primary parameter that consumers have taken in consideration, mainly the amount and composition of fat, due to the risk of coronary heart disease and certain forms of cancer (3). The coming of nutritional tables

and the consumers interest has gave emphasis for the need of additional and more complete data of the foods (4).

Dietary cholesterol is an important issue in public health because it is often related to the incidence of arteriosclerosis. Currently, consumers are specially aware of their dietary intake of high-fat animal food, that contains saturated fat and cholesterol (5).

Few data exists in the literature concerning the chemical composition, cholesterol content (6) and the fatty acid profile of chicken giblets.

The purpose of this study was to determine the chemical composition, cholesterol content and fatty acid profile of chicken giblets.

MATERIAL AND METHODS

Sampling

Five samples of giblets having 1kg each were randomly collected from different commercial establishments in

Maringá, Paraná State, Brazil. The giblets were prepared without oil, seasoning or condiment addition, as follows: gizzard was cooked in water, liver was fried in a pot recovered by Teflon®, and the heart was roasted over hot charcoals. (The giblets were prepared as the way its were consumed in Brazil). The samples were triturated, homogenized and analysed in triplicate.

Determination of moisture, ash, lipid and protein contents

Moisture, ash and protein contents were determined as described by Cunniff (7). Lipids were extracted from giblets using a modified Folch *et al.* (8) method. Giblet samples (15 ± 0.01 g) were transferred to 90 mL of chloroform-methanol (2:1, v/v) solution and stirred for 2 min. After blending, 30 mL of chloroform and 30 mL of deionized water were added and the mixture was stirred again. A 0.58% aqueous NaCl solution was added, causing the chloroform layer (containing lipid) to separate from the methanol-water phase. The lipid extract was transferred to a 250 mL flask and the solvent was evaporated under a stream of nitrogen. The lipid content was determined gravimetrically. Carbohydrate was determined by difference

Extraction and analysis of cholesterol

The extraction and quantification of the cholesterol were carried out by the method of Al Hasani *et al.* (9) with modifications. Samples of giblets (10 ± 0.0001 g) were placed in a 250 mL flat-bottom flask. The sample was dispersed in an ethanol-methanol-isopropanol (90:5:5, v/v/v) solution, in an equivalent amount to 4 mL gram of sample and 1 mL 60% KOH per gram of sample. The flask containing the mixture was connected to a water-cooled condenser, and refluxed during 1 hr. After cooling the digest to the room temperature, 100 mL of hexane was added and the mixture was stirred for 10 min. Next, 25 mL of de-ionized water were added and the mixture was stirred for 15 min. The layers were then separated and the hexane layer was collected in a flask. An aliquot of the 25 mL hexane layer was evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The residue was dissolved in 2 mL of hexane containing 0.2 mg of 5 α -cholestane, used as internal standard, and transferred to a sample vial. Around 3 μ L was injected into a gas chromatograph. A Shimadzu 14A (Japan) equipment fitted with flame ionization detector (FID, 300°C) and a split/split less injector (260°C, split 1:150) was used for the cholesterol analysis. Separation was carried out in a fused silica capillary column (25 m; 0.25 mm i.d.), coated with SE-30 (0.25 μ m phase thickness), at 300°C. The carrier gas was hydrogen (1.5 mL/min) and the make up gas was nitrogen (25 mL/min). Cholesterol identifications were made by comparing the relative retention time peaks from samples to the standards from Sigma (USA). For peak integration, a CG-300

Computing integrator (CG Instruments, Brazil) was used.

Transesterification and fatty acid composition

Methyl esters were prepared by transmethylation according to the method 5509 of the ISO (10), using KOH 2 mol/L in methanol and *n*-heptane. Fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed using a Shimadzu 14A (Japan) gas chromatograph equipped with flame ionization detector and fused silica capillary column (50 m x 0.25 mm and 0.20 μ m of Carbowax 20M). Column temperature was programmed at 7 degree/min from 150-240°C. The injection port and detector were maintained at 220°C and 245°C, respectively. Carrier gas was hydrogen (1.2 mL/min) and the make up gas was nitrogen (30 mL/min). The split used was 1:100. Comparing the relative retention times of FAME peaks from samples with those observed on the standards from Sigma (USA) did identification of normal fatty acids. The peak areas were determined by the CG-300 Computing integrator (CG Instruments, Brazil). Data were calculated as normalized area percentages of fatty acids.

Statistical analysis

The experimental data are presented as $\bar{x} \pm SD$ (mean \pm standard deviations). They were statistically confronted for one-way ANOVA as described by Montgomery (11). Data were processed using the Statistica 5.1 software (StatSoft, USA, 1996).

RESULTS AND DISCUSSION

The proximate chemical composition found for five samples of chicken giblets *in natura* that were analyzed in triplicates, is presented in Table 1. Comparing the three kinds of analysed giblets, it can be noticed that the liver presents the largest content of ash, as expected. There are not significant differences ($P < 0.05$) of ash content between gizzard and heart. Among all the analysed kinds, the moisture presents significant differences ($P < 0.05$). The fat of liver, gizzard and heart presented significant differences ($P < 0.05$). The heart presented the largest level, 16.98g/100g. In relation to the liver and gizzard, the heart presented significant difference ($P < 0.05$) in protein content. The liver was the unique giblet that presented carbohydrates (1.75g/100g) in its composition.

The proximate chemical composition of prepared chicken giblets is presented in Table 2. All the samples were submitted to heating, although in different ways. When analysing the prepared giblets its present significant differences ($P < 0.05$), in content of protein, ash, fat and its do not present significant difference in the moisture content between fried liver and cooked gizzard. It is note worthy the higher content of fat presented by the roasted heart presents (22.19g/100g) when

compared to the fried liver (2.38g/100g) and cooked gizzard (0.88g/100g). For the cholesterol content in mg/100g, there were not significant differences among fried liver (192.09) and roasted heart (213.18). Compared to the literature, the content found for the chicken fried liver is smaller than the one found for bovine fried liver (273.94mg/100g) as described by Rowe *et al.* (14). In the prepared form, significant differences ($P<0.05$) for the content of proteins was observed.

TABLE 1
Proximate chemical composition of giblets in natura¹ (g/100g)

Giblets	Gizzard	Liver	Heart
Moisture (g)	79.50±0.20 ²	75.38±0.04 ³	70.49±0.82 ⁴
Ash (g)	0.66±0.04 ²	1.29±0.02 ³	0.65±0.08 ²
Fat (g)	0.56±0.07 ²	2.09±0.15 ³	16.98±0.19 ⁴
Protein (g)	20.19±3.03 ²	19.49±0.16 ²	10.83±2.10 ³

¹Data presented as mean ± SD of five samples, each one in triplicate.

^{2,3,4}Means within a row with no common superscripts are significantly different ($P<0.05$).

TABLE 2
Proximate composition (g/100g) of prepared giblets¹

Giblets	Cooked gizzard	Fried liver	Roasted heart
Moisture (g)	68.63±0.16 ²	69.07±0.22 ²	35.08±0.70 ³
Ash (g)	0.75±0.03 ²	1.68±0.02 ³	2.37±0.05 ⁴
Fat (g)	0.88±0.05 ²	2.38±0.24 ³	22.19±0.96 ⁴
Protein (g)	28.82±0.28 ²	23.24±0.26 ³	39.01±0.58 ⁴
Cholesterol (mg)	72.68±15.95 ²	192.09±31.05 ³	213.18±19.47 ³

¹Data presented as mean±SD of five samples, each one in triplicate.

^{2,3,4}Means within a row with no common superscripts are significantly different ($P<0.05$).

The fatty acids profile of prepared chicken giblets is presented in Table 3. The roasted heart presents smaller content of saturated fatty acids. The palmitic acid (C16:0) is the predominant acid (16.86%) followed by the stearic acid (C18:0) (6.62%). In fried liver, the content of those acids is 18.51% and 16.37%, respectively. However, for the polyunsaturated fatty acids, the fried liver presents a larger percentage (40.55%). Should be taken in account the presence of the arachidonic acid (C20:4ω6) (16.76%) and linoleic acid (C18:2ω6) (19.81%) and DHA (C22:6ω3) (2.52%). All the giblets presented good PUFA/SFA ratio with values higher than 1. Values for the PUFA/SFA ratio higher than 0.45 have been recommended by the Department of Health (15). A decrease of this value indicates food that are not very healthy, in relation to cardiovascular diseases.

TABLE 3
Fatty acid profile of prepared giblets¹

	Cooked gizzard ²	Fried liver ²	Roasted heart ²
C14:0	Trace ³	0,24±0,01 ⁴	Trace ³
C16:0	6.39±0,18 ³	18,51±1,07 ⁴	16,86±0,50 ⁴
C16:1ω7	1.61±0,05 ³	2,12±0,14 ⁴	6,50±0,17 ⁵
C17:0	Trace ³	0,16±0,02 ⁴	Trace ³
C17:1 ω10	1.28±1,01 ³	Trace ⁴	Trace ⁴
C18:0	19.19±2.46 ³	16.37±1.03 ³	6.62±0.31 ⁴
C18:1ω9	20.71±8.94 ³	21.57±1.28 ^{3,4}	30.93±1.53 ^{3,5}
C18:2 ω6	7.49±1.56 ³	19.81±1.55 ⁴	22.32±1.12 ⁵
C18:3ω6	1.86±0.82 ³	0.55±0.04 ⁴	Trace ⁵
C18:3ω3	3.23±0.39 ³	Trace ⁴	3.40±1.09 ³
C20:0	5.43±0.76 ³	Trace ⁴	1.34±0.77 ⁵
C20:1ω9	2.75±0.85 ³	0.32±0.03 ⁴	1.44±0.00 ⁵
C20:2ω6	4.89±0.71 ³	0.91±0.03 ⁴	2.15±0.15 ⁵
C20:3 ω6	3.13±1.08 ³	Trace ⁴	1.61±0.45 ³
C20:3ω3	4.81±0.41 ³	Trace ⁴	4.00±0.56 ³
C20:4ω6	5.81±1.73 ³	16.76±1.80 ⁴	Trace ⁵
C20:5ω3	2.95±0.52 ³	Trace ⁴	1.35±0.30 ⁵
C22:0	2.61±0.35 ³	Trace ⁴	Trace ⁴
C22:1ω9	2.64±1.27 ³	Trace ⁴	1.41±0.40 ³
C22:2ω6	3.21±1.09 ³	Trace ⁴	Trace ⁴
C22:6ω3	Trace ³	2.52±0.16 ⁴	Trace ³
C24:0	Trace ³	0.32±0.04 ⁴	Trace ³
MUFA ⁶	29.09	24.01	40.28
PUFA ⁶	37.41	40.55	34.83
SFA ⁶	33.62	35.60	24.82
PUFA/SFA ⁷	1.11	1.14	1.40

¹Calculated as wt% of fatty acid methyl esters as percentage of total fatty acids.

²Data presented as mean±SD of five samples, each one in triplicate.

^{3,4,5}Means within a row with no common superscripts are significantly different ($P<0.05$).

⁶Monounsaturated fatty acids; saturated fatty acids; polyunsaturated fatty acids.

⁷Ratio of polyunsaturated to saturated fatty acids.

CONCLUSIONS

Considering the contents of fat, protein and cholesterol, it could be pointed out that the chicken giblets would more advisable be the cooked gizzard, if the consumer is looking for a diet with low calorie and high levels of protein and also polyunsaturated fatty acids.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to CNPq and CAPES for financial support.

REFERENCES

1. APA - Associação Paulista de Avicultura. Obstáculos ao livre comércio em tempos de globalização. *Aves & Ovos* 1999; 4:20-36.
2. APA - Associação Paulista de Avicultura. O frango na ponta do consumo. *Aves & Ovos* 1999;10:20-24.
3. Hargis PS, Vanelswik ME. Manipulating the fatty acid composition of poultry meat and eggs for the health conscious consumer. *Worlds Poult Sci J* 1993;49:251-264.
4. Kinsella JE. Lipids and fatty acids in foods: quantitative data needed. *Food Technol* 1975;29:22-25.
5. Flynn MA, Naumant HD, Nolph GB, Krause G, Ellersiek M. The effect of meat consumption on serum lipids. *Food Technol* 1985;53:58-64.
6. Rincon AM, Padilla FC, Vizcarrondo CA, Martin E. Cholesterol content in chicken meat and chicken products. *Arch Latinoamer Nutr* 1997;47:81-84.
7. Cunniff, PA. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16 ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists. 1998. CD-ROM.
8. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
9. Al-Hassani SM, Mlavac J, Carpenter MW. Rapid determination of cholesterol in single and multicomponent prepared foods. *J Assoc Off Anal Chem Inter* 1993;76:902-906.
10. ISO - International Organization for Standardization. *Animal and Vegetable Fats and Oils - preparation of methyl esters of fatty acids*. ISO: Geneva. 1978. Method ISO 5509.
11. Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments*. 4 ed. New York: John Wiley & Sons. 1997.
12. Rowe A, Bertoni SA, Pereira PL, Matsushita M, Souza NE de. Cholesterol em carnes bovinas, suínas, frangos e derivados de carnes comercializados em Maringá, Paraná, Brasil. *Arch Latinoamer Nutr* 1997;47:282-284.
13. Department of Health. *Nutritional aspects of cardiovascular disease*. Report on Health and Social Subjects. Number 46. Her Majesty's Stationer Office, London. 1994.

Recibido: 11-12-2000

Acepado: 22-03-2002

Caracterização da fração lipídica de amostras comerciais de camarão-rosa

Andréa Figueiredo Procópio de Moura, Rosângela Pavan Torres, Jorge Mancini-Filho, Alfredo Tenuta Filho

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. SP, Brasil

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a fração lipídica de amostras comerciais refrigeradas de camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*). O teor médio de lípidos totais foi de $1,13 \pm 0,09$ g/100g. Quanto ao perfil de ácidos graxos, este revelou a presença de 32,9% de saturados, 20,4% de monoinsaturados e 40,5% de polinsaturados. Foram identificados e quantificados 18 ácidos graxos, sendo 7 saturados (14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0), 4 monoinsaturados (16:1w7, 17:1w9, 18:1w9, 20:1w9) e 7 polinsaturados (18:2w6, 18:3w3, 20:2w6, 20:4w6, 20:5w3, 22:5w3, 22:6w3). Os teores de colesterol livre variaram entre 92 e 136 mg/100g, correspondendo a um valor médio de 118mg/100g. Ao mesmo tempo, foi constatada a ocorrência de 7-cetocolesterol livre, denunciando a oxidação do colesterol, em níveis de 0,185 a 0,366 µg/g. A composição de ácidos graxos foi quantificada por CG, com coluna de sílica fundida Supelcowax 10, e a determinação do colesterol e 7-cetocolesterol por HPLC, em fase normal, com coluna µ-Porasil e detector de fotodiodos.

Palavras-chave: Camarão, lípidos, ácidos graxos, colesterol, 7-cetocolesterol, pescado

SUMMARY. Characterization of the lipid portion of pink shrimp commercial samples. The objective of this study was to describe the fresh cooled pink-shrimp (*Penaeus brasiliensis* and *Penaeus paulensis*) lipid. The total lipid content was $1,13 \pm 0,09$ g/100g while fatty acid profile showed 32,9% saturated, 20,4% monounsaturated and 40,5% polyunsaturated. Eighteen fatty acids were detected, seven saturated (14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 22:0), four monounsaturated (16:1w7, 17:1w9, 18:1w9, 20:1w9) and seven polyunsaturated (18:2w6, 18:3w3, 20:2w6, 20:4w6, 20:5w3, 22:5w3, 22:6w3). The free cholesterol content was 92 to 136 mg/100g with average of 118mg/100g. In same time, was observed the occurrence of free 7-ketocholesterol, a product of cholesterol oxidation, in levels of 0,185 to 0,366 µg/g. The fatty acid profile was obtained by gas chromatography with a fused silica column Supelcowax 10. The cholesterol and 7-ketocholesterol was determined by high performance liquid chromatography using a µ-Porasil column, normal phase, and a diode array detector.

Keywords: Shrimp, lipid, fatty acid, cholesterol, 7-ketocholesterol, fish.

INTRODUÇÃO

A produção de camarão no Brasil vem crescendo a cada ano. A pesca extrativa atingiu, em 1997, a marca de 61 mil toneladas que, somadas às 7200 oriundas da carcinicultura, chega a quase 70 mil toneladas. A produção de camarão cultivado é uma atividade relativamente recente no Brasil, mas em franco crescimento. O estímulo neste setor reflete uma tendência crescente na população, que tem aumentado o consumo de pescado em busca de uma alimentação mais balanceada e saudável. Os produtos marinhos além de possuírem proteínas com elevado valor biológico, se constituem na maior fonte de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa da série ω_3 , os quais têm sido extensivamente estudados graças a seu envolvimento na prevenção de doenças cardiovasculares, hipertensão, arritmias, desordens auto-imunes e câncer (1). Ao se preconizar dietas com altas concentrações de ácidos graxos ω_3 tem-se motivado o consumo de produtos marinhos.

De acordo com o National Fisheries Institute (2), nos últimos 20 anos o consumo per capita de camarão cresceu

66%; em 1996 foi de 1,13kg/pessoa/ano nos Estados Unidos. No Brasil, o consumo deste crustáceo é maior nas regiões litorâneas, tendo sido neste mesmo ano de 0,78 kg/pessoa/ano na região metropolitana de Belém, menor que a média americana, porém com grandes perspectivas de elevação (3).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a fração lipídica de amostras comerciais refrigeradas de camarão-rosa através do teor lipídico, composição de ácidos graxos, da concentração de colesterol livre e da ocorrência de 7-cetocolesterol livre.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram utilizadas indistintamente as espécies *Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*, comercializadas com o nome genérico de camarão-rosa. Dez lotes (300g cada) foram adquiridos no comércio local (São Paulo - SP), oriundos de diferentes procedências, classificados como camarão-rosa médio, com tamanhos de 13-15 cm de comprimento e peso variando entre 30 e 33g. A remoção do exoesqueleto,

cefalotórax e intestino foi realizada no laboratório seguida da trituração das amostras em homogeneizador.

O colest-5-ene-3 β -ol (colesterol - C8667) e o 3 β -hidroxicolest-5-ene-7-one (7-cetocolesterol - C2394) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. O hexano (Aldrich - 110-54-3) e o isopropanol (EM Science - PX1838-1) usados tinham grau HPLC e os demais reagentes grau ACS.

Métodos

A determinação de umidade foi realizada segundo a AOAC (4) e o extrato lipídico total obtido de acordo com Bligh & Dyer (5).

Para a determinação da composição de ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard modelo HP 6890, equipado com detetor de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida (Supelcowax 10), com 30m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno, nas seguintes condições cromatográficas: coluna isotérmica à temperatura de 230°C, vaporizador e detetor à temperatura de 250°C, utilizando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1ml/min. A identificação foi realizada pela comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das amostras com os dos padrões correspondentes, e os resultados calculados em percentagem de área. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram preparados utilizando o método de Hartman & Lago (6).

Para a dosagem de colesterol e 7-cetocolesterol livres foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu, modelo SCL-10A_{vp}, equipado com detetor de fotiodos SPD-M10A_{vp}, sistema de bombas LC-10AD_{vp} e injetor automático de amostras SIL-10AD_{vp}. Foi empregado o método de Csallany et al. (7), utilizando uma coluna de sílica, μ -Porasil 30 x 0,39 cm (Waters Associates), diâmetro de poro de 10 μ m, em fase normal. A identificação dos picos de colesterol (206nm) e 7-cetocolesterol (233nm) se deu pela comparação dos tempos de retenção da amostra em relação aos padrões correspondentes, e a quantificação por padronização externa pela medida da área do pico. A curva-padrão do 7-cetocolesterol foi construída de 0,1 a 0,5 μ g e a do colesterol de 10 a 50 μ g ($r^2=0,999$). O limite de detecção foi de 1×10^{-9} g (8) e o teste de recuperação para o colesterol e 7-cetocolesterol de 99,9% e 93,5%, respectivamente.

RESULTADOS

Os níveis de umidade encontrados nos diferentes lotes de camarão-rosa variaram de 75,6 a 81,5 g/100g, sendo em média 78g/100g, enquanto o teor lipídico médio foi de $1,13 \pm 0,09$ g/100g.

O perfil de ácidos graxos revelou a presença de 33% de saturados, 20% de monoinsaturados e 41% de polinsaturados. Foram identificados 18 ácidos graxos, sendo 7 saturados, 4 monoinsaturados e 7 polinsaturados (Tabela 1).

TABELA 1

Ácidos graxos (% por área) de *Penaeus brasiliensis* + *Penaeus paulensis*, *Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*

Ácidos Graxos (%)	<i>P. brasiliensis</i> + <i>P. paulensis</i> (a)	<i>P. brasiliensis</i> (b)	<i>P. paulensis</i> (c)
14:0 Mirístico	1,6 \pm 0,2	1,6 \pm 0,3	1,5
15:0 Pentadecanóico	1,0 \pm 0,03	1,0 \pm 0,1	0,6
16:0 Palmítico	18,2 \pm 1,6	14,9 \pm 0,5	16,3
17:0 Margárico	2,1 \pm 0,1	1,9 \pm 0,2	1,8
18:0 Estearíco	10,1 \pm 0,4	8,6 \pm 0,8	14,5
20:0 Araquídico	-	0,2 \pm 0,0	-
22:0 Beênico	-	0,3 \pm 0,1	-
Saturados	32,9	30,2	34,7
16:1 ω 7 Palmitoléico	6,6 \pm 0,4	6,3 \pm 0,7	3,4
17:1 ω 9 Heptadecenóico	1,0 \pm 0,2	1,0 \pm 0,1	-
18:1 ω 9 Oléico	12,2 \pm 0,1	7,9 \pm 0,8	11,0
18:1 ω 7 Vacênico	-	3,6 \pm 0,2	-
20:1 ω 9 Eicosanóico	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	1,6
Monoinsaturados	20,4	22,6	16,0
18:2 ω 6 Linoléico	2,5 \pm 0,4	1,5 \pm 0,1	1,1
18:3 ω 3 Linolênico	0,4 \pm 0,03	0,5 \pm 0,0	-
20:2 ω 6 Eicosadienóico	0,7 \pm 0,02	-	-
20:4 ω 6 Araquidônico	6,7 \pm 0,8	5,2 \pm 0,2	-
20:5 ω 3 Eicosapentanóico	17,8 \pm 0,7	18,7 \pm 2,3	17,9
22:5 ω 3 Docasapentaenóico	1,7 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2	2,5
22:6 ω 3 Docosaexaenóico	10,7 \pm 0,8	13,3 \pm 0,6	11,2
Polinsaturados	40,5	45,0	42,7

(a) Resultados do presente trabalho; (b) Bragagnolo & Rodriguez-Amaya (12); (c) Takada et al. (13).

A concentração de colesterol livre variou de 92 a 136 mg/100g, com valor médio de $118 \pm 15,3$ mg/100g. Foi constatada a ocorrência de 7-cetocolesterol livre em concentrações que variaram entre 0,185 e 0,366 μ g/g, com valor médio de 0,230 μ g/g. Com exceção de duas amostras, que apresentaram concentrações mais elevadas ($>0,300\mu$ g/g), os demais mostraram valores bastante semelhantes, em torno de 0,197 μ g/g (Tabela 2).

TABELA 2

Colesterol e 7-cetocolesterol livres em camarão-rosa (n=10 lotes)

Concentração	Colesterol mg/100g	7-Cetocolesterol μ g/g
Mínima	92,1	0,185
Máxima	135,9	0,366
Média	118	0,230
Desvio-padrão	15,3	0,100
Coefficiente de variação (%)	13	31

DISCUSSÃO

Teor lipídico

O camarão-rosa (*P. brasiliensis* e *P. paulensis*) demonstrou um baixo conteúdo lipídico em estreita concordância com outras espécies de camarão estudadas, relatadas na literatura. Johnston *et al.* (9) encontraram uma concentração de 1,2g/100g em *Penaeus aztecus*; King *et al.* (10), 1,3g/100g em *Pandalus borealis* e *Pandalus jordani*; e, Krzynowek & Panunzio (11), de 0,8 a 1,1g/100g em 5 espécies diferentes: *P. durarum notialis*, *P. vannanei*, *P. aztecus aztecus*, *P. durarum durarum*, *P. aztecus subtilis*. Em relação ao camarão-rosa *Penaeus brasiliensis*, Bragagnolo & Rodriguez-Amaya (12) relataram concentrações entre 0,9 e 1,1g/100g.

No entanto, os resultados do presente trabalho se mostraram inferiores aos obtidos por Takada *et al.* (13), provavelmente motivados por fatores bioecológicos. A análise de 18 espécies indicaram teores lipídicos entre 1,1 e 4,2 g/100g. Dentre as espécies estudadas, o *P. paulensis* apresentou uma concentração de 3,4g/100g e o *P. brasiliensis* 4,2g/100g.

Composição de ácidos graxos

O camarão apresenta uma menor proporção de ácidos graxos polinsaturados em relação a outros crustáceos, como o caranguejo, e alguns moluscos, como o mexilhão, ostra, marisco e lula. As quantidades de ácido eicosapentanoico - EPA e ácido docosaexaenóico - DHA variam muito entre estas espécies, sendo que os crustáceos apresentam maior concentração de EPA, enquanto os moluscos maiores níveis de DHA (10).

EPA (20:5w3) e o DHA (22:6w3) corresponderam a 28,5% do total dos ácidos graxos, ou a 70% dos ácidos graxos polinsaturados (Tabela 1). Evidentemente, sendo baixa a concentração lipídica do camarão-rosa, o aporte de EPA e DHA, por conseqüência, também é baixo.

Nos estudos disponíveis na literatura consultada, em que a composição dos ácidos graxos de camarão foi determinada, é difícil comparar os valores obtidos individualmente, uma vez que não são quantificados o mesmo número de ácidos graxos em todos os trabalhos. Bragagnolo & Rodriguez-Amaya (12) quantificaram 87 ácidos graxos e Takada *et al.* (13) apenas 13, em *Penaeus brasiliensis*. Krzeczowski (14) e King *et al.* (10) quantificaram 29 e 27 ácidos graxos, respectivamente na espécie *P. borealis*.

A literatura revela variações individuais na proporção dos ácidos graxos de camarão, até mesmo dentro de uma mesma espécie (10,12-14). Na Tabela 1 foram comparados os resultados do *Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*, obtidos no presente trabalho, com os correspondentes ao *P. brasiliensis* estudado por Bragagnolo & Rodriguez-Amaya (12) e ao *P. paulensis* analisado por Takada *et al.* (13). Apesar das diferenças entre os estudos, seja na quantidade ou na

proporção de ácidos graxos, alguns deles se mostraram predominantes: C16:0, C18:0, C16:1w7, C18:1w7, C18:1w9, C20:4w6, C20:5w3 (EPA) e o C22:6w3 (DHA). Em nosso trabalho e no de Bragagnolo & Rodriguez-Amaya (12), a soma destes ácidos graxos perfizeram 82 e 79% do total, respectivamente.

Concentração de colesterol

O colesterol é encontrado no organismo animal e nos alimentos nas formas livre e esterificada. Para sua quantificação total em alimentos, torna-se necessária a conversão do colesterol éster em colesterol livre, sendo a saponificação o método mais freqüentemente utilizado neste sentido. Em nosso estudo, a metodologia empregada é específica para a dosagem de colesterol livre, uma vez que suprime a etapa de saponificação.

O extrato lipídico do camarão é composto em sua maior parte por fosfolípidos, 62,1%, seguido pelos lípidos neutros, 36%, e glicolípidos, 1,9% (9). Dentre os esteróis, componentes da fração lipídica neutra, o colesterol é o mais proeminente, correspondendo a valores entre 94% e 99% do total (11,15).

A concentração média de colesterol livre observada (Tabela 2) foi similar à correspondente ao colesterol total obtida por Takada *et al.* (13), 121 mg/100g, e por Bragagnolo & Rodriguez-Amaya (12), 127 mg/100g, ambas referentes ao *Penaeus brasiliensis*. O valor médio de colesterol livre observado para *Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis* foi superior ao colesterol total médio encontrado por Krishnamorthy *et al.* (16), em *Penaeus setiferus*, 96 mg/100g. No entanto, foi inferior aos relatados por Krzynowek & Panunzio (11), nas espécies descritas anteriormente, 152 mg/100g; por Kritchevsky *et al.* (17), para uma espécie não identificada, 200mg/100g, e por King *et al.* (10), 147 mg/100g, para os camarões *Pandalus borealis* e *P. jordani*.

A variabilidade observada nos diversos estudos em relação ao colesterol total, tem sido atribuída à espécie de camarão analisada, às variações sazonais, tipo de alimentação, local de origem e também, às diferentes metodologias utilizadas na quantificação (12,15,17,18).

Os métodos colorimétricos são muito criticados devido à sua inespecificidade. Nos estudos de Krishnamorthy *et al.*, (16) e Kritchevsky *et al.*, (17) foi utilizado um método colorimétrico, Krzynowek & Panunzio (11) empregaram a cromatografia gasosa e Bragagnolo & Rodriguez-Amaya (12) a cromatografia líquida (HPLC).

A concentração de colesterol livre em camarão-rosa também foi estabelecida em função de seu teor lipídico. Os resultados foram expressos em percentagem e o colesterol variou de 7,7% a 11,9% de todo o conteúdo lipídico. Esta parcela é bastante expressiva, principalmente quando comparada aos demais músculos, como no frango, onde o

colesterol total oscila entre 1% e 4% em relação ao total de lípidos, dependendo do músculo, chegando ao valor máximo de 6,4% (19, 20).

Ocorrência de 7-cetocolesterol

Os dados existentes na literatura referentes aos músculos frescos demonstram que originalmente não deveriam conter óxidos de colesterol (21). Mas, nem sempre é isso que se observa. Os poucos estudos que quantificaram óxidos de colesterol em produtos frescos, apresentaram resultados bastante variáveis.

Enquanto Zubillaga & Maerker (22) observaram concentrações de 7-cetocolesterol total de 0,22 µg/g em carne de vitela, 0,06 µg/g em carne suína, e 0,83 µg/g em carne bovina, Pie *et al.*, (23) relataram para estes mesmos produtos, concentrações de 0,71, 0,92 e 1,12 µg/g, respectivamente, ou seja, 3, 15 e 1,3 vezes maiores. Csallany *et al.*, (7) só observaram a formação de 7-cetocolesterol livre em carne suína, depois de estocada por 10 dias sob refrigeração. Park & Addis (24) não detectaram óxido de colesterol em cérebro, fígado e carne bovina, o mesmo ocorrendo na sardinha e na lula estudadas por Osada *et al.*, (25). Por outro lado, Shozen *et al.*, (26) encontraram níveis de 7-cetocolesterol total de 9,8 e 7,9 µg/g, em base seca, para o bacalhau e a lula, respectivamente. Estes valores, calculados para o músculo contendo 80% de umidade, seriam de 1,96 e 1,58 µg de 7-cetocolesterol total/g, respectivamente.

Rodriguez-Estrada *et al.*, (27) utilizaram o 7-cetocolesterol como indicador da oxidação do colesterol em hambúrguer e verificaram que a amostra fresca apresentava nível bastante elevado deste óxido, 25,2 µg/g de lípide. Os autores associaram este fato ao tempo e às condições de estocagem da carne no supermercado, onde a exposição à luz e ao oxigênio e a ampla superfície de contato da carne moída, poderiam ser os fatores responsáveis pela oxidação.

A presença de 7-cetocolesterol em camarão-rosa e também em hambúrguer no estudo de Rodriguez-Estrada *et al.*, (27) na verdade, estaria indicando a possível ocorrência de outros óxidos, também produzidos na oxidação do colesterol. Desta forma, a quantidade total de produtos da oxidação do colesterol, pode ser ainda maior. Além do 7-cetocolesterol, o 7 α e 7 β - hidroxicoolesterol, 5 α e 5 β - epóxicoolesterol e o 25-hidroxicoolesterol são os óxidos mais frequentemente encontrados em alimentos.

Na literatura consultada não foi relatado nenhum estudo envolvendo a dosagem de óxidos de colesterol em camarão fresco. Dois trabalhos analisaram óxidos de colesterol em camarão processado; Ohshima *et al.*, (28) encontraram 4,0 µg/g de 7-cetocolesterol total (matéria seca) na espécie *Sergestes lucens* cozida e desidratada, e Lee *et al.*, (29) 16,57 µg/g de lípidos em camarão desidratado (espécie não identificada), comercializado na Korea. Este último, mesmo

em se tratando de um produto processado, apresentou concentrações de 7-cetocolesterol inferiores às observadas no presente estudo em camarão fresco; 20,6 µg/g de lípide.

CONCLUSÕES

A análise da fração lipídica do camarão-rosa (*Penaeus brasiliensis* e *Penaeus paulensis*) demonstrou uma elevada concentração de colesterol e baixa quantidade de lípidos com predominância de ácidos graxos insaturados, principalmente os polinsaturados EPA e DHA. A análise lipídica revelou ainda a presença de 7-cetocolesterol, um produto da oxidação do colesterol, indicativo da ocorrência de processos oxidativos no produto comercialmente fresco.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPESP, pelo suporte financeiro, e à CAPES pela bolsa de estudo concedida à autora. Agradecemos ainda ao Professor Motonaga Iwai pela caracterização zoológica das espécies de camarão-rosa.

REFERÊNCIAS

1. Candela M, Astiasaran I, Bello J. Effects of frying and warmholding on fatty acids and cholesterol of sole (*Solea solea*), codfish (*Gadus morrhua*) and hake (*Merluccius merluccius*). *Food Chem.* 1997;58(3):227-1.
2. National Fisheries Institute. The Shrimp council. [on line]. Available: <http://www.nfi.org/Shrimp%20Council/SRO80797.htm>[20/08/1998].
3. Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares. [on line]. Available: <http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin/prtbl> [29/01/2000].
4. Association Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC: AOAC, 1995.
5. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37(8):911-7.
6. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Lab Pract.* 1973;22:475-6.
7. Csallany AS, Kindom SE, Addis PB, Lee J. HPLC method for quantitation of cholesterol and four of its major oxidation products in muscle and liver tissues. *Lipids* 1989;24(7):645-1.
8. Long GL, Winefordner JD. Limit of detection: A closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem.* 1983;55(7):712A-24A.
9. Johnston JJ, Ghanbari HA, Wheeler WB, Kirk JR. Characterization of shrimp lipids. *J Food Sci.* 1983;48:33-5.
10. King I, Childs M, Dorset C, Ostrander JG, Monsen ER. Shellfish: proximate composition, minerals, fatty acids and sterols. *J Am Diet Assoc.* 1990;90(5):677-85.
11. Krzynowek J, Panunzio LJ. Cholesterol and fatty acids in several species of shrimp. *J Food Sci.* 1989;54(2):237-239.
12. Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Otimização da determinação de colesterol por CLAE e teores de colesterol, lípidos totais e ácidos graxos em camarão rosa (*Penaeus*

- brasiliensis*). Ciênc Tecnol Aliment. 1997;17(3):275-80.
13. Takada K, Takako A, Kunisaki N. Proximate composition, free amino acid, fatty acid, mineral and cholesterol contents in imported frozen shrimps. Nippon Suisan Gakkaishi 1988;54(12):2173-9.
 14. Krzeczowski RA. Fatty acids in raw and processed alaska pink shrimp. J Am Oil Chem Soc. 1970;47:451-2
 15. Gordon DT. Sterols in mollusks and crustacea of the Pacific Northwest. J Am Oil Chem. Soc. 1982;59(2):536-5.
 16. Krishnamoorthy RV, Venkataramiah G, Lakshmi GJ, Biesiot P. Effects of cooking and of frozen storage on the cholesterol content of selected shellfish. J Food Sci. 1979;44(1):314-5.
 17. Kritchevsky D, Tepper SA, Ditullo NW, Holmes W. The sterols in seafoods. J. Food Sci. 1967;32:64-6.
 18. Krzynowek J. Sterols and fatty acids in seafood. Food Technol. 1985:61-68.
 19. Marion JE, Woodroof JG. Lipid fractions of chicken broiler tissues and their fatty acid composition. J Food Sci.
 20. Pikul J, Leszczynski DE, Kummerow FA. Elimination of sample autoxidation by butylated hydroxytoluene additions before thiobarbituric acid assay for malonaldehyde in fat from chicken meat. J Agric Food Chem. 1983;31:1338-2.
 21. Paniangvait P, King AJ, Jones AD, German BG. Cholesterol oxides in foods of animal origin. A critical review. J Food Sci. 1995;60(6):1159-74.
 22. Zubillaga MP, Maerker G. Quantification of three cholesterol oxidation products in raw meat and chicken. J Food Sci. 1991;56(5):1194-7.
 23. Pie J E, Spahis K, Seillan C. Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. J Agric. Food Chem. 1991;39:250-4.
 24. Park S, Addis PB. HPLC determination of C-7 oxidized cholesterol derivatives in foods. J Food Sci. 1985;50:1437-1.
 25. Osada K, Kodama T, Cui L, Yamada K, Sugano M. Levels and formation of oxidized cholesterols in processed marine foods. J Agric Food Chem. 1993b;41:1893-8.
 26. Shozen K, Ohshima T, Ushio H, Koizumi C. Formation of cholesterol oxides in marine fish products induced by grilling. Fisheries Sci. 1995;61(5):817-1.
 27. Rodriguez-Estrada MT, Penazzi G, Caboni MF, Bertacco G, Lercker G. Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburgers. Meat Sci. 1997;45(3):365-5.
 28. Ohshima T, Li N, Koizumi C. Oxidative decomposition of cholesterol in fish products. J Am Oil Chem. Soc. 1993;70(6):595-9.
 29. Lee M, Su N, Yang M, Wang M, Choong Y. A rapid method for direct determination of free cholesterol in lipids. J Chin Agric Chem Soc. 1998;36(2):123-3.

Recibido: 06-04-2001

Aceptado: 19-02-2002

INFORMACION PARA LOS AUTORES

En 1950 el Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela edita su revista Archivos Venezolanos de Nutrición la cual en 1965 es donada a la recién creada Sociedad Latinoamericana de Nutrición, SLAN, para convertirse en su órgano oficial de divulgación Archivos Latinoamericanos de Nutrición, ALAN.

ALAN acoge en sus páginas trabajos de revisión, editoriales, conferencias y simposia y trabajos científicos originales sobre temas relacionados con alimentación y nutrición, entre ellos, ciencia y tecnología de alimentos, nutrición humana y animal, bioquímica nutricional aplicada, nutrición clínica y comunitaria, educación en nutrición y microbiología de alimentos.

Todos los artículos que se publican pasan por un proceso de arbitraje externo. El Comité Editorial no se hace responsable de los conceptos emitidos en los artículos aceptados para ser publicados y se reserva el derecho de no publicar los originales que no se ajusten a los lineamientos de la revista. No se devolverán originales ni se mantendrá correspondencia sobre aquellos que no sean publicados. ALAN se reserva los derechos de reproducción de los artículos seleccionados.

ALAN se acoge a las normas de los requisitos uniformes del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas (CIDRM), también conocido como el Grupo de Vancouver, en su quinta edición (1997) de los requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas (1). A continuación se reproduce esta publicación y se añaden algunas recomendaciones específicas, para ALAN.

Requisitos para la presentación de manuscritos a una revista

Resumen de los requisitos técnicos

- Todas las partes del manuscrito estarán a doble espacio.
- Cada sección o componente comenzará en página nueva.
- Revise la secuencia: página del título, resumen y palabras clave, texto agradecimientos, referencias, cuadros (cada uno en página aparte), pies e epígrafes de las ilustraciones.
- Las ilustraciones se presentaran en forma de impresiones fotográficas sin tomar, y no deberán exceder de 203 x 254 mm.
- Incluya la autorización para reproducir material publicado con anterioridad o para usar ilustraciones en las que se pueda identificar a los sujetos humanos.
- Adjunte la transferencia de los derechos de autor y otros formularios.
- Presente el número exigido de copias impresas del artículo (ALAN exige original y 3 copias).
- Guarde copias de todo lo que envíe.

Preparación del manuscrito

El texto de los artículos de observación y experimentales se divide generalmente, aunque no por fuerza, en secciones que llevan estos encabezamientos: introducción, métodos, resultados y discusión. En los artículos largos puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas secciones, sobre todo en las de resultados y discusión, a fin de hacer más claro el contenido. Es probable que otro tipo de artículos -como los informes de casos, las revisiones y los editoriales- exijan otra estructura. Para mayor orientación, los autores deberán consultar la revista en la que pretenden publicar.

Mecanografíese el manuscrito en papel bond blanco de 216 x 280 mm o de la medida estándar ISO A4 (212 x 297 mm), con márgenes de por lo menos 25mm (ALAN prefiere la medida de 216 x 280 mm). Escribese o imprimase solamente sobre una cara del papel. Utilícese doble espacio a lo largo de todo el manuscrito, incluido la página del título, el resumen, el texto los agradecimientos, las referencias, cada uno de los cuadros y los pies o epígrafes de las ilustraciones. Numérense las páginas en forma consecutiva, empezando por las del título. Sobre el ángulo superior o inferior derecho de cada página anótese el número que le corresponde.

Página del título

La primera página contendrá: 1) el título del artículo, que será conciso pero informativo; 2) nombre de pila preferido y apellidos de cada autor, acompañados de sus grados académicos más importantes y su afiliación institucional; 3) nombre del departamento o departamentos y la institución o instituciones a los que se debe atribuir el trabajo; 4) declaraciones de descargo de responsabilidad, si las hay; 5) nombre y dirección del autor que se ocupará de la correspondencia relativa al manuscrito; 6) nombre y dirección del autor a quien se dirigirán las solicitudes de separatas, o nota informativa de que los autores no las proporcionarán; 7) procedencia del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo, medicamentos o todo ello; y 8) título abreviado (titulillo) que no pase de 40 pulsaciones (contando caracteres y espacios), el cual se colocará, debidamente identificado como tal, en la última línea de la página inicial.

Autoría

Todas las personas designadas como autores habrán de cumplir con ciertos requisitos para tener derecho a la autoría. Cada autor

(1) Requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas. Rev Panam Salud Pública. Pan-Am J Pub Health. 1998;3(3):188-1998.

debe haber participado en el trabajo en grado suficiente para asumir responsabilidad pública por su contenido. Para concederle a alguien el crédito de autor, hay que basarse únicamente en su contribución esencial por lo que se refiere a los siguientes aspectos: 1) la concepción y el diseño o bien el análisis y la interpretación de los datos; 2) la redacción del artículo o la revisión crítica de una parte importante de su contenido intelectual; y 3) la aprobación final de la versión que será publicada. Las tres condiciones tendrán que cumplirse siempre. La participación que consiste meramente en conseguir financiamiento o recoger datos no justifica el crédito de autor. Tampoco basta con ejercer la supervisión general del grupo de investigación. Toda parte del artículo que sea decisiva con respecto a las conclusiones principales deberá ser responsabilidad de por lo menos uno de los autores. Los directores de revistas podrán solicitar a los autores que describan la contribución de cada uno; esa información puede ser publicada.

Cada vez es más común que los ensayos multicéntricos se atribuyan a un autor corporativo. Todos los miembros del grupo que sean designados como autores, ya sea en la línea destinada al nombre de los autores a continuación del título o en una nota a pie de página, deberán cumplir plenamente con los requisitos de requisitos de autoría recién señalados. Los miembros del grupo que no cumplan con dichos criterios serán mencionados, con su autorización, en la sección de agradecimientos o en un apéndice (véase "Agradecimientos").

El orden en que figuran los autores debe reflejar una decisión conjunta de estos. Como los autores se suelen enumerar de distintas maneras, el significado del orden en que aparecen no puede deducirse con exactitud a menos que ellos mismos lo enuncien explícitamente. Para tal efecto, tal vez deseen agregar, en una nota a pie de página, la explicación sobre el orden de enumeración. Al decidir acerca de dicho orden, los autores tendrán presente que muchas revistas imponen un límite al número de autores que figuran en el índice de materias y que, cuando hay más de 25 autores, la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos incluye en MEDLINE tan solo los nombres de los 24 primeros más el del último.

Resumen y palabras clave

La segunda página incluirá un resumen que no sobrepasará las 250 palabras de extensión. En él indicaran los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos (selección de los sujetos o los animales de laboratorio incluidos en el estudio; métodos de observación y análisis); los hallazgos más importantes (proporcionense datos específicos y, de ser posibles, su significación estadística), y las conclusiones principales. Hágase hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio o las observaciones.

A continuación del resumen agréguese, debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indizadores a clasificar el artículo, las cuales se publicarán junto con el resumen. Utilícese para este propósito los términos de la lista "Medical Subject Headings" (MeSH) [Encabezamientos de temas médicos] del Index Medicus; en el caso de términos de reciente aparición que todavía no figuren en dicha lista, podrán usarse las expresiones corrientes. ALAN exige que todo trabajo deberá acompañarse de un Resumen en inglés con sus palabras clave, "key words", si el trabajo original fuese en español, portugués o francés. Si el trabajo original es en inglés, el Resumen debe presentarse en español,

igualmente con sus palabras clave.

Introducción

Expresé el propósito del artículo y resuma el fundamento lógico del estudio u observación. Menciones las referencias estrictamente pertinentes y no incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.

Métodos

Describa claramente la forma como se seleccionaron los sujetos observados o que participaron en los experimentos (pacientes o animales de laboratorio, incluidos los testigos). Identifique la edad, el sexo y otras características importantes de los sujetos. La definición y la pertinencia de la raza o el grupo étnico son ambiguos. Los autores deberán ser particularmente cuidadosos con respecto a usar estas categorías.

Identifique los métodos, los aparatos (nombre y dirección del fabricante entre paréntesis) y los procedimientos con detalles suficientes para que otros investigadores puedan reproducir los resultados. Proporcione referencias de los métodos acreditados, incluidos los de índole estadística (véase más adelante); dé referencias y explique brevemente los métodos ya publicados pero que no son bien conocidos; describa los métodos nuevos o que han sido sustancialmente modificados, manifestando las razones por las cuales se usaron y evaluando sus limitaciones. Identifique exactamente todos los medicamentos y productos químicos utilizados, sin olvidar nombres genéricos, dosis y vías de administración.

Los informes de ensayos clínicos aleatorizados deberán presentar información sobre todos los elementos importantes del estudio, como son el protocolo (población de estudio, intervenciones o exposiciones, resultados y el fundamento lógico del análisis estadístico), asignación de intervenciones (métodos de aleatorización, ocultamiento de la asignación a los grupos de tratamiento) y método de enmascaramiento (método ciego).

Los autores que presenten manuscritos de revisión incluirán una sección en la que se describan los métodos utilizados para localizar, seleccionar, extraer y sintetizar los datos. Estos métodos se mencionarán también en forma sinóptica en el resumen.

Ética. Cuando informe sobre experimentos en seres humanos, señale si los procedimientos seguidos estuvieron de acuerdo con las normas éticas del comité (institucional o regional) que supervisa la experimentación en seres humanos o con la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en 1983. No utilice el nombre de los pacientes, sus iniciales ni los códigos hospitalarios, especialmente en el material ilustrativo. Cuando dé a conocer experimentos con animales, mencione si se cumplieron las normas de la institución, las de un consejo nacional de investigación o cualquier ley nacional acerca del cuidado y el uso de animales de laboratorio.

Estadística. Describa los métodos estadísticos con detalles suficientes para que el lector versado en el tema y que tenga acceso a los datos originales pueda verificar los resultados presentados. Siempre que sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de error o incertidumbre de la medición

(por ej., intervalos de confianza). No dependa exclusivamente de las pruebas de comprobación de hipótesis estadísticas, tales como el uso de los valores P, que no transmiten información cuantitativa importante. Analice la elegibilidad de los sujetos de experimentación. Proporcione los detalles del proceso de aleatorización. Describa los medios utilizados para enmascarar las observaciones (método ciego), indicando los resultados que dieron. Informe sobre las complicaciones del tratamiento. Especifique el número de observaciones. Mencione las pérdidas de sujetos de observación (por ej., las personas que abandonan un ensayo clínico). Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos utilizados serán de trabajos vigentes (indicando el número de las páginas), y no de los artículos originales donde se describieron por vez primera. Especifique cualquier programa de computación de uso general que se haya empleado. Las descripciones generales de los métodos utilizados deben aparecer en la sección de métodos. Cuando resuma los datos en la sección de resultados, especifique los métodos estadísticos que se emplearon para analizarlos. Limite el número de cuadros y figuras al mínimo necesario para explicar el tema central del artículo y para evaluar los datos en que se apoya. Use gráficas en vez de cuadros subdivididos en muchas partes; no duplique los datos en las gráficas y los cuadros. Evite el uso no técnico de términos de la estadística, tales como «al azar» (que entraña el empleo de un método de aleatorización), «normal», «significativo», «correlaciones» y «muestra». Defina los términos, las abreviaturas y la mayor parte de los símbolos estadísticos.

Resultados

En el texto, los cuadros y las ilustraciones, presente los resultados siguiendo una secuencia lógica. No repita en el texto todos los datos de los cuadros ni de las ilustraciones; destaque o resuma tan solo las observaciones importantes.

Discusión

Haga hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio y en las conclusiones que se derivan de ellos. No repita con pormenores los datos u otra información ya presentados en las secciones de introducción y de resultados. Explique en la sección de discusión el significado de los hallazgos y sus limitaciones, incluidas sus implicaciones para la investigación futura. Relacione las observaciones con otros estudios pertinentes.

Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, pero absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que no estén completamente respaldadas por los datos. En particular, los autores evitarán hacer afirmaciones sobre los beneficios y los costos económicos, a menos que su manuscrito incluya datos y análisis económicos. No reclame ningún tipo de precedencia ni mencione trabajos que no estén terminados. Proponga nuevas hipótesis cuando haya justificación para ello, pero identificándolas claramente como tales. Cuando sea apropiado, puede incluir recomendaciones.

Agradecimientos

En un lugar adecuado del artículo (como nota al pie de la primera

página o como apéndice del texto; véanse los requisitos de la revista) uno o varios enunciados especificarán lo siguiente: 1) las colaboraciones que deben ser reconocidas pero que no justifican la autoría, tales como el apoyo general del jefe del departamento; 2) el reconocimiento por la ayuda técnica recibida; 3) el agradecimiento por el apoyo financiero y material, especificando la índole del mismo; y 4) las relaciones que puedan suscitar un conflicto de intereses (véase «Conflicto de intereses»).

Las personas que colaboraron intelectualmente en el artículo pero cuya participación no justifica la autoría pueden ser citadas por su nombre, añadiendo su función o tipo de colaboración; por ejemplo, «asesoramiento científico», «examen crítico de la propuesta para el estudio», «recolección de los datos» o «participación en el ensayo clínico». Estas personas tendrán que conceder su permiso para ser nombradas. Los autores se responsabilizarán de obtener la autorización por escrito de las personas mencionadas por su nombre en los agradecimientos, pues los lectores pueden inferir que estas respaldan los datos y las conclusiones.

El reconocimiento por la ayuda técnica recibida figurará en un párrafo separado de los testimonios de gratitud por otras contribuciones.

Referencias

Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden en que se mencionan por primera vez en el texto. En este, en los cuadros y en los pies o epígrafes de las ilustraciones, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Las referencias citadas solamente en cuadros o ilustraciones se numerarán siguiendo una secuencia que se establecerá por la primera mención que se haga en el texto de ese cuadro o esa figura en particular.

Emplee el estilo de los ejemplos que aparecen más adelante, los cuales están basados en el formato que la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos usa en el *Index Medicus*. Abrevie los títulos de las revistas de conformidad con el estilo utilizado en dicha publicación. Consulte la *List of Journals Indexed in Index Medicus* [Lista de revistas indizadas en *Index Medicus*], que se publica anualmente como parte del número de enero y como separata. La lista se puede obtener asimismo en el sitio que la biblioteca mantiene en la World Wide Web (<http://www.nlm.nih.gov>).

Absténgase de utilizar los resúmenes como referencias. Las referencias a artículos que han sido aceptados pero que todavía no se publican se designarán como «en prensa» o «de próxima aparición»; los autores obtendrán por escrito el permiso para citar dichos artículos y también la verificación de que han sido aceptados para publicación. La información proveniente de manuscritos presentados para publicación pero aún no aceptados se citará en el texto como «observaciones inéditas», con el permiso correspondiente de la fuente.

No cite una «comunicación personal» a menos que aporte información esencial que no pueda obtenerse de una fuente pública; en ese caso, el nombre de la persona y la fecha de la comunicación aparecerán entre paréntesis en el texto. En el caso de artículos científicos, los autores deberán obtener el permiso de la fuente y su confirmación de la exactitud de la comunicación personal, ambos

por escrito. Los autores verificarán las referencias cotejándolas contra los documentos originales.

El estilo de los requisitos uniformes (estilo de Vancouver) se basa en gran medida en una norma de estilo ANSI adaptada por la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) para sus bases de datos. En los ejemplos que siguen se han agregado notas cuando el estilo de Vancouver difiere del estilo que actualmente utiliza la NLM.

Artículos de revista

1. Artículo de revista ordinario

Enumere los primeros seis autores y añada la expresión «et al.» (Nota: La NLM incluye ahora hasta 25 autores; si hay más de 25, enumera los primeros 24, continuación el último autor y luego agrega «et al.»)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996 Jun 1;124(11):980-3.

Optativamente, si se utiliza la paginación continua a lo largo de un volumen (como hacen muchas revistas médicas), se pueden omitir el mes y el número.

(Nota: Para respetar la uniformidad, en todos los ejemplos que se presentan en los requisitos uniformes se aplica esta opción. La NLM, sin embargo, no usa dicha opción.)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

Más de seis autores:

Parkin DM, Clayton D, Black Rj, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996;73:1006-12.

2. Organización como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.

3. No se indica el nombre del autor

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15.

4. Artículo en idioma extranjero (2)

(Nota: La NLM traduce el título al inglés, lo encierra entre corchetes y le agrega la abreviatura correspondiente al idioma original.)

Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral infrapatellar seneruptur hos tidligere frisk kvinne. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1996; 116:41-2.

5. Suplemento de un volumen

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.

6. Suplemento de un número

Payne DK, Sullivan MD, Massie Mj. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23(1 Suppl 2): 89-97.

7. Parte de un volumen

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995;32(Pt 3):303-6.

8. Parte de un número

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *N Z Med J* 1994;107(986 Pt 1):377-8.

9. Número sin volumen

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995;(320): 110-4.

10. Sin número ni volumen

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responsos. *Curr Opin Gen Surg* 1993:325-33.

11. Paginación en números romanos

Fisher GA, Sikic BI. Drug resistance in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995 Apr;9(2):xi-xii.

12. Indicación del tipo de artículo, según corresponda

Enzensber er W, Fischer PA. Metronome in Parkinson,s disease [carta]. *Lancet* 1996;347:1337.
Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumen]. *Kidney Int* 1992;42:1285.

13. Artículo que contiene una retractación

Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. Ceruloplasmin

(2) Evidentemente "extranjero" se entiende aquí en relación con el idioma inglés, pues los ejemplos de referencia bibliográfica se han trasladado directamente del original, sin adaptarlos (N. Del t.).

gene defect associated with epilepsy in EL mice [retractación de Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. En: Nat Genet 1994;6:426-31]. Nat Genet 1995;1:1: 104.

14. Artículo retirado por retractación

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [retirado por retractación en Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:3127]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:1083-8.

15. Artículo sobre el que se ha publicado una fe de erratas

Hamlin JA, Kahn AM. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [se publica una fe de erratas en West J Med 1995;162:278]. West j Med 1995; 162:28-31.

Libros y otras monografías

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver indicaba, incorrectamente, que entre la editorial y la fecha debía ir una coma en vez de punto y coma, como debe ser.)

16. Individuos como autores

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership. skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

17. Directores ("editores"), compiladores como autores

Norinan IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

18. Organización como autor y editorial

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

19. Capítulo de libro

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver prescribía el uso de dos puntos en vez de la letra p antes de las páginas.)

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. En: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

20. Actas de conferencias

Kimura j, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology, Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

21. Artículo presentado en una conferencia

Bengtsson S, Tolheim BG. Enforcement of data protection, privacy

and security in medical informatics. En: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

22. Informe científico o técnico

Publicado por la institución financiadora o patrocinadora: Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSIGOE169200860.

Publicado por la institución ejecutora:

Field MjJ Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

23. Tesis doctoral

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [tesis doctoral]. St. Louis (MO): Washington Univ; 1995.

24. Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, titular. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 jun 25.

Otros trabajos publicados

25. Artículo de periódico

Lee C. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col. 5).

26. Material audiovisual

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassette]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

27. Documentos legales

Ley pública:
Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Proyecto de ley sin sancionar:
Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1 st Sess. (1995).

Código de normas federales:
Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Audiencia:

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nation's Emergency Rooms: Hearings Before the Subcomm. on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm. on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26,1993).

28. Mapa

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [mapa demográfico]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

29. Libro de la Biblia

The Holy Bible. King James version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

30. Diccionarios y obras de consulta semejantes

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p.119-20.

31. Obras clásicas

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

Trabajos inéditos

32. En prensa

(Nota: La NLM prefiere referirse a estos trabajos como «en preparación» [forthcoming] porque no todos se publicarán impresos.)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. En prensa 1996.

Material en soporte electrónico

33. Artículo de revista en formato electrónico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [publicación periódica en línea] 1995 jan-mar [citada 1996 jun 51;1(1):[24 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

34. Monografía en formato electrónico

CDI, clinical dermatology illustrated [monografía en CD-ROM]. Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

35. Fichero de computadora

Hemodynamics 111: the ups and downs of hemodynamics [programa de computadora]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

Cuadros

Mecanografía o imprima cada cuadro a doble espacio y en hoja aparte. No presente los cuadros en forma de impresiones fotográficas. Numérelos consecutivamente siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto, y asigne un título breve a cada uno. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. Las explicaciones irán como notas al pie y no en el encabezamiento. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en cada cuadro. Como llamadas para las notas al pie, utilícense los símbolos siguientes en la secuencia que se indica: *, †, ‡, §, ||, **, ††, ‡‡..

Identifique las medidas estadísticas de variación, tales como la desviación estándar y el error estándar de la media.

No trace líneas horizontales ni verticales en el interior de los cuadros. Cerciórese de que cada cuadro aparezca citado en el texto.

Si incluye datos publicados o inéditos provenientes de otra fuente, obtenga la autorización necesaria para reproducirlos y conceda el reconocimiento cabal que corresponde. Incluir un número excesivo de cuadros en relación con la extensión del texto puede ocasionar dificultades al confeccionar las páginas. Examine varios números recientes de la revista a la que planea presentar el artículo y calcule cuántos cuadros pueden incluirse por cada millar de palabras de texto. Al aceptar un artículo, el director podrá recomendar que los cuadros suplementarios que contienen datos de respaldo importantes, pero que son muy extensos para publicarlos, queden depositados en un servicio de archivo, como el Servicio Nacional de Publicaciones Auxiliares en los Estados Unidos, o que sean proporcionados por los autores a quien lo solicite. En tal caso, se agregará en el texto la nota informativa necesaria. Dichos cuadros se presentarán junto con el artículo para su consideración.

Ilustraciones (figuras)

Envíe los juegos completos de figuras en el número requerido por la revista. Las figuras estarán dibujadas y fotografiadas en forma profesional; no se aceptarán los letreros trazados a mano o con máquina de escribir. En lugar de los dibujos, radiografías y otros materiales de ilustración originales, envíe impresiones fotográficas en blanco y negro, bien contrastadas, en papel satinado y que midan 127 x 173 mm, sin exceder de 203 x 254 mm. Las letras, números y símbolos serán claros y uniformes en todas las ilustraciones; tendrán, además, un tamaño suficiente para que sigan siendo legibles incluso después de la reducción necesaria para publicarlos. Los títulos y las explicaciones detalladas se incluirán en los pies o epígrafes, no sobre las propias ilustraciones.

Al reverso de cada figura pegue una etiqueta de papel que lleve anotados el número de la figura, el nombre del autor y cuál es la parte superior de la misma. No escriba directamente sobre el dorso de las figuras ni las sujete con broches para papel, pues quedan marcadas. Las figuras no se doblarán ni se montarán sobre cartón.

Las fotomicrografías incluirán en sí mismas un indicador de la escala. Los símbolos, flechas y letras usados en estas deberán contrastar claramente con el fondo.

Si se usan fotografías de personas, estas no deberán ser identificables; de lo contrario, habrá que anexar un permiso por escrito para poder utilizarlas.

Las figuras se numerarán en forma consecutiva de acuerdo con su primera mención en el texto. Si la figura ya fue publicada, se reconocerá la fuente original y se presentará la autorización por escrito que el titular de los derechos de autor concede para reproducirla. Este permiso es necesario, independientemente de quién sea el autor o la editorial; la única salvedad son los documentos considerados como de dominio público.

Pies o epígrafes de las ilustraciones

Los pies o epígrafes de las ilustraciones se mecanografiarán o imprimirán a doble espacio, comenzando en hoja aparte e identificándolos con los números arábigos correspondientes. Cuando se utilicen símbolos, flechas, números o letras para referirse a ciertas partes de las ilustraciones, será preciso identificar y aclarar el significado de cada uno en el pie o epígrafe. En las fotomicrografías habrá que explicar la escala y especificar el método de tinción.

Unidades de medida

Las medidas de longitud, talla, *peso* y volumen se expresarán en unidades del sistema métrico decimal (metro, kilogramo, litro, etc.) 0 sus múltiples y submúltiplos.

Las temperaturas se consignarán en grados Celsius. Los valores de presión arterial se indicarán en milímetros de mercurio.

Todos los valores hemáticos y de química clínica se presentarán en unidades del sistema métrico decimal y de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). La redacción de la revista podrá solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores agreguen unidades alternativas o distintas de las del SI.

Abreviaturas y símbolos

Utilice únicamente abreviaturas corrientes. Evite las abreviaturas en el título y el resumen. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura en el texto, irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

Envío del manuscrito a la revista

Envíe por correo el número requerido de copias del manuscrito en un sobre de papel resistente; si es necesario, proteja las copias y las figuras metiéndolas entre dos hojas de cartón para evitar que las fotografías se doblen. Meta las fotografías y transparencias en su propio sobre de papel resistente.

Los manuscritos irán acompañados de una carta de envío firmada por todos los coautores.

Fuerte como un roble.

Ahora tus cereales Kellogg's®
vienen con Forticalcio®,
todas las fortalezas del calcio
para huesos y dientes
sumamente fuertes.



FORTICALCIO® de *Kellogg's®*

Más fortalezas para crecer.
www.kelloggs-latino.com

**En Venezuela y hacia y desde todo el mundo,
en IPOSTEL le ofrecemos**

**SERVICIOS TRADICIONALES de Cartas, Impresos y
Encomiendas.**



... y además contamos con novedosos

SERVICIOS EXPRESOS



A nivel nacional ofrecemos: EEE (Entrega Especial Expresa) es un servicio que le permite enviar documentos y encomiendas a todo el Territorio del país de una forma expresa, económica y segura.



EMS, (Express Mail Service), es un servicio tipo courier que le permite enviar documentos y mercancías a nivel internacional, respondiendo a su necesidad de entrega en tiempo breve y a los precios más económicos del mercado.

SERVICIOS ELECTRONICOS

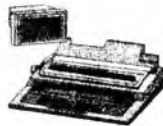
CORREO ELECTRONICO Y KIOSCO INTERNET

Ipostel habilitó para aquellos usuarios que les gusta navegar en el mundo de la red, kioscos de internet, ubicados en Altamira, C.C.C.T y los Ruices, los cuales disponen de computadoras de fácil acceso a todas aquellas personas interesadas en explorar dentro del campo de la comunicación.



AUTOMATIZACION DE TAQUILLA

La automatización de taquillas cuenta con modernos accesorios como balanza electrónica e impresora de recibos; esta permite mejorar la atención en las taquillas postales y simultáneamente establecer un control eléctrico de los ingresos por venta de servicios.



SEGURIDAD Y RASTREO POR CODIGO DE BARRA

El Código de barra permite registrar los datos más importantes de los envíos EMS entrantes y salientes, este sistema actualmente es utilizado a nivel internacional, para envíos EMS.



Un Mundo de Servicios para Usted...

Artes Finales: Amerik Solutions C.A., Caracas, Venezuela
Teléfono (02) 993.81.43

Portada: Chávez & López, Diseño Gráfico, Caracas, Venezuela
Teléfono (02) 285.55.29

Impresión: Editorial Texto C.A., Caracas, Venezuela
Teléfonos: (02) 632.97.17 - 632.74.86