

# Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Organo Oficial de la  
Sociedad Latinoamericana de Nutrición

---

VOL 59

MARZO 2009

Nº 1

---

## Contenido

Páginas

<b>EDITORIAL</b> .....	5
<b>TRABAJOS DE INVESTIGACION</b>	
<b>Nutrición y Obesidad</b>	
<b>Evolución y calidad de la alimentación de mujeres con obesidad severa y mórbida sometidas a bypass gástrico</b> <i>Annabella Rebolledo, Karen Basfi-fer, Pamela Rojas, Juana Codoceo, Jorge Inostroza, Fernando Carrasco, Manuel Ruz</i> .....	7
<b>Calcium intake and its relationship with risk of overweight and obesity in adolescents</b> <i>Tamara Beres Lederer Goldberg, Carla Cristiane da Silva, Luciana Natal Lopes Peres, Marina Nogueira Berbel, Márcia Braz Heigasi, Josy Maria Cabral Ribeiro, Karina Suzuki, Liene Mílcia Aparecida Josué, José Carlos Dalmas</i> .....	14
<b>Fatores socioeconômicos associados ao excesso de peso em população de baixa renda do Nordeste brasileiro</b> <i>Janine Maciel Barbosa, Poliana Coelho Cabral, Pedro Israel Cabral de Lira, Telma Maria de Menezes Toledo Florêncio</i> .....	22
<b>Estado nutricional de preescolares asistentes a la Junta Nacional de Jardines Infantiles de Chile: evaluación de la concordancia entre indicadores antropométricos de obesidad y obesidad central</b> <i>Yareni Gutiérrez-Gómez, Juliana Kain, Ricardo Uauy, Marcos Galván, Camila Corvalán</i> .....	30

## Nutrición y Tercera Edad

- Estado nutricional de la población mayor de Cataluña de diferentes niveles asistenciales**  
*Pilar Jürschik Jiménez, Joan Torres Puig-gros, Román Solá Martí, Carmen Nuin Órreo, Teresa Botigué Satorra .* 38

## Bioquímica Nutricional

- Increase in digestive organs of rats due to the ingestion of dietary fiber with similar solubility to that of common bean**  
*Telma Angelina Faraldo Corrêa, Soely Maria Pissini Machado Reis and Admar Costa de Oliveira* ..... 47

- Associação entre medidas de adiposidade, variáveis demográficas e bioquímicas com os níveis séricos de proteína C-reativa em população rural**  
*Amanda Carla Fernandes, Andrea Gazzinelli, Gustavo Velásquez-Meléndez* ..... 54

## Leche Materna. Composición

- Acidos grasos de la leche materna madura de mujeres venezolanas de estratos socioeconómicos bajos: Influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento**  
*Virgilio Bosch, Iván Golfetto, Hilda Alonso, Zuly Laurentin, Mercedes Materan y Ninoska García* ..... 61

## Microbiología de Alimentos

- Caracterización de cepas de *Listeria monocytogenes* realizados a partir de queso fresco proveniente de diferentes zonas productoras costarricenses**  
*Carolina Chaves y María Laura Arias* ..... 66

## Ciencia de Alimentos

- Desarrollo y transferencia tecnológica de pastas funcionales extendidas con leguminosas**  
*Marisela Granito, Vanesa Ascanio* ..... 71

- Avaliação de diferentes métodos de extração lipídica sobre a composição de ácidos graxos poliinsaturados em leite de vaca**  
*Ivane Benedetti Tonial, Makoto Matsushita, Nilson Evelázio de Souza, João Ângelo de Lima Perini, Damila Rodrigues de Moraes, Fernanda Araújo Bani, Jesuí Vergílio Visentainer* ..... 78

## LatinFood. Composición de Alimentos

- Contenido de aceite, ácidos grasos y escualeno en variedades crudas y procesadas de grano de amaranto**  
*Brenda Rodas, Ricardo Bressani* ..... 82

- Chemical characterization, antioxidant properties, and volatile constituents of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) cultivated in Costa Rica**  
*Óscar Acosta, Ana M. Pérez, Fabrice Vaillant* ..... 88

- Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos**  
*Olga N. Campas-Baypoli, Carolina Bueno-Solano, Diana M. Martínez-Ibarra, Francisco Camacho-Gil, Alma G. Villa-Lerma, Jesús R. Rodríguez-Núñez, Jaime López-Cervantes, Dalia I. Sánchez-Machado* ..... 95

- Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars**  
*Francilene Gracieli Kunradi Vieira, Graciele da Silva Campelo Borges, Cristiane Copetti, Luciano Valdemiro Gonzaga, Eduardo da Costa Nunes, Roseane Fett* ..... 101

- INFORMACION PARA LOS AUTORES** ..... 107

# Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the  
Latin American Society of Nutrition

---

VOL 59

MARCH 2009

Nº 1

---

## Contents

Pages

<b>EDITORIAL</b> .....	5
<b>RESEARCH PAPERS</b>	
<b>Nutrition and Obesity</b>	
<b>Evolution and quality of the diet of women with severe and morbid obesity undergoing gastric bypass</b> <i>Annabella Rebolledo, Karen Basfi-fer, Pamela Rojas, Juana Codoceo, Jorge Inostroza,</i> <i>Fernando Carrasco, Manuel Ruz</i> .....	7
<b>Calcium intake and its relationship with risk of overweight and obesity in adolescents</b> <i>Tamara Beres Lederer Goldberg, Carla Cristiane da Silva, Luciana Natal Lopes Peres, Marina Nogueira Berbel,</i> <i>Márcia Braz Heigasi, Josy Maria Cabral Ribeiro, Karina Suzuki, Liene Mílcia Aparecida Josué,</i> <i>José Carlos Dalmas</i> .....	14
<b>Socioeconomic factors associated with overweight in a low-income population of Northeast Brazil</b> <i>Janine Maciel Barbosa, Poliana Coelho Cabral, Pedro Israel Cabral de Lira,</i> <i>Telma Maria de Menezes Toledo Florêncio</i> .....	22
<b>Nutritional status of preschool children attending the Chilean National Nursery Schools Council Programs (JUNJI): assessment of the agreement among anthropometric indicators of obesity and central obesity</b> <i>Yareni Gutiérrez-Gómez, Juliana Kain, Ricardo Uauy, Marcos Galván, Camila Corvalán</i> .....	30

## Nutrition and the Elderly

### Nutritional status of Catalonia's elderly people with different health care needs

*Pilar Jürschik Jiménez, Joan Torres Puig-gros, Román Solá Martí, Carmen Nuin Órreo, Teresa Botigué Satorra .* 38

## Nutritional Biochemistry

### Increase in digestive organs of rats due to the ingestion of dietary fiber with similar solubility to that of common bean

*Telma Angelina Faraldo Corrêa, Soely Maria Pissini Machado Reis and Admar Costa de Oliveira* ..... 47

### Association between adiposity measures, demographic and biochemical variables with C-reactive protein serum levels in rural population

*Amanda Carla Fernandes, Andrea Gazzinelli, Gustavo Velásquez-Meléndez* ..... 54

## Mother's milk. Composition

### Fatty acids in mature breast milk from low socioeconomic levels of Venezuelan women: influence of temperature and time of storage

*Virgilio Bosch, Iván Golfetto, Hilda Alonso, Zuly Laurentin, Mercedes Materan and Ninoska García* ..... 61

## Food Microbiology

### Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from raw cheese samples acquired from different Costa Rican producer zones

*Carolina Chaves and María Laura Arias* ..... 66

## Food Science

### Development and technological transfer of functional pastas extended with legumes

*Marisela Granito, Vanesa Ascanio* ..... 71

### Different lipid extraction methods on fatty acids composition in cow milk

*Ivane Benedetti Tonial, Makoto Matsushita, Nilson Evelázio de Souza, João Ângelo de Lima Perini, Damila Rodrigues de Moraes, Fernanda Araújo Bani, Jesuí Vergílio Visentainer* ..... 78

## LatinFood. Food Composition

### The oil, fatty acid and squalene content of varieties of raw and processed grain amaranth

*Brenda Rodas, Ricardo Bressani* ..... 82

### Chemical characterization, antioxidant properties, and volatile constituents of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) cultivated in Costa Rica

*Óscar Acosta, Ana M. Pérez, Fabrice Vaillant* ..... 88

### Sulforaphane (*1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)-butane*) content in cruciferous vegetables

*Olga N. Campas-Baypoli, Carolina Bueno-Solano, Diana M. Martínez-Ibarra, Francisco Camacho-Gil, Alma G. Villa-Lerma, Jesús R. Rodríguez-Núñez, Jaime López-Cervantes, Dalia I. Sánchez-Machado* ..... 95

### Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars

*Francilene Gracieli Kunradi Vieira, Graciele da Silva Campelo Borges, Cristiane Copetti, Luciano Valdemiro Gonzaga, Eduardo da Costa Nunes, Roseane Fett* ..... 101

**INFORMATION FOR AUTHORS** ..... 107

## EDITORIAL

### Ser Editor General

Sí, ser Editor General es un gran honor. Efectivamente lo es y así lo siento y expreso. Pero también es una gran responsabilidad. ¿Que es una labor de equipo, suerte de “team work” ? Es cierto. Pero no lo es menos que la primera mirada al manuscrito que llega para considerar su publicación, generalmente por Internet o algunas veces por correo postal, le corresponde al Editor General, quien debe decidir el paso inmediato. Aquí se presentan 2 escenarios: **Escenario 1.** Ya de entrada, se aprecia que el manuscrito es ajeno a los tópicos cubiertos por la revista. Puede tratarse de una revisión escasamente novedosa o leemos un artículo de interés puramente local, algunas veces repetitivo y de limitada o ninguna aplicación o utilidad fuera de los lugares estudiados. El manuscrito no es para la revista. Llegado a este punto, se debe informar al autor con una exposición de motivos cortés, convincente y absoluta sobre la no aceptación del manuscrito. En caso de dudas, el Editor General consulta al Comité Editorial. Veamos ahora el **Escenario 2.** El manuscrito se encuentra dentro de los lineamientos temáticos asistidos por ALAN, es pertinente a la revista y cumple con el estilo editorial exigido. Grata y estimulante situación, el manuscrito ingresará ahora al proceso editorial. Le corresponde al Editor General motorizar y asignar la revisión según el tema que se expone. De allí el proceso depende de la disponibilidad, tiempo y buena disposición del Arbitro... y del correo electrónico, instrumento brujo y caprichoso que no siempre nos apoya con la rapidez y confiabilidad esperada.

Aquí deseo detenerme y compartir algunos comentarios. El año pasado recibimos un promedio de 17 manuscritos mensuales. Excelente nueva. Pero...veamos la situación realmente. Si asumimos que 8 de esos trabajos entran en el Escenario 1 y que de los 9 restantes, 4 son rechazados por los

Arbitros, tenemos a la disposición 5 manuscritos aceptados por mes, es decir 60 al año, lo cual permitiría publicar 15 manuscritos por Número, cifra mas que razonable. ¿Podemos o debiéramos incluir mas de 15 trabajos por Número? O incluso ¿Publicar una edición extra de la revista, dada la afluencia de manuscritos ? Es posible pero no mientras una buena parte de los manuscritos recibidos califiquen en el Escenario 1.

Debe destacarse que Archivos Latinoamericanos de Nutrición cubre revisiones científicas críticas sobre temas de actualidad, solicitados expresamente por el Editor o por el Comité Editorial, trabajos de investigación originales, temas específicos en nutrición aplicada, resultados analíticos de programas de intervención y discusión de recomendaciones de aplicación práctica, tecnología y ciencia de alimentos y su sección específica composición de alimentos. Al final de cada Número se publica la Información para los Autores, la cual aparentemente es poco conocida o leída superficialmente. El estudiante graduado, el tesista aventajado, el investigador dedicado y el profesor con trayectoria y experiencia, deben ajustarse a la cobertura de la revista y conocer el estilo editorial de ALAN antes de enviar el manuscrito.

Queremos destacar la sección Composición de Alimentos, LatinFoods, la cual se constituyó como esencial dentro del contenido de ALAN hace ya algunos Congresos de Nutrición de la SLAN, destinada a divulgar la composición de los alimentos y temas relacionados y tiene prioridad en cuanto a su revisión y publicación. Bienvenidos los trabajos vinculados con todos estos aspectos...y ajustados a las exigencias de ALAN.

José Félix Chávez Pérez  
Editor General.

## Evolución y calidad de la alimentación de mujeres con obesidad severa y mórbida sometidas a bypass gástrico

*Annabella Rebolledo, Karen Basfi-fer, Pamela Rojas, Juana Codoceo, Jorge Inostroza, Fernando Carrasco, Manuel Ruz*

Departamento de Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile, Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

**RESUMEN.** El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios en la ingesta energética y nutrientes y el grado de suficiencia de la alimentación en pacientes sometidos a bypass gástrico. En 44 mujeres con obesidad severa y mórbida se estudió la alimentación previa y a los 6, 12 y 18 meses después de realizada la intervención quirúrgica mediante encuesta de registro de tres días. El consumo de suplementos de vitaminas y minerales se controló estrictamente mediante el registro individualizado de su consumo. Con la excepción de la ingesta de calcio y vitamina A, el consumo de energía y nutrientes fue significativamente menor a los 6, 12 y 18 meses post cirugía comparado con el período preoperatorio. La ingesta dietética de calcio, hierro, zinc, cobre, ácido fólico, vitamina C y vitamina E estuvo por debajo del 100% de adecuación a partir del 6º mes post operatorio, situación que se revierte al considerar el consumo de estos nutrientes a partir de los suplementos. Aun cuando se observó una tendencia a una curva en "U" en la ingesta de micronutrientes durante el período experimental, en la mayoría de ellos las diferencias entre los valores obtenidos a los meses 12 y 18 no fue significativa. En conclusión, estos pacientes presentan reducciones importantes de la ingesta dietética de energía y micronutrientes. El consumo rutinario de suplementos podría revertir esta situación, sin embargo, las alteraciones anatómicas inherentes a esta intervención podrían producir que cifras de adecuación ligeramente superiores al 100% sean, en la práctica, insuficientes para asegurar que no se desarrollen cuadros de deficiencia.

**Palabras clave:** Bypass gástrico, obesidad, adecuación dietética, minerales, vitaminas.

### INTRODUCCION

La obesidad en todos sus grados, desde leve a mórbida, representa un problema de creciente magnitud y sus tasas de prevalencia han aumentado en forma explosiva en los últimos años (1, 2). Esta patología se asocia a un aumento en la morbilidad por diabetes tipo 2, dislipidemia, resistencia a la insulina, apnea del sueño, colestiasis, cardiopatía coronaria e hipertensión arterial, entre otras (3,4).

La cirugía bariátrica es considerada como el método más efectivo para inducir una pérdida de peso importante y

**SUMMARY. Evolution and quality of the diet of women with severe and morbid obesity undergoing gastric bypass.** The objective of this study was to evaluate the changes of dietary intake and quality of the diet in patients undergoing gastric bypass. In forty-four women with severe and morbid obesity it was assessed their nutrient intakes before and 6, 12, and 18 months after gastric bypass by using three-day food records. Vitamin and mineral intakes from supplements were strictly controlled though personalized records. With the exceptions of calcium and vitamin A, energy and nutrient intakes were significantly decreased at 6, 12, and 18 month after bypass compared to the pre-surgery period. Dietary intakes of calcium, iron, zinc, copper, folic acid, vitamin C, and vitamin E were below 100% of adequacy from the 6<sup>th</sup> month after the surgery and thereafter. This situation is reverted when nutrient intakes supplied by supplements are taken into account. Although a "U" shape trend was observed in the nutrient intakes results during the experimental period, in most cases the differences between the observed values at month 12 and 18 were not significant. In conclusion, these patients had important reductions of their energy and nutrient intakes as result of gastric bypass. Routine supplements may correct this situation, nevertheless, the anatomical alterations inherent to this type of surgery may cause that total nutrient intakes reaching adequacy values slightly above 100%, may not necessarily be able to avoid the development of nutritional deficiencies.

**Key words:** Gastric bypass, obesity, dietary adequacy, minerals, vitamins.

mantenida en el largo plazo en pacientes con obesidad severa y mórbida, siendo la gastroplastía con bypass gástrico una de las técnicas más usadas en la actualidad (5,6). Las modificaciones anatómicas producidas por este tipo de cirugía, tales como el bypass del duodeno y la reducción del tamaño de estómago producen importantes consecuencias funcionales. Por una parte los alimentos solo pueden ser consumidos en pequeños volúmenes, los cuales a su vez, tienen contacto con una cantidad muy reducida de jugo gástrico, por otra parte, se disminuye notablemente la superficie disponible para la absorción de nutrientes. Además, al producirse la mezcla de alimentos con las enzimas pancreáticas y secreción biliar en forma más distal en el yeyuno, se favorece el proceso de malabsorción, lo cual se

manifiesta por la ocurrencia de cuadros de diarrea. Además es frecuente la aparición de síntomas de hipoglicemia por hipersecreción de insulina debido a la llegada rápida de hidratos de carbono refinados al yeyuno, lo cual obliga a evitar la ingesta excesiva de azúcares (7-10). Se ha observado también una menor tolerancia a determinadas fuentes proteicas, especialmente carnes rojas (11). Debido a estos factores, el consumo de alimentos se modifica en cantidad y calidad aumentando el riesgo de deficiencia de micronutrientes.

Con el propósito de evaluar los cambios en la ingesta energía y nutrientes y el grado de suficiencia de la alimentación de mujeres sometidas a bypass gástrico se estudió su alimentación previa y a los 6, 12 y 18 meses después de realizada la intervención quirúrgica.

## MATERIAL Y METODOS

### Sujetos

El grupo estudiado correspondió a 44 mujeres de edades entre los 18 y 55 años con obesidad severa o mórbida con indicación de bypass gástrico de acuerdo a los criterios establecidos en el consenso del Panel de cirugía gastrointestinal para la obesidad severa del NIH (12). Las características generales de las pacientes estudiadas se presentan en Tabla 1. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

TABLA 1

Características generales de las mujeres estudiadas (n= 44)

	Promedio $\pm$ DS	Rango
Edad (años)	35.0 $\pm$ 9.98	18 - 55
Peso (kg)	115.6 $\pm$ 15.2	89.7 - 156.4
Talla (cm)	159.0 $\pm$ 7.6	143 - 180
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	45.1 $\pm$ 4.3	38.9 - 56.2
GER (kcal)	1900 $\pm$ 285	1460 - 2849

### Procedimiento quirúrgico

Los detalles de la cirugía realizada se describen en el artículo de Csendes y cols (13). Brevemente, corresponde a una gastrectomía subtotal (95% con sección vertical del estómago), y gastroyeyunoanastomosis término-lateral (stappler circular n° 25), con asa en Y de Roux de 150 cm de longitud.

### Diseño experimental

El estudio es del tipo experimental y longitudinal. Todas las pacientes, siguieron el protocolo de rutina establecido por el Hospital Clínico de la Universidad de Chile para el manejo alimentario post quirúrgico de este tipo de pacientes. Fueron debidamente instruidas por profesionales especialistas en nutrición, acerca de las pautas de alimentación que debían

seguir después de la operación. Estas pautas se describen en Tabla 2. Las pacientes recibieron además distintos suplementos de vitaminas y minerales. El rango de ingesta diario de micronutrientes a través de este mecanismo fue el siguiente: calcio 640 - 1000 mg, zinc 7.5 - 15 mg, hierro 0 - 18 mg, cobre 0.9 - 1 mg, selenio 15 - 55 ug, manganeso 1.5 mg, ácido fólico 400 ug, vitamina A 200 ug como retinol,  $\beta$ -caroteno 3 mg, vitamina E 200 mg, vitamina D 250 - 800 UI y vitamina C 100 - 250 mg.

TABLA 2

Pauta dietética para pacientes sometidos a bypass gástrico, Hospital Clínico de la Universidad de Chile

- 1° mes: 800 - 900 kcal, 60 - 80 g de proteínas. Dieta licuada y fraccionada cada 2 h / 7 veces/día, 1500 mL de líquido.
- 2° - 5° mes: 900 - 1000 kcal, 60 - 80 g de proteínas, 4 comidas, 1-2 colaciones, fraccionamiento cada 4 h, consistencia sólida, exclusión de azúcares, fibra, hollejos, granos, pepas.
- 6° mes en adelante: 100-1200 kcal. Normal. Restricción de azúcares logros de peso objetivo.

El primer control médico posterior a la cirugía ocurre luego de un mes de realizada la operación, luego se repite al tercer y sexto mes y de ahí en adelante cada seis meses. En cada uno de estos controles ante la existencia de evidencia o sospecha de la aparición de signos compatibles con la deficiencia de hierro o zinc, se prescribían suplementos adicionales de estos nutrientes en dosis terapéuticas. El consumo de suplementos se controló estrictamente caso a caso mediante el registro individualizado de su consumo. Este procedimiento permitió además conocer el grado de adherencia a los tratamientos indicados al comparar el número de comprimidos consumidos con lo programado.

### Determinaciones

#### Alimentación

Se determinó el consumo de alimentos, mediante una encuesta alimentaria de Registro diario de tres días, con una adecuada representación de los días de la semana (14), la cual fue aplicada por una profesional Nutricionista. Se registró la alimentación durante la semana previa a la operación y a los 6, 12 y 18 meses posteriores a la operación. Se calculó el aporte de energía y nutrientes de la dieta mediante el uso del programa computacional Food Processor 2 (Food Processor II®, ESHA Research, Salem, OR, USA), el cual utiliza una base de datos de composición de alimentos chilenos y norteamericanos (15).

En orden a determinar las necesidades de energía se evaluó el gasto de energía en reposo (GER) a través de calorimetría indirecta en un equipo Deltatrac® (Datex Inst. Corp., Helsinki, Finland). El GER se multiplicó por un factor de actividad de

1.3 correspondiente a una actividad sedentaria (16).

Para estimar la suficiencia o adecuación de la alimentación se determinaron los siguientes indicadores:

- Porcentaje de adecuación de energía consumida en relación a la recomendada por FAO/OMS/UNU (16).
- Porcentaje de adecuación proteica, utilizándose como valor de ingesta recomendada 1.5 g/kg/ peso ideal, según el Consenso sobre cirugía bariátrica del año 2004 (17).
- Porcentaje de calorías proteicas (P %), grasas (G %) y de carbohidratos (CHO %).
- Porcentaje de adecuación del consumo de calcio, hierro, zinc, selenio, ácido fólico, vitamina C, vitamina E y vitamina A, en relación a las recomendaciones sugeridas por el Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (18-20).

### Antropometría

En condiciones estandarizadas se midió el peso (kg) utilizando una balanza digital SECA® (Vogel & Halke GMBH & Co Alemania) con una sensibilidad de 100 g, y talla (m) con un estadiómetro adosado a la balanza con una variación de 0.1 cm. Las mediciones se efectuaron por un examinador experto durante la semana previa a la cirugía y a los 6, 12 y 18 meses después de la operación. Con estas determinaciones se calculó el índice de masa corporal (IMC). Se consideró Obesidad severa a un valor de IMC entre 35 y 39.9 kg/m<sup>2</sup> y Obesidad mórbida a un valor = 40 kg/m<sup>2</sup>.

### Análisis estadístico

Para el análisis de resultados, se calcularon promedios y desviaciones estándar. Para la comparación de resultados durante el estudio se realizó Análisis de Varianza de Muestras Repetidas seguido del test de Bonferroni. Se consideró como significativo un valor de probabilidad de <0.05 (21). Se utilizó el programa estadístico SPSS 10.0® (SPSS Inc, Chicago IL, USA).

## RESULTADOS

Las características generales del grupo previo a la intervención quirúrgica se muestran en Tabla 1. Cabe destacar que el 13.3 % de los sujetos presentaba un IMC considerado como obesidad severa y el 86.7% restante obesidad mórbida.

La adherencia al estudio, determinada como el porcentaje de comprimidos de vitaminas y minerales consumidos comparado con lo programado (1 comprimido/d) fue de 81.1% en el período mes 0 – mes 6, 86.6% en el lapso mes 6 – mes 12 y 83.6% en el período mes 12- mes 18.

En Tabla 3 se presenta la evolución de la ingesta de energía y nutrientes durante el estudio. Se observa que en general, la mayor reducción del consumo de energía y nutrientes se produce a los 6 meses post cirugía, alcanzando un plateau al mes 12. Al mes 18 se aprecia una ligera tendencia, no significativa en la mayoría de los casos, al aumento del consumo en relación al mes 12. Las excepciones las constituyen las ingestas de vitamina C donde no se producen modificaciones significativas y vitamina A, cuya reducción mas importante se observa al mes 12 después del bypass gástrico.

TABLA 3

Evolución de la ingesta de energía y nutrientes durante el estudio (Promedio ± DS)

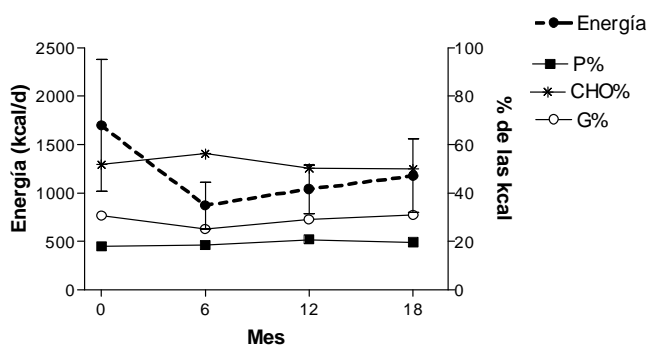
Nutrientes	Mes 0	Mes 6	Mes 12	Mes 18	p*
Energía (kcal)	1697 ± 681 <sup>a</sup>	870 ± 243 <sup>c</sup>	1037 ± 250 <sup>b</sup>	1176 ± 381 <sup>b</sup>	0.000
Proteínas (g)	70.7 ± 23.5 <sup>a</sup>	42.9 ± 16.6 <sup>c</sup>	48.1 ± 11.5 <sup>bc</sup>	54.5 ± 19.3 <sup>b</sup>	0.000
Carbohidratos (g)	230 ± 104 <sup>a</sup>	112 ± 35.3 <sup>b</sup>	135 ± 41.0 <sup>c</sup>	153 ± 57.3 <sup>c</sup>	0.000
Fibra dietaria (g)	13.7 ± 5.6 <sup>a</sup>	9.1 ± 4.2 <sup>b</sup>	10.1 ± 4.3 <sup>b</sup>	11.6 ± 6.2 <sup>ab</sup>	0.000
Grasa total (g)	55.4 ± 26.6 <sup>a</sup>	28.6 ± 12.1 <sup>b</sup>	34.4 ± 11.6 <sup>c</sup>	38.4 ± 14.7 <sup>c</sup>	0.000
Colesterol (mg)	209 ± 115 <sup>a</sup>	128 ± 76.6 <sup>b</sup>	140 ± 73.2 <sup>c</sup>	162 ± 82.9 <sup>c</sup>	0.004
Vitamina A (µg)	841 ± 972 <sup>a</sup>	857 ± 2145 <sup>a</sup>	419 ± 242 <sup>b</sup>	542 ± 363 <sup>ab</sup>	0.007
Vitamina B1 (mg)	11.2 ± 5.9 <sup>a</sup>	3.9 ± 2.6 <sup>b</sup>	5.5 ± 3.9 <sup>c</sup>	4.7 ± 4.4 <sup>bc</sup>	0.000
Vitamina B2 (mg)	1.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.4 <sup>c</sup>	1.3 ± 0.4 <sup>c</sup>	0.000
Niacina (mg)	34.5 ± 12.9 <sup>a</sup>	14.9 ± 95.7 <sup>b</sup>	19.4 ± 8.8 <sup>c</sup>	19.8 ± 9.2 <sup>c</sup>	0.000
Vitamina B 6 (mg)	3.1 ± 10.6 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.3 <sup>ab</sup>	8.8 ± 49.9 <sup>ab</sup>	0.045
Vitamina B 12 (µg)	6.8 ± 16.1 <sup>a</sup>	2.0 ± 1.1 <sup>b</sup>	2.5 ± 1.7 <sup>ab</sup>	3.5 ± 4.0 <sup>ab</sup>	0.030
Folato (µg)	471 ± 170 <sup>a</sup>	203 ± 273 <sup>b</sup>	265 ± 121 <sup>c</sup>	250 ± 132 <sup>bc</sup>	0.000
Vitamina C (mg)	75.9 ± 54.0	57.8 ± 43.8	59 ± 39.2	57.2 ± 37.6	0.17
Vitamina E (mg)	11.5 ± 7.1 <sup>a</sup>	6.0 ± 3.3 <sup>b</sup>	7.0 ± 3.0 <sup>b</sup>	7.8 ± 3.5 <sup>b</sup>	0.000
Calcio (mg)	519 ± 276 <sup>a</sup>	374 ± 219 <sup>b</sup>	447 ± 236 <sup>ab</sup>	420 ± 248 <sup>ab</sup>	0.046
Cobre (mg)	1.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.2 <sup>c</sup>	0.9 ± 0.4 <sup>c</sup>	0.000
Hierro (mg)	9.7 ± 5.4 <sup>a</sup>	5.6 ± 2.8 <sup>b</sup>	6.3 ± 2.0 <sup>b</sup>	8.5 ± 4.3 <sup>a</sup>	0.000
Selenio (µg)	105 ± 42.7 <sup>a</sup>	53.3 ± 22.6 <sup>b</sup>	66.8 ± 24.9 <sup>b</sup>	78.4 ± 27.3 <sup>a</sup>	0.000
Zinc (mg)	9.5 ± 3.8 <sup>a</sup>	5.3 ± 2.2 <sup>b</sup>	6.0 ± 1.8 <sup>bc</sup>	7.2 ± 3.0 <sup>c</sup>	0.000

p según ANOVA de muestras repetidas. Promedios con distinto superíndice en la misma fila son estadísticamente diferentes (p<0.05 según test de Bonferroni).

En los cuatro tiempos de estudio el consumo de energía fue menor respecto a las necesidades (calculadas como GER x factor de actividad), situación concordante con las pautas dietéticas sugeridas por los especialistas que buscan promover la baja de peso de pacientes con obesidad. En cuanto a ingesta de proteínas, la adecuación también es baja, mejorando ligeramente a los 18 meses alcanzando en este período solo un 67% de adecuación. En Figura 1 se observa que si bien la ingesta de energía varía significativamente posterior a la cirugía, la composición de la molécula calórica es muy estable en el tiempo, con rangos de G% de 28.5 - 29, P% de 17.4 - 19.8 y CHO% de 51.2 - 53.3.

FIGURA 1

Ingesta de energía y porcentaje de las calorías provenientes de proteínas (P%), hidratos de carbono (CHO%) y grasa (G%) en mujeres obesas antes y a los 6, 12 y 18 meses de ser sometidas a bypass gástrico



\* Los valores de energía corresponden a promedio  $\pm$  DS. Los valores de P%, CHO% y G% corresponden a promedio.

Al examinar la baja de peso en relación a la ingesta de energía, no se observaron diferencias significativas entre las mujeres que alcanzaron el objetivo de bajar como mínimo un 50% del peso previo a la operación, en relación a aquellas que no lo lograron (datos no mostrados). Para analizar la baja de peso a los 18 meses en relación con la edad, el grupo fue subdividido en tres tercios en una relación aproximada de 1:2:1, destacando que el grupo de mayor edad baja significativamente menos de peso que los otros grupos (Tabla 4). Esta magnitud de baja de peso no se relaciona ni con metabolismo en reposo, que es muy similar al grupo de 30 - 41 años, ni con la ingesta de energía, la cual es incluso ligeramente superior al resto.

Las Figuras 2 y 3 muestran los resultados de la adecuación de las ingestas de minerales y vitaminas de la dieta exclusivamente, y de la dieta más suplementos en relación a las ingestas recomendadas. Se aprecia que la adecuación de las ingestas de calcio y hierro provenientes de la dieta es

cercana al 50% en todas las evaluaciones. Esta situación solo se corrige a partir del período mes 6-mes 12 en virtud de la contribución de los suplementos. La ingesta de selenio proveniente de la dieta es apropiada en los 4 tiempos de observación, el aporte del selenio desde los suplementos prácticamente duplica la contribución de la dieta. La adecuación de la ingesta dietética de zinc y cobre fue ligeramente superior el 100% antes de la operación, cayendo bajo este límite en el resto de las evaluaciones, situación que es revertida, alcanzando incluso cifras cercanas al 200% de adecuación a los 12 y 18 meses como consecuencia del aporte desde los suplementos.

TABLA 4

Comparación de ingesta de energía, GER y % de baja de peso según grupo de edad a los 18 meses post cirugía (Promedio  $\pm$  DS)

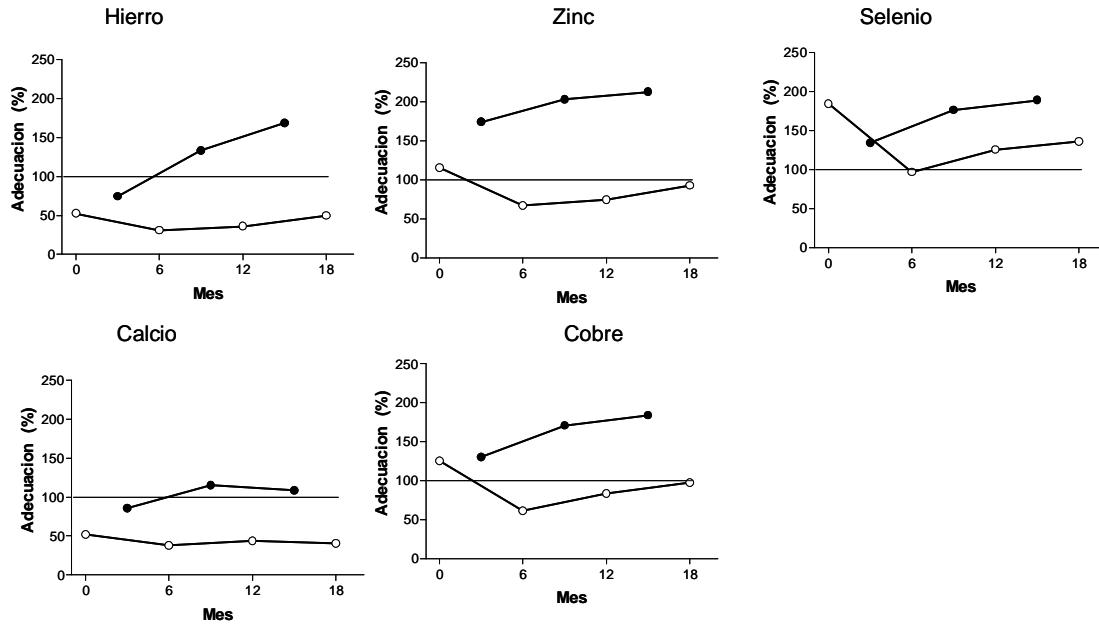
Grupo	Ingesta (kcal)	GER (kcal/d)	% baja de peso
18 -29 años (n= 13)	1181 $\pm$ 360	1612 $\pm$ 272 <sup>a</sup>	36.8 $\pm$ 7.8 <sup>a</sup>
30 - 41 años (n=20)	1092 $\pm$ 355	1378 $\pm$ 131 <sup>b</sup>	38.3 $\pm$ 8.9 <sup>a</sup>
= 42 años (n=11)	1344 $\pm$ 435	1348 $\pm$ 223 <sup>b</sup>	29.1 $\pm$ 6.1 <sup>b</sup>
p*	N. S.	0.01	0.01

p según ANOVA de una vía. Promedios con distinto superíndice en la misma columna son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$  según test de Bonferroni).

En la Figura 3 llama la atención que a partir del sexto mes la adecuación de vitamina A total (vitamina dietética mas suplemento) se reduce significativamente ( $p < 0.02$ ) sin alcanzar una cifra apropiada durante el resto del estudio. La vitamina C proveniente de la dieta es insuficiente durante todo el período posterior a la operación, pero mejora significativamente su adecuación al considerar la cantidad aportada por el suplemento, superando el 250% en el período de 6 a 18 meses. En cuanto a ácido fólico de la dieta, la adecuación previa a la cirugía es apropiada, pero que llega a niveles cercanos al 50% a partir del sexto mes. El aporte de los suplementos permite corregir esta situación. Con respecto a vitamina E tanto antes como posterior a la operación su ingesta esta levemente bajo las recomendaciones, incrementándose notablemente con la contribución de los suplementos que contienen un aporte considerable de este nutriente.

FIGURA 2

Adecuación de la ingesta de minerales desde la dieta\* y desde la dieta mas suplementos\*\* en mujeres obesas antes y después de 6, 12 y 18 meses de ser sometidas a bypass gástrico

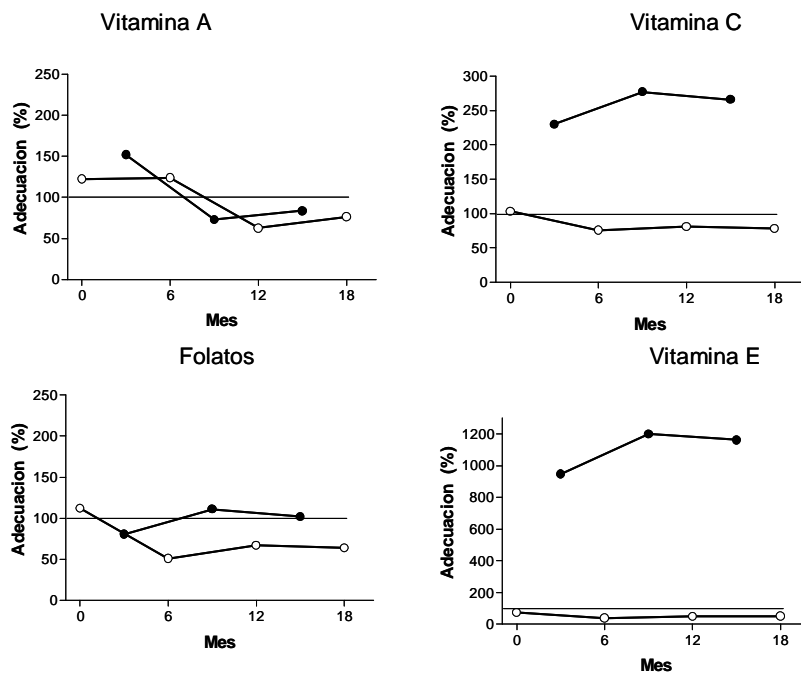


\* Adecuación de la ingesta de la dieta exclusivamente (círculos abiertos).

\*\* Adecuación de la ingesta de la dieta mas suplementos (círculos completos), este valor corresponde al promedio del período.

FIGURA 3

Adecuación de la ingesta de vitaminas desde la dieta\* y desde la dieta mas suplementos\*\* en mujeres obesas antes y después de 6, 12 y 18 meses de ser sometidas a bypass gástrico



\* Adecuación de la ingesta de la dieta exclusivamente.

\*\* Adecuación de la ingesta de la dieta mas suplementos, este valor corresponde al promedio del período.

## DISCUSION

Parte de los objetivos primarios del bypass gástrico en obesidad severa y mórbida es reducir en forma importante el consumo de energía, lo cual fue corroborado en el presente estudio. Si bien el aporte de energía se disminuyó notablemente después de la cirugía, la distribución de la molécula calórica sin embargo, se mantuvo constante y dentro de los rangos recomendados.

Llama la atención la baja adecuación de proteínas a las recomendaciones sugeridas para este tipo de pacientes (9,17), la cual se mantiene bajo incluso hasta a los 18 meses post cirugía, donde solo alcanza el 67%. Esta situación se puede deber en parte a la baja tolerancia a las carnes, en especial de las carnes rojas (11). Otro factor que podría estar incidiendo en estos resultados es el bajo consumo de lácteos, que se ve reflejado por el bajo aporte de calcio que presentan las dietas.

En general, las ingestas dietéticas de energía y nutrientes son relativamente similares a los meses 12 y 18 posterior a la cirugía, lo que sugiere que al año de realizado el bypass ya se han estabilizados los hábitos alimentarios. Una segunda mirada a esta información sin embargo, permite apreciar que al mes 18 comienza a manifestarse una tendencia hacia un ligero incremento en el consumo de alimentos. Aun cuando tal tendencia no alcanza la significación estadística en nuestro estudio, es una llamada de atención y justifica la realización de estudios de esta naturaleza pero por períodos más prolongados.

La baja adecuación de macro y micronutrientes en los diferentes períodos estudiados no es un resultado inesperado, ya que se ha demostrado que dietas que presentan una gran restricción de energía (= 800 kcal/ día) tienen una baja densidad de nutrientes (22-24). Por otra parte, se suman a estos bajos aportes de las dietas, las modificaciones anatómicas producidas por la operación y sus consecuencias funcionales, como son la mala absorción y las intolerancias alimentarias (9-11), lo que respalda categóricamente el aporte extra de nutrientes, el nivel al cual estos deben proporcionarse es aún materia de debate. En nuestro estudio el aporte promedio de los suplementos usados logra superar las correspondientes cifras de recomendaciones de aportes para la mayoría de los micronutrientes, con la sola excepción de la vitamina A. Por otra parte, el alto aporte de vitamina E se debe especialmente a la cantidad entregada a través de los suplementos, lo cual hace que la ingesta total sea inusualmente elevada, pero por debajo de los valores de Ingestas Máximas Tolerables propuesta por el Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (20).

Un aspecto de la mayor importancia es que las cifras de ingesta recomendada se han elaborado para individuos sanos (16,18-20). Los sujetos estudiados aquí sin embargo, presentan una significativa alteración anatómica del tracto digestivo,

caracterizado por la dramática reducción del tamaño del estómago con la consiguiente limitación en el contacto de los alimentos con el jugo gástrico. Este paso de la digestión es muy importante en la liberación de nutrientes de la matriz proteica y permite además la ionización de algunos minerales (25). Otra situación relevante es el bypass del duodeno, lugar donde se absorbe con mayor eficiencia la mayoría de los nutrientes (26-28). Estos elementos deben ser tomados en cuenta al momento de interpretar la información presentada aquí. En la práctica se traduce en que la biodisponibilidad de los nutrientes posiblemente sea menor a lo considerado en la elaboración de las cifras de recomendación. En otras palabras, cifras de ingesta total ligeramente superiores al 100% de adecuación no asegurarían que efectivamente no exista riesgo de deficiencia.

## CONCLUSION

Los pacientes sometidos a bypass gástrico presentan reducciones importantes de la ingesta de energía, lo cual es uno de los objetivos de este tipo de cirugía, sin embargo esto se acompaña del consumo disminuido de micronutrientes. Aun cuando el consumo rutinario de suplementos permite en la mayoría de los casos revertir esta situación, las alteraciones anatómicas inherentes a esta intervención podrían producir que cifras de adecuación ligeramente superiores al 100% sean, en la práctica, insuficientes para asegurar que no se desarrollen cuadros de deficiencia. En esta categoría se encuentran calcio, hierro, vitamina A y folatos, en relación a los cuales se necesita realizar evaluaciones acompañadas de indicadores directos de estado nutricional.

## REFERENCIAS

1. Albala C, Vio F, Kain J, Uauy R. Nutrition transition in Chile: determinants and consequences. *Pub Health Nutr* 2002; 5: 123-128.
2. Ministerio Nacional de Salud. MINSAL. I Encuesta de Salud Chile 2003. Disponible en: <http://epi.minsal.cl/epi/html/invest/ENS/InformeFinalENS.pdf> (acceso 5 de septiembre 2007).
3. WHO. Obesity. Preventing and management the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva: WHO, 1997.
4. Rossner S. Obesity, the disease of 21th century. *Int J Obes* 2002; 26 (Suppl 4): S2-S4.
5. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahbarch K, et al. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004; 292: 1724-1737.
6. Balsiger BM, Murr MM, Poggio JL, Sarr MG. Bariatric Surgery. *Med Clin North Am* 2000; 84: 477-489.
7. Buchwald H. Consensus Conference Statement Bariatric surgery for morbid obesity: Health implications for patients, health professionals, and third-party payers. *J Am Coll Surg* 2005; 200: 593- 604.

8. Kushner R. Managing the obese patient after bariatric surgery: a case report of severe malnutrition and review of the literature. *JPEN* 2000; 24: 126-132.
9. Rubio M, Rico C, Moreno C. Nutrición y cirugía bariátrica. *Rev Esp Obes* 2005; (suppl 2): 5-15.
10. Parkes E. Nutritional management of patients after bariatric surgery. *Am J Med Sci* 2006; 331: 207-213.
11. Fujioka K. Follow-up of nutritional and metabolic problems after bariatric surgery. *Diabetes Care* 2005; 28: 481-484.
12. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. Gastrointestinal surgery for severe obesity. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 615S-619S.
13. Csendes A, Burdiles P, Papapietro K, Díaz JC, Maluenda F, Burgos A, et al. Results of gastric bypass plus resection of the distal excluded gastric segment in patients with morbid obesity. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 121-131.
14. Rebolledo A. Encuestas Alimentarias. *Rev Chil Nutr* 1998; 25: 28-34.
15. Schmidt-Hebbel, Pennacchiotti I, Masson L, Mella M. Tabla de composición química de alimentos Chilenos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago. 1990.
16. FAO/WHO/UNU. Human energy requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. FAO, Rome, 2004.
17. Rubio M, Martínez C, Vidal O, Larrad A, Salas-Salvado J, Pujol J, et al. Documento Consenso sobre cirugía bariátrica. *Rev Esp Obes* 2004; 4: 223-249.
18. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary references for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. Washington, DC: National Academy Press, 1977.
19. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary references for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington, DC: National Academy Press, 2001.
20. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine Dietary references for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington, DC: National Academy Press, 2000.
21. Snedecor GW, Cochran WG. Statistical methods, 8th edition. Ames, Iowa: The Iowa State University Press, 1989.
22. Beard J, Borel M, Peterson J. Changes in iron status during weight loss with very – low- energy diets. *Am J Clin Nutr* 1997; 63: 104-110.
23. Foster G, Waldden T, Petersen F, Letizia KA, Bartlett SJ, Conill AM. A controlled comparison of three very low calories diets: effects on weight, body composition and symptoms. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 811-817.
24. Aguirre ME, Ruz M, Carrasco F, Rebolledo A, Araya K, Codoceo J, et al. Efecto de dietas con restricción moderada de energía sobre el estado nutricional de algunos minerales en mujeres obesas *Arch Latinoamer Nutr* 2007; 57: 238-247.
25. Beard JL, Dawson H, Piñero DJ. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr Rev* 1996; 54: 295-317.
26. Bloomberg RD, Fleishman A, Nalle JE, Herron DM, Kini S. Nutritional deficiencies following bariatric surgery: what have we learned? *Obes Surg* 2005; 15: 145-154.
27. Finch, CA, Huebers, HA. Iron absorption. *Am J Clin Nutr* 1988; 47: 102-107.
28. Krebs NF. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J Nutr* 2000; 130: 1374S-1377S.

Recibido: 07-04-2008

Aceptado: 06-02-2009

## Calcium intake and its relationship with risk of overweight and obesity in adolescents

Tamara Beres Lederer Goldberg, Carla Cristiane da Silva, Luciana Natal Lopes Peres, Marina Nogueira Berbel, Márcia Braz Heigasi, Josy Maria Cabral Ribeiro, Karina Suzuki, Liene Mílcia Aparecida Josué, José Carlos Dalmas

Botucatu School of Medicine, São Paulo State University (UNESP), São Paulo, Brazil.

**SUMMARY.** Adolescents' eating habits are determined by social, psychological, economic, political, and educational influences. They tend to prefer foods with inadequate nutritional value and high fat and carbohydrate content which leads to excessive weight gain and for many, calcium intake is restricted. According to some authors, low calcium intake is linked to increased adiposity. The objective was to evaluate adolescent calcium intake and investigate a possible relationship between calcium intake and nutritional state. As part of their first consultation at Botucatu Adolescent Outpatient Clinic – UNESP, 107 adolescents were nutritionally classified by BMI, according to age, gender, and bands proposed by CDC and AAP. Diet was evaluated by a 3 day 24h food recall, adopting 1300mg/day calcium intake as recommended by *Dietary Reference Intakes*. Median calcium intake for the whole sample was 546.6mg/day, with 91.30% female and 86.84% male presenting lower than adequate daily recommended ingestion levels (DRI). There was significant difference between calcium densities (Ca mg/1000kcal) in eutrophic and overweight/obesity in males. Male adolescents showed an inverse relationship between calcium intake and adiposity ( $r = -0.488$  and  $p = 0.0173$ ), which corroborates the hypothesis that low calcium intake is linked to fatty tissue gain. Only 8.70% of female and 13.16% of male adolescents reached their daily recommended calcium intake levels. It must therefore be stressed that nutritional education is an important protection factor for children and adolescents in later life.  
**Key words:** Adolescence, obesity, calcium intake, bone health.

**RESUMEN. Ingesta de calcio y su relación con la prevalencia de riesgo de sobrepeso y obesidad en adolescentes.** Los hábitos alimentarios se desarrollan dependiendo de los determinantes sociales, psicológicos, económicos, políticos y educativos y sus preferencias recaen sobre alimentos con inadecuado valor nutricional, elevado contenido de grasa y carbohidratos que conducen a un aumento excesivo de peso. De acuerdo con algunos autores la baja ingestión de calcio se asocia al incremento de la adiposidad. Los objetivos fueron evaluar la ingestión de calcio por adolescentes e investigar una posible relación con el estado nutricional. En su primera consulta en el Ambulatorio de Medicina del Adolescente-Botucatu-UNESP, 107 adolescentes se clasificaron nutricionalmente por el IMC, de acuerdo con la edad y sexo y puntos de corte propuestos por el CDC y AAP. La evaluación dietética fue realizada por el método de recordatorio de 24 hrs. en 3 días diferentes y se adoptó la recomendación de Dietary Reference Intakes (DRI), de 1.300 mg de Ca/día. La ingestión mediana de calcio para la muestra total fue de 546,6 mg/día. Un 91,3% de las adolescentes y un 86,8% de los jóvenes presentaron un consumo inferior a los valores de DRI. Al comparar la densidad de calcio (Ca mg/1.000 kcal) entre los grupos eutróficos y sobrepeso/obeso del sexo masculino, se constató una diferencia significativa. En los adolescentes masculinos se evidenció una relación inversa entre consumo de calcio y adiposidad ( $r = -0,488$  y  $p = 0,0173$ ), lo cual confirma la hipótesis de que la baja ingestión de calcio se asocia al aumento de tejido graso. Solamente el 8,7% de las adolescentes mujeres alcanzaron las recomendaciones diarias de DRI y de los adolescente masculinos, el 13,16%.

**Palabras clave:** Adolescencia, obesidad, ingestión de calcio, salud ósea.

### INTRODUCTION

Adolescence, according to The World Health Organization (WHO) is from 10 to 20 years of age. The Brazilian Health Ministry defines adolescence as the same aged subgroup of the population as WHO, considering it as the period of life with intense growth and development, and anatomical, physiological, psychological, emotional and social transformation (1). On top of these, adolescence is also the

critical time of life where life habits, among those dietary, are established (2,3).

Food consumption in this stage of life is influenced by many factors; these include: sociocultural values, gaining a new body image, getting on with peer groups, family financial situation, providing or not providing food acquisition, food eaten outside the home, consumption of processed foods, the media, acquiring food habits reflected in choice, monotony, and way of preparing them (4,5).

Scientific literature highlights that adolescents diets are characterized by their preference for high energy foods, containing high levels of saturated fats and cholesterol as well as large quantities of salt and carbohydrates, with reduced nutri-

---

Financial support by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) Process No 04/07007-1.

tional value, resulting in not attaining the minimum recommendations for different groups of foods (2,6).

These changes in eating habits, lifestyle, and social behavior may be responsible for the significant increase in non-transmittable chronic diseases such as: osteopenia and osteoporosis, overweight and obesity and their side effects, arterial hypertension, dyslipidemia, type 2 diabetes *mellitus*, insulin resistance syndrome (IRS) which can affect them in adolescence or when they reach adulthood (7,8). It is also important to know food consumption as different studies have shown correlation between diet composition and the risk of morbimortality (2,7,8). In relation to the above dysfunctions, calcium metabolism has received more international attention (9,10), especially in relation to osteoporosis (11-13), arterial hypertension (7) and in weight control (14-17).

Specifically in relation to obesity, a lot of effort has been focused on understanding total energy balance and diet macronutrient levels, however few studies have looked at the role of macronutrients have on energy balance (18). In this context, dietary calcium has been recognized as a mineral which boosts weight loss (18,19). Metabolically, the probable mechanism is that a reduction in dietary calcium intake increases intracellular calcium due to changes in parathyroid hormone and 1,25 dihydroxyvitamine D levels. Increased intracellular calcium in adipocytes, potentializes lipogenesis and inhibits the lipolytic process (9). With this in mind, researchers have suggested that adequate calcium uptake increases body fat oxidation rates (20), however the exact mechanisms are still not fully understood and lead to controversy between studies (18,21).

The daily recommended consumption level of calcium for 9 to 18-year-olds of both sexes is 1300mg per day (DRI, Institute of Medicine 1997) (22). However it needs to be considered that there are still barriers to consuming foods high in calcium; these include palatability, inconvenience, possible calorie content and digestive complications, on top of insufficient knowledge about its metabolic value (11,12).

In light of considerations which emphasize the increased prevalence of obesity in adolescents, changes in their eating habits, and their reduced calcium intake, the objective of this study was to nutritionally evaluate adolescents attending outpatient clinics for this age group, determine levels of eutrophy, overweight, and obesity; understand their food consumption, focusing on calcium intake and the possible relationships between low calcium intake and the prevalence of overweight and obesity in individuals.

## PATIENTS AND METHODS

One hundred and seven adolescents in the 10 to 19 years old age bracket were evaluated at Botucatu School of Medicine Adolescent Outpatient Clinic from August 2003 to De-

cember 2004, after approval from the Research Ethics Committee of Botucatu School of Medicine - UNESPOF.51/2004-CEP.

Adolescents and their parents or guardians were made fully aware of the content through explanations given at the outpatient clinic and were included in the study after receiving and returning the free informed consent forms signed by both the adolescent and their parent or guardian. Non-adhesion to the study did not imply any sanction whatsoever for the adolescent, who was evaluated as per all procedures performed in this outpatient clinic.

Exclusion criteria were adolescents submitted to prolonged corticoid treatment or who used calcium supplements, those with the following ailments: diabetes mellitus, chronic or acute malnutrition, congenital or acquired bone diseases, gastrointestinal disorders accompanied by poor absorption, history of nephropathy, with or without chronic renal insufficiency, endocrinopathies, early or late puberty, chronic drug consumption, those considered as return patients as they had already received nutritional guidance in previous consultations, which could have interfered in their dietary evaluation.

Socioeconomic evaluation was performed to identify the population standard using a questionnaire developed by the National Association of Research Companies (ANEP), which considered head of family schooling level, and material goods in the home (23).

All adolescents who made their first consultation during this period, considered new cases in this clinic, underwent anamnesis and full clinical and anthropometric and nutritional examinations. However, the final sample was composed of those not satisfying any of the exclusion criteria. They were weighed on electronic platform 150kg capacity 100g graduation scales (Filizola), with minimum clothing (100g) and barefoot (24).

A wall mounted height gauge with mm scale was used for measuring stature according to Jelliffe, considering the average of two measurements (24).

Nutritional status was evaluated using BMI curves (Body Mass Index), weight (kg)/stature<sup>2</sup>(m), according to age, gender and the respective cut-off points proposed by Centers for Disease Control and Prevention (25) and for the American Academy of Pediatrics (26), which are: eutrophy between 5 and 85 percentiles; risk of overweight between 85 and 95 percentiles, and considered overweight or obesity =95 percentile (25,26).

The sample was subdivided into two groups using BMI criteria, one consisting of eutrophic patients, and the other consisting of at risk of overweight and obesity in patients.

Dietary evaluation consisted of a 24 hour data recording method, reporting all consumed foodstuffs including drinks over a 24h period, in all meals taken over 3 days so that

consumption could be estimated. The adolescents were interviewed in the presence of one of their parents or guardians when necessary. On this occasion, they were shown how to fill in the 24h data recording chart to obtain three days records.

Foods or preparations given in other measures were converted to grams. Data on food consumed (in grams) in the diet were converted into nutrients using food chemical composition tables from Virtual Nutri, version 1.0 (1996), developed by teaching staff from the Nutrition Department, USP School of Public Health (27).

Data on foods and preparations not listed in Virtual Nutri were taken from the Endif Table of Food Composition – IBGE (28) and the home food measures table from the Nutrition Department, USP School of Public Health (29).

This study only considered calcium source foods: milk, cheeses, yogurts, cream cheese, and prepared foods. The adolescents were also questioned on their intake of substances that could interfere in its absorption, such as: caffeine drinks, soft drinks, use of exclusively vegetarian diets, and high dietary fiber. No adolescent declared a relevant ingestion of elevated fiber or vegetarian diet. Adolescents were questioned about foods that could interfere in calcium absorption as they were submitted to bone mass evaluation using bone densitometry (DEXA).

Daily calcium consumption results were presented according to gender, stage in life, and nutritional state using a threshold of 1300mg/day as recommended by the Institute of Medicine (22), where values consumed are below, equal to,

or above this value. This allowed us to calculate the number of adolescents who consume less than the Adequate Intake (AI) value (22), as EAR's and RDA's are still not available for this nutrient (22). In addition to presenting calcium intake in mg/day represented on graphs by medians and their respective quartiles, for each gender and nutritional group, results were also obtained in relation to daily energy consumption by Ca(mg)/daily calorie consumption (30). To compare genders and eutrophic and risk of overweight/obesity groups, calcium density was presented in mg/1000Kcal to represent sample nutritional state.

Data were analyzed using Statistica version VI. Comparisons between groups were by Kruskal-Wallis analysis of variance and the Mann-Witney U test, once variables were verified as not having normal distribution by the Shapiro-Wilk test. The Spearman correlation test was used to verify the presence or lack of an association between BMI and calcium ingestion. The  $\chi^2$  test was used to analyze associations with gender. Statistical significance was considered at 5%.

## RESULTS

The study population consisted of 107 adolescents. 62.6% were eutrophic and 37.4% were considered at risk of overweight or obesity. Classifying by gender, 34.7% females and 42.1% males were considered at risk of overweight or obesity; data presented in Table 1.

TABLE 1  
Gender and nutritional state of adolescents in this study

Nutritional state	Female		Male		General Population	
	Frequency	Percentage	Frequency	Percentage	Frequency	Percentage
Eutrophic	45	65.3%	22	57.9%	67	62.6%
Overweight/ obese	24	34.7%	16	42.1%	40	37.4%
Total	69	64.5%	38	35.5%	107	100%

Using ANEP socioeconomic classification that varies from class A to E, Table 2, the highest number was classified in class C (49.5%) with 16.8% from class D. Therefore around 66% of these adolescents belong to low-middle income families.

In relation to the calcium consumption reference value, 86.36% of eutrophic and 87.50% classified at risk of

overweight/obesity male adolescents were below the Adequate Ingestion (AI) value; we were unable to calculate lack of calcium prevalence as EAR values were not available (22). For female adolescents, 91.11% of eutrophic and 91.76% classified risk of overweight/obesity were lower than the recommended value of 1300mg/day (Table 3).

TABLE 2  
Socioeconomic classification of adolescents in this study

Socioeconomic class	Nº of Adolescents	% adolescents
A1	1	0.93
A2	2	1.86
B1	11	10.28
B2	22	20.57
C	53	49.54
D	18	16.82
E	0	0
TOTAL	107	100

With an AI value of 1300mg/day as the split point for calcium ingestion in adolescents from both sexes and nutritional state, there was no significant difference between classifications according to gender. This indicates that nearly all eutrophic and at risk of overweight/obesity adolescents ingest less than 1300mg/day of calcium.

Table 4 shows calcium density values (mg/1000kcal), for the male adolescents was  $356.5 \pm 159.2$  mg/1000kcal for eutrophic and  $267.8 \pm 163.2$  mg/1000kcal for those considered overweight/obesity. Statistical analysis showed that eutrophic male adolescents had higher calcium densities than their at risk of overweight/obesity male peers.

TABLE 3  
Percentage of adequate calcium consumption according to gender and nutritional state for adolescents in this study

Nutritional State	Female		Male	
	Adequate	Inadequate	Adequate	Inadequate
Eutrophic	8.89% (n=4)	91.11% (n=41)	13.64% (n=3)	86.36% (n=19)
Overweight/Obese	8.33% (n=2)	91.67% (n=22)	12.50% (n=2)	87.50% (n=14)
Total	8.70% (n=6)	91.30% (n=63)	13.16% (n=5)	86.84% (n=33)

Note:  $\chi^2$  test

TABLE 4  
Calcium densities (mg/1000kcal) according to gender and nutritional state for adolescents in this study

Estado Nutricional	Female	Male	General Population
Eutrophic	$267.8 \pm 163.2$	$356.5 \pm 159.2^*$	$296.9 \pm 166.1$
Overweight/Obese	$303.3 \pm 136.4$	$240.7 \pm 118.2$	$278.3 \pm 131.6$
Total	$280.1 \pm 154.3$	$307.8 \pm 153.0$	$290.0 \pm 153.7$

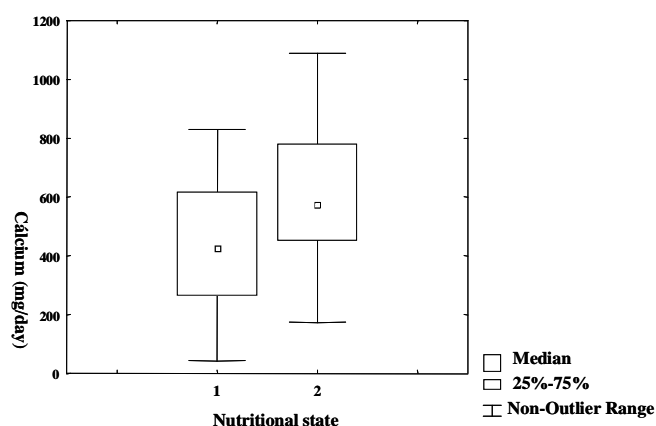
Note. Kruskal-Wallis analysis of variance and the Mann-Witney U test . Results are expressed as means  $\pm$  SD.

\*Indicates higher calcium values in eutrophic adolescents in relation to overweight/obese (p=0.014)

Median calcium ingestion levels were 430.9mg/day for female eutrophic and 572.7mg/day for female overweight/obesity; however for males, median ingestion was 803.1mg/day for eutrophic and 466.4mg/day for the overweight/obesity group. Graphs 1 & 2 show median and quartile distributions for eutrophic and risk of overweight/obesity groups for female and male adolescents respectively.

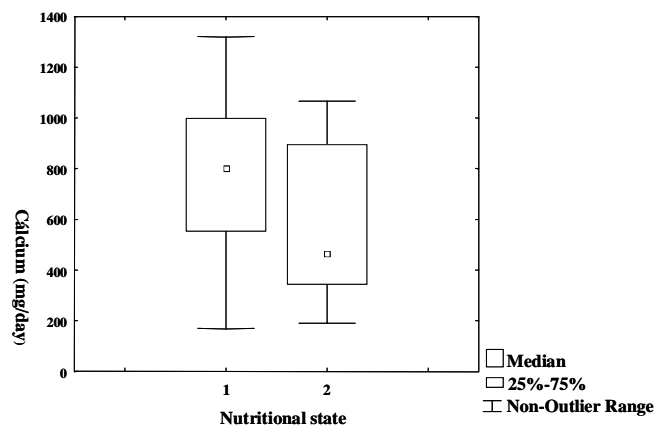
GRAPH 1

Median calcium intake values against nutritional state for female adolescents. (1: Eutrophy, 2: Overweight/Obese)



GRAPH 2

Median calcium intake values against nutritional state for male adolescents. (1: Eutrophy, 2: Overweight/Obese)



The Spearman coefficient of correlation verified a significant negative association between Calcium intake and BMI for males,  $r = -0.488$  with  $p = 0.0173^*$  and nonsignificant for females,  $r = -0.250$  with  $p = 0.216$ .

## DISCUSSION

Currently, obesity in children and adolescents is rising in many parts of the world; in some it is already considered to be at epidemic proportions. According to the US Surgeon General, the number of overweight children has doubled and overweight adolescents tripled in the USA compared to data from epidemiological studies from the last two decades (31).

Most of the adolescents in this study had normal nutritional status (62.6%), however it must be stressed that a high proportion (37.4%) were diagnosed as at risk of overweight/obesity. This proportion was a little higher than studies made in the USA (32) and Brazil (33), which identified values around 30%. These results agree with data from other studies made in the same department (34). Although data are taken from an outpatient clinic at a University Hospital, we stress that this clinic does not present any selection criteria, is receptive to demand, the only limiting factor is the clinic's consulting capacity.

In a retrospective study of data obtained between 1988 and 1996 from the medical records of 469 adolescents joining the outpatient clinic between 1988 and 1992, and 258 between 1993 and 1996, the first period presented a prevalence of risk of overweight and obesity in females of 26.85% and males of 12.62%. In the second period these were 48.34% for females and 40.19% for males, indicating that levels doubled for females and trebled for males when comparing the two periods. The authors were showing that with evolution of time, these diagnoses would present elevated prevalence, highlighting an intense preoccupation as this was associated with diseases such as arterial hypertension, cardio-circulatory diseases, type 2 diabetes mellitus, osteo-articular diseases, neoplasias, resulting in increased mortality at increasingly younger ages (34).

In relation to estimated calcium consumption obtained from 3 days of 24h recorded data and calculating medians for both male and female adolescents (Graph 1 and 2), values were much lower than the Adequate Intake (AI) presented in DRI for this micronutrient. The adolescents had a significantly lower calcium intake than those of males, results also seen in other national and international studies (32,35).

Criticism about the form of data collection in food questionnaires is always made when this or other methods are used. However, despite significant errors reported in literature relating to this type of recording, data presented in this study were very close to those in national and international studies where results were taken from different types of food questionnaire (2,31,32,36-38).

When comparisons were made by calcium density, taking into account nutritional state and gender, significant differences were seen between male eutrophic and at risk of overweight/obesity adolescents, but not their female counterparts. According to Lee & Reicks (38), a less than recommended calcium intake can be associated with a type of breakfast, the number of children and adolescents living in the same house, possible buying power to get foodstuffs high in calcium, an understanding of this nutrient's importance, and parents encouragement about the importance of eating foods high in calcium. Therefore when analyzing the factors which influence calcium intake in adolescents, as well as those cited earlier, there are: habits and lifestyle, limited understanding of diets, lactose intolerance, sociocultural factors and values, living with peers, media influence, etc. (8,11,13,22).

Over and above these, fat intake and concern about body shape, mainly in females, can influence lactose product intake, however Barr (39) concluded that knowledge about diet and body shape do not directly compromise calcium intake, but are associated with the type of milk selected, whether it is skimmed, semi-skimmed, or full cream (39,40).

Low calcium intake, as shown in this study, can elevate socioeconomic condition to interfere in its consumption. In a study by Silva et al (11,12) between high socioeconomic level students from Botucatu of the same age range, mean calcium intake was  $863\text{mg} \pm 280\text{mg/day}$ , better than in this study, but still a long way off AI values. Santos et al (41), in a study with students in Ouro Preto, demonstrated that calcium intake in a school from the highest socioeconomic level ( $782.02\text{mg/day}$ ) was much higher than in a state school with a much lower level ( $563.20\text{mg/day}$ ). Although different studies highlight the variability of mean daily calcium intake in adolescents, most of them reveal that consumption is less than adequate, demonstrating a worrying problem in relation to adolescents and their future bone health situation, as the bone mass accumulation rate contributes to around 50% of bone mineral content, incorporating approximately 1000g of bone mineralization during adolescence (11,12,35).

According to a study by Albano (37) at the Applied Teaching School, Education Faculty, USP, mean calcium consumption for males was  $819.68\text{mg/day}$  reaching 63.05% of the DRI recommendations (22) for females it was  $579.86\text{mg/day}$ , reaching 44.6% of that recommended; these are just higher than values in our study, but still inadequate.

In light of these observations, insufficient calcium intake is the result of low consumption of calcium rich foods, such as milk and its derivatives, ignored by the frequent and high intake soft drinks and a proven association with low calcium intake (2,42). Although soft drink consumption was not the specific objective of this study, studies have shown that lactose drink consumption is inversely proportional to soft drink consumption (42). Whiting et al (43) found that the association

between soft drinks and low calcium intake by adolescents was negatively related to bone mineral density in adolescent girls between 10 and 14 years old.

Changes in eating habits seen in American adolescents over a 30 year period have reported that they have increased their soft drink consumption, with a discrete reduction in calorie intake from proteins and fats, and have detected a drop in calcium intake where only 20% of girls and about 30% of adolescents reach the recommended levels, due to the drop in consuming milk and its derivatives (2), which have been replaced with soft drinks and juices.

Adolescents who consume large quantities of soft drinks ingest less than 20% of the calcium of those who do not. And soft drinks containing caffeine increase calcium excretion in urine, and are therefore harmful to an adequate calcium balance (11,38).

Ninety one percent of the male adolescents and 86.84% of the female members in this study presented low calcium intake, which was always below that recommended by AI. Comparing girls with different nutritional states, those who were overweight or obese presented low calcium intake when calculated in  $\text{mg}/1000\text{Kcal}$ ; the same was found by Andrade et al (44), Phillips, and many other authors (30). These differences relative to males and nutritional state were also seen data were presented as medians and quartiles, as seen in Graph 2.

Scientific literature has recently suggested that low calcium intake could act as a contributory factor in the rise in obesity, and be associated to the risk of hypertension and insulin resistance syndrome (IRS) (42). This was suggested by CARDIA (7) who showed that adequate consumption of milk and its derivatives was inversely proportional to appearance of all the signs and symptoms of IRS, including obesity. Animal studies have proved, which also seems plausible in humans, that when energy intake and physical activity are under control, body fat will be less in those consuming more calcium. Heaney (10) evaluated 348 young women and saw that when their calcium intake was below the 25<sup>th</sup> percentile, obesity prevalence was 15%, however when their calcium intake was at DRI recommended levels, this prevalence dropped to 4%.

In 2004, Zemel et al. (9) prescribed 32 obese adults with three different diets, one with restricted calories, another with restriction but with calcium supplement, and the third with restriction but with lactose product supplement. All groups lost weight in different proportions; 6.4% for the calcium supplemented group, 8.6% for the restriction only group, and 10.9% for the lactose product supplement group. Physiological explanations showed that parathyroid hormone (PTH) and 1,25-dihydroxyvitamin D regulate intracellular calcium, so diets with low calcium intake stimulate PTH and 1,25-dihydroxyvitamin D, which in turn favor intracellular calcium

uptake in adipocytes, stimulating lipogenesis and inhibiting lipolysis (9). Another mechanism cited as having a possible effect from calcium intake on not gaining weight or body fat, seems to be its bonding to fatty acids in the colon which inhibit fat absorption and activate fat excretion (45).

As many authors have highlighted adequate calcium intake as a protection factor in preventing the occurrence of obesity and others have contested this fact (9,10,19,40,42-47), there is a pressing need for its role to be clarified especially as adolescence is the time of life when a large amount of bone mass is acquired, its importance in boosting bone mineral build up is unquestionable, but other studies are needed to clarify its possible relationship with excessive weight gain when consumed in lower than recommended doses. It must be said that, even though some of its action mechanisms have been clarified, authors reinforce the importance of adequate intake, above that recommended, for effective calorie restriction in helping prevent obesity. So there is still some speculation of how to transfer some of these hypotheses when working with humans, in conditions of food consumption freedom (9,43).

### CONCLUSION

This study showed that a low consumption of calcium rich foods by adolescents translates into a lower than recommended intake of this micronutrient in this population when values are compared with recommended DRI for calcium (22).

Evidence from this study that insufficient calcium intake correlated to the risk of excessive weight gain in male adolescents, emphasizes that eating foods with adequate nutritional value, supplemented by helpings of calcium rich food which favor the prevention of obesity and its comorbidities, also help gain adequate bone mass which is responsible for bone health in later years.

Even with these facts stating that low calcium intake increases the prevalence of obesity in female adolescents, was not proved in this study, it seems desirable that guidance on adequate calcium intake is emphasized for both sexes due to the serious health problems resulting from inadequate intake.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Ilana Lederer Goldberg Coutchie and Stuart Coutchie for the English translation of the Abstract.

### REFERENCES

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. Coordenação da Saúde da Criança e do Adolescente. Programa saúde do adolescente: bases programáticas. 2.ed.rev. Brasília: Ministério da Saúde, 1996. 32p.
2. Cavadini C, Siega-Riz AM, Popkin BM. US adolescent food intake trends from 1965 to 1996. *Arch Dis Child* 2000; 83(1):18-24.
3. Kant AK. Report consumption of low-nutrient-density foods by american children and adolescents. Nutritional and health correlates, NHANES III, 1988 to1994. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003; 157(8):789-96.
4. Dietz WH. Childhood weight affects adult morbidity and mortality. *J Nutr* 1998; 128(2): s411-s4.
5. Garcia GCB, Gambardella AMD, Frutuoso MFP. Estado nutricional e consumo alimentar de adolescentes de um centro de juventude da cidade de São Paulo. *Rev Nutr* 2003; 16(1):41-50.
6. Lee Y, Mitchell C, Smiciklas-Wright H, Birch LL. Diet quality, nutrient intake, weight status, and feeding environments of girls meeting or exceeding recommendations for total dietary fat of the american academy of pediatrics. *Pediatrics* 2001; 107(6):95-101.
7. Pereira M, Jacobs DR, Van Horn L, Slattery ML, Kartashov AI, Ludwig DS. Dairy consumption, obesity, and the insulin resistance syndrome in young adults: the CARDIA study. *JAMA* 2002; 287(16): 2081-89.
8. Templeton SB, Marlette MA, Panemangalore M. Competitive foods increase the intake of energy and decrease the intake of certain nutrients by adolescents consuming school lunch. *J Am Diet Assoc* 2005; 105(2): 215-20.
9. Zemel M, Thompson W, Milstead A, Morris K, Campbell P. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obes Res* 2004; 12(4):582-90.
10. Heaney R, Davies KM, Barger-lux MJ. Calcium and weight: clinical studies. *J Nutr* 2003; 133:s152-s5.
11. Silva CC, Teixeira AS, Goldberg TBL. Impacto da ingestão de cálcio sobre a mineralização óssea de adolescentes. *Rev Nutr* 2004; 17(3):351-9.
12. Silva CC, Goldberg TBL, Teixeira AS, Dalmas JC. Mineralização óssea em adolescentes do sexo masculino: anos críticos para a aquisição da massa óssea. *J Pediatr* 2004; 80(6):461-7
13. Tussing L, Chapman-Novakofski K. Osteoporosis prevention education: behavior theories and calcium intake. *J Am Diet Assoc* 2005; 105(1):92-7.
14. Teegarden, D. Calcium intake and reduction in weight or fat mass. *J Nutr* 2003; 133: 249S–251S.
15. Novotny R, Daida YG, Acharya S, Grove JS, Vogt TM. Dairy intake is associated with lower body fat and soda intake with greater weight in adolescent girls. *J Nutr*. 2004; 134: 1905–1909.
16. Eagan MS, Lyle RM, Gunther CW, Peacock M, Teegarden D. Effect of 1-year dairy product intervention on fat mass in young women: 6-month follow-up. *Obesity* 2006; 14(12): 2242 - 2248.
17. DeJongh ED, Binkley TL, Specker BL. Fat mass gain is lower in calcium-supplemented than in unsupplemented preschool children with low dietary calcium intakes. *Am J Clin Nutr* 2006; 84(5):1123 - 7.
18. Heaney-Berino J, Gold BC, Lauber R, Stariniski A. The impact of calcium and dairy product consumption on weight loss. *Obes Res* 2005;13:1720-6.

19. Davies KM, Heaney RP, Recker RR, Lappe JM, Barger-Lux MJ, Rafferty K, Hinders S. Calcium intake and body weight. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4635–38.
20. Scragger S. Dietary calcium intake and obesity. *J Am Board Fam Pract* 2005; 18(3): 205-10.
21. Kamycheva E, Joakimsen RM, Jorde R. Intakes of calcium and vitamin D predict body mass index in the population of Northern Norway. *J Nutr* 2002; 132:102-6.
22. Institute of Medicine; Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride. Washington(DC): National Academic Press; 1997.
23. ANEP (Associação Nacional de Empresas de Pesquisa). Critério de classificação econômica Brasil. São Paulo: A Associação; 1997.
24. Gordon CC, Chumled WC, Roche AF. Stature, recumbent length and weight. In: Lohman TG, Roche AF, Martorell R, editors. Anthropometric standardization reference manual. Champaign IL: Human kinetics books; 1988. 177 p.
25. Center for Disease Control and Prevention. The 2000 CDC Growth Charts and the New Body Mass Index-For-Age Charts. CDC Growth Charts: United States; 2002.[cited 2005 Ago 19] Available from: <http://www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/growthcharts/charts.htm>
26. Policy Statement: Prevention of Pediatric Overweight and Obesity. *Pediatrics* 2003; 112: 424-30.
27. Phillipi ST, Szarfarc SC, Latterza AR. Informatização em nutrição: virtual nutri – versão 1.0. São Paulo; FSP/USP/ Departamento de Nutrição; 1996.
28. Fundação IBGE. Estudo Nacional da Despesa Familiar - ENDEF. Tabela de composição de alimentos. Rio de Janeiro; 1977.
29. Pinheiro AB, Lacerda EM, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras. 2a ed. Rio de Janeiro: UERJ; 1994.
30. Phillips SM, Bandini LG, Cyr H, Olclough-Douglas S, Naumova E, Must A. Dairy food consumption and body weight and fatness studied longitudinally over the adolescent period. *International Journal of Obesity* 2003; 27: 1106–13.
31. World Health Organization. Obesity—Preventing and Managing the Global Epidemic. WHO Consultation on Obesity, 1997. [cited 2002 Jun]. Available from: [www.who.int/nut/Obesity%20Report's%20Executive%20Summary.PDF](http://www.who.int/nut/Obesity%20Report's%20Executive%20Summary.PDF)>
32. Kant AK. Report consumption of low-nutrient-density foods by american children and adolescents. Nutritional and health correlates, NHANES III, 1988 to 1994. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003; 157(8):789-96.
33. Albano RD, Souza SB. Estado nutricional de adolescentes: “risco de sobrepeso” e “sobrepeso” em uma escola pública do município São Paulo. *Cad Saúde Pública* 2001; 17(4):941-7.
34. Goldberg, TBL, Garcia DA, Baiocchi Neto G, Curi PR. Prevalência de sobrepeso e obesos em ambulatório de adolescentes. In: Obesidade e anemia carencial na adolescência: simpósio. - São Paulo: Instituto Danone; 2000. p. 253-5.
35. Lerner BR, Lei DLM, Chaves SP, Freire RD. O cálcio consumido por adolescentes de escola pública de Osasco, São Paulo. *Rev Nutr* 2000; 13(1):57-63.
36. Salvo VLMA, Gimeno SGA. Reprodutibilidade e validade do questionário de frequência de consumo de alimentos. *Rev Saúde Pública* 2002; 36(4):505-12.
37. Albano RD. Estado Nutricional e Consumo Alimentar do Adolescente. [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2000. 67p.
38. Lee S, Reicks M. Environmental and behavioral factors are associated with the calcium intake of low-income adolescent girls. *J Am Diet Assoc* 2003; 103(11):1526-9.
39. Barr SI. Dieting attitudes and behavior in urban high school students: implications for calcium intake. *J Adolesc Health* 1995; 16(6):458-64.
40. Albertson AM, Tobelmann RC, Marquart L. Estimated dietary calcium intake and food sources for adolescents females: 1980-92. *J Adolesc Health* 1997; 20(1):20-6.
41. Santos LC, Martini LA, Freitas SN, Cintra IP. Ingestão de cálcio e indicadores antropométricos em adolescentes. *Rev Nutr* 2007; 20(3):275-83.
42. Harnack L, Stang L, Story M. Soft drinks consumption among US children and adolescents: Nutritional consequences. *J Am Diet Assoc* 1999; 99(4):436-41.
43. Whiting SJ, Healey A, Psiuk S, Mirwald R, Kowalski K, Bailey DA. Relationship between carbonated and other low nutrient dense beverages and bone mineral content of adolescents. *Nutr Res* 2001; 21:1107-15.
44. Andrade RG, Pereira RA, Sichieri R. Consumo alimentar de adolescentes com e sem sobrepeso do município do Rio de Janeiro. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(5):1485-95.
45. Lorenzen JK, Nielsen S, Holst JJ, Tetens I, Rehfeld JF, Astrup A. Effect of dairy calcium or supplementary calcium intake on postprandial fat metabolism, appetite, and subsequent energy intake. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:678-87.
46. Berkey CS, Rockett HR, Willett WC, Colditz GA. Milk, dairy fat, dietary calcium, and weight gain. A longitudinal study of adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2005; 159(6):543-50.
47. Boon N, Koppes LLJ, Saris WAM, Van Mechelen W. The relation between calcium intake and body composition in a dutch population. The Amsterdam growth and health longitudinal study. *Am J Epidemiol* 2005, 162(1):27-32.

Recibido: 10-06-2008

Aceptado: 22-09-2008

## Fatores socioeconômicos associados ao excesso de peso em população de baixa renda do Nordeste brasileiro

Janine Maciel Barbosa, Poliana Coelho Cabral, Pedro Israel Cabral de Lira, Telma Maria de Menezes Toledo Florêncio

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Universidade Federal de Alagoas. Brasil

**RESUMO.** O objetivo deste estudo foi descrever a prevalência do excesso de peso e os fatores possivelmente associados em adultos residentes em áreas de exclusão social. A amostra foi composta por 3.214 indivíduos de 20 a 69 anos residentes em assentamentos subnormais de Maceió-AL, na região Nordeste do Brasil. Na avaliação nutricional, foi utilizado o índice de massa corporal (IMC). Encontrou-se prevalência de excesso de peso de 41,2%, (46,2% mulheres vs. 32,6% homens,  $p < 0,001$ ). A análise indicou, tanto entre os homens quanto entre as mulheres, maior chance de excesso de peso nas faixas de idade mais avançada (Razão de Prevalência [RP]= 1,62, IC95% 1,37-1,90 e RP= 1,55, IC95% 1,41-1,69, respectivamente), e entre os procedentes da zona rural (RP= 1,27, IC95% 1,07-1,51 e RP=2,23, IC95% 2,01-2,47, respectivamente). O risco de excesso de peso mostrou-se diretamente associado ao nível de escolaridade no sexo masculino (RP=0,78, IC95% 0,63-0,97) e inversamente no sexo feminino (RP=1,40, IC 95% 1,17-1,66). Foi evidenciado risco maior de excesso de peso entre os homens de maior renda (RP= 1,29, IC95% 1,09-1,53). No geral, as variáveis relacionadas às condições de moradia e aos bens de consumo evidenciaram que pequenas melhorias estão associadas ao maior risco de excesso de peso. Mesmo dentro dessa população de baixo nível socioeconômico, melhorias nas condições de moradia podem constituir-se em fatores de risco para o excesso de peso em adultos de ambos os sexos, enquanto que a educação se comporta como fator protetor no sexo feminino e a renda como fator de risco no sexo masculino.

**Palavras-chave.** Sobrepeso, obesidade, baixa renda.

### INTRODUÇÃO

A prevalência mundial de sobrepeso e obesidade vem apresentando um rápido aumento nas últimas décadas, sendo caracterizada como uma verdadeira epidemia mundial (1,2). Este fato é bastante preocupante, pois o excesso de peso, definido como  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ , é considerado fator de risco para desenvolvimento de diabetes mellitus (DM), dislipidemia e hipertensão arterial, condições que favorecem o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (3,4).

O nível socioeconômico constitui-se fator determinante

**SUMMARY. Socioeconomic factors associated with overweight in a low-income population of Northeast Brazil.** The purpose of this research was to describe the overweight prevalence and factors potentially associated to it in adults residents in areas of social exclusion. The sample consisted of 3,214 individuals, aged 20 to 69 years, in shanty town in Maceió-AL, Northeast of Brazil. Body mass index (BMI) was used in the nutritional evaluation. Overweight prevalence of 41.2% was found (46.2% females vs. 32.6% males,  $p < 0.001$ ). The analysis indicated there is higher chance of getting overweight, both for males and females, in higher age ranges (Prevalence Ratio [RP]= 1.62, CI95% 1.37-1.90 and RP= 1.55, CI95% 1.41-1.69, respectively), and among those from rural areas (RP= 1.27, CI95% 1.07-1.51 and RP=2.23, CI95% 2.01-2.47, respectively). In males, the overweight risk is directly associated to the schooling level (RP=0.78, CI95% 0.63-0.97), whereas, in females it is inversely associated (RP=1.40, CI95% 1.17-1.66). A higher overweight risk was evidenced among men of higher income (RP= 1.29, CI95% 1.09-1.53). In general, small improvements in variables related to housing conditions and consumption goods are associated to higher overweight risk. Even in populations of low socioeconomic level, improvement in housing conditions can become an overweight risk factor in adults for both genders, whereas education is a protective factor for women and the income a risk factor in men.

**Key words.** Overweight, obesity, low-income.

da prevalência de sobrepeso e obesidade, pois interfere na disponibilidade de alimentos, no acesso à informação, bem como pode estar associado ao estilo de vida e a determinados padrões de atividade física. Entre indicadores de condições socioeconômicas mais frequentemente utilizados estão educação, ocupação e renda (5,6). Revisões sistemáticas (7,8) indicam que nos países desenvolvidos a obesidade tende a ser mais freqüente entre indivíduos de menor renda, menor escolaridade e com ocupações de menor prestígio social. Para os países em desenvolvimento, existe uma tendência inversa, ou seja, maior freqüência de obesidade nos estratos de melhor nível socioeconômico.

No entanto, Monteiro et al. (9), em uma recente revisão com estudos de populações de países em desenvolvimento, mostraram uma tendência à reversão da associação entre

---

#### Instituição de financiamento:

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL).

condições socioeconômicas e obesidade, evidenciando comportamento similar aos dos países desenvolvidos.

No Brasil, uma análise comparativa (10) entre três grandes pesquisas realizadas entre 1974 e 1997 encontrou que a obesidade aumentou em todas as regiões e estratos de renda. No que se refere à situação socioeconômica encontrou-se que nas regiões menos desenvolvidas a obesidade apresentou um crescimento maior entre as mulheres de renda elevada quando comparada às de menor renda. Já nas regiões mais desenvolvidas, a obesidade aumentou entre as mulheres de baixa renda, e diminuiu entre as mulheres de melhor renda. A última pesquisa que englobou as cinco macrorregiões brasileiras (11) revelou a mesma tendência no aumento do sobrepeso e obesidade. Para o sexo masculino o aumento ocorreu em todas as regiões e em todas as classes de rendimento, mas na população feminina, o problema do excesso de peso tendeu a deslocar-se para região Nordeste e, de modo geral, para as classes de menor renda.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo descrever a prevalência do sobrepeso e da obesidade em adultos de baixa renda e identificar os fatores potencialmente associados ao excesso de peso em assentamentos subnormais de Maceió, capital de Alagoas, região Nordeste do Brasil.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo é do tipo transversal de base populacional e foi parte do projeto de pesquisa “*Perfil Nutricional e de Saúde da População de moradores em Assentamentos Subnormais de Maceió/AL*”, financiado pela Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) (Processo N.º 21.154). Os dados do referido projeto foram coletados entre os meses de setembro de 2004 e março de 2006.

O tamanho da amostra foi estimado assumindo-se uma prevalência de excesso de peso para os grupos de referência de 30% (ex: menor escolaridade) e para os estratos de comparação em torno de 45% (RP=1,50), levando-se em consideração um *power* de 80% e a significância de 95%, resultando em uma amostra mínima de aproximadamente 175 indivíduos por estrato. Para o cálculo foi utilizado o programa Epi Info, versão 3.03 para *windows*.

O processo amostral adotado para cálculo do número de domicílios investigados foi o de conglomerado em dois estágios, com probabilidade de seleção proporcional ao número de assentamentos e ao número de domicílios de cada região administrativa. O estudo contemplou aproximadamente 18% dos 136 assentamentos das sete regiões administrativas de Maceió, totalizando 25 unidades amostrais obtidas através de sorteio simples. Em seguida, procedeu-se à elaboração de mapas e cada assentamento elegível foi percorrido em sentido horário a partir de uma esquina sorteada previamente, até que

se completasse a seleção do total de domicílios estabelecidos para cada assentamento. O número total de domicílios pesquisados foi de 2.172, variando entre 31 e 146 por assentamento.

A coleta de dados consistiu-se em entrevista domiciliar com o chefe da família ou o responsável pelo domicílio maior de 18 anos, realizada por universitários treinados para aplicação, esclarecidos de dúvidas e padronização das tomadas de medidas antropométricas. Para esse estudo em particular utilizou-se o universo de indivíduos adultos entre 20 e 69 anos.

Foram coletadas informações quanto às características sócio-econômicas das famílias tais como: idade em anos no momento da entrevista, categorizada em duas faixas etárias ( $\geq 40$  e  $< 40$  anos); escolaridade em anos completos de estudo, agrupada em  $\leq 8$  e  $> 8$  anos; renda familiar bruta, posteriormente convertida em salários mínimos (SM) e subdividida em  $\leq 1$  e  $> 1$  SM (valor do período  $\cong$  R\$ 283,16); procedência urbana ou rural e estado marital (com ou sem cônjuge) informados pelo entrevistado; e situação de emprego por meio de informações sobre atividade remunerada (trabalhando ou não). Os aspectos referentes às condições de moradia foram: número de cômodos (categorizados em  $> 4$  e  $\leq 4$  cômodos), presença de banheiro (unifamiliar e coletivo ou inexistente), destino do lixo (coleta pública e céu aberto), tipo de esgotamento sanitário (público e céu aberto ou fossa séptica), tipo de construção (alvenaria e materiais precários), condições de abastecimento de água (rede pública e outras) e presença de bens de consumo no domicílio, tais como geladeira e TV.

Os dados referentes ao estado nutricional como peso e altura, foram analisados através do IMC, segundo as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) (3). O peso foi aferido em balança digital Filizola® com capacidade de 150 kg com precisão de 100 g. Para medição da altura, foi utilizado estadiômetro portátil dotado de fita métrica inextensível com 2 m de comprimento e precisão de 0,1 cm. Todas as medidas foram obtidas nos domicílios, com os indivíduos usando roupas leves e descalços.

O excesso de peso foi definido com base no Índice de Massa Corporal (IMC) obtido pela divisão do peso (em quilogramas) pela altura (em metros) elevada ao quadrado. Foram classificados como tendo excesso de peso os entrevistados com IMC igual ou superior a  $25 \text{ kg/m}^2$  (3).

Os dados foram digitados no programa Epi Info versão 3.3 para *windows*. As análises foram realizadas no Programa SPSS versão 13.0. A análise bivariada incluiu o teste do qui-quadrado e o cálculo das Razões de Prevalência (RP) com seus intervalos de confiança de 95% (IC95%).

O Comitê de Bioética da UFAL aprovou o presente estudo (Processo N.º 006.020), estando os procedimentos de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos com humanos.

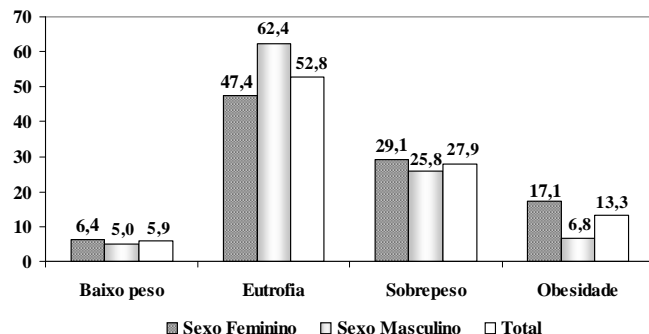
## RESULTADOS

Entre os 4.152 adultos identificados, 938 não participaram do estudo: 866 (20,9%) por não terem sido aferidas as medidas antropométricas devido às dificuldades de acesso e identificação dos indivíduos e 72 (1,7%) por encontrarem-se gestantes. A fim de certificar que os indivíduos excluídos do estudo não diferiam dos incluídos no mesmo, ambos foram comparados quanto à escolaridade. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ( $p=0,320$ ).

Portanto, os resultados apresentados referem-se a 3.214 indivíduos, 1.162 (36,2%) homens e 2.052 (63,8%) mulheres. A amostra foi composta por adultos com idade média de 37,5 anos ( $DP=12,48$ ), destes 66% eram desempregados, 23% analfabetos, 82,6% possuíam renda menor que um salário mínimo e 43,8% dos domicílios tinham o esgotamento sanitário realizado a céu aberto.

Em relação ao estado nutricional através do IMC, 41,2% da amostra foi classificada como apresentando excesso de peso, sendo mais prevalente entre as mulheres ( $RP=1,42$ ,  $IC95\%$  1,29-1,56). As mulheres também apresentaram 2,51 vezes ( $IC95\%$  1,99-3,17) mais obesidade do que os homens (17,1% vs. 6,8%,  $p<0,001$  respectivamente) (Gráfico 1).

GRÁFICO 1



Distribuição percentual do Índice de Massa Corporal (IMC), segundo sexo em moradores de assentamento subnormais de Maceió/AL-2004. ( $p<0,001$ ).

As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados da análise bivariada das principais variáveis socioeconômicas associadas ao excesso de peso. Na análise, encontrou-se associação entre excesso de peso, idade e procedência em ambos os sexos. O excesso de peso foi mais prevalente na faixa de idade mais avançada tanto entre os homens ( $RP=1,62$ ,  $IC95\%$  1,37-1,90) como entre as mulheres ( $RP=1,55$ ,  $IC95\%$  1,41-1,69) e nos indivíduos procedentes da zona rural onde as Razões de Prevalência foram de 1,27 ( $IC95\%$  1,07-1,51) e 2,23 ( $IC95\%$  2,01-2,47), respectivamente.

A prevalência de excesso de peso variou com os níveis de

educação. A escolaridade encontrou-se diretamente associada ao excesso de peso no sexo masculino ( $RP=0,78$ ,  $IC95\%$  0,63-0,97), mas, inversamente associada no sexo feminino ( $RP=1,40$ ,  $IC95\%$  1,17-1,66) (Tabela 1 e 2). A análise da renda revelou que indivíduos com mais de 1 salário mínimo mensal apresentaram maior prevalência de excesso de peso, contudo os  $IC95\%$  mostraram diferenças estatisticamente significativas apenas no sexo masculino ( $RP=1,29$ ,  $IC95\%$  1,09-1,53).

As análises das condições de moradia descritas nas Tabelas 3 e 4 mostraram associação direta com o excesso de peso, com exceção da variável esgotamento sanitário em ambos os sexos, abastecimento de água no sexo masculino e destino do lixo no sexo feminino.

## DISCUSSÃO

Os dados aqui apresentados demonstram certa especificidade pelo fato de terem sido obtidos a partir de uma amostra homogênea de indivíduos de baixas condições socioeconômicas. Trata-se de uma população urbana residente em áreas periféricas com alto índice de exclusão social de Maceió, capital de Alagoas, um dos estados com as piores condições sociais da região Nordeste do Brasil. As dificuldades de acesso e localização dos domicílios dentro dos próprios assentamentos devido às precárias condições ambientais, tais como presença de valas, morros, superfícies íngremes, bem como a intensa migração espacial desta população fizeram com que os pesquisadores visitassem os assentamentos por vários meses, o que explica o longo período de coleta de dados.

As prevalências obtidas de excesso de peso na população estudada evidenciam os níveis epidêmicos deste problema. Enquanto 5,9% apresentaram baixo peso, indicando baixa exposição da população à desnutrição, 41,2% mostraram sobrepeso e obesidade, ou seja, o excesso de peso ultrapassou em quase 7 vezes o baixo peso. Monteiro et. al (10) ao analisar dados de 3 pesquisas de base populacional realizadas no Brasil entre 1975 e 1997, mostraram que nos adultos o sobrepeso parece estar substituindo a desnutrição como problema de saúde pública, principalmente nas classes sociais menos favorecidas.

A tendência ao excesso de peso em populações urbanas de baixa renda tem sido demonstrada em diversos trabalhos. Sawaya et al. (12) em um estudo com 535 famílias moradoras de favelas na cidade de São Paulo encontraram 8,5% dos adultos com desnutrição e 36,5% com sobrepeso e obesidade. Florêncio et al. (13) evidenciaram 19,5% de desnutrição e 25,0% de sobrepeso e obesidade nos adultos residentes em um acampamento de “sem teto” em Maceió. Dados mais recentes apresentados por Marinho et al. (14) em pesquisa com famílias pauperizadas, cadastradas no Programa Comunidade Solidária do Governo Federal Brasileiro, obteve 54,5% das mulheres e 30,7% dos homens com sobrepeso e obesidade. No presente estudo, o excesso de peso também se mostrou mais prevalente entre as mulheres (46,2% vs. 32,6%,  $p<0,001$ ).

TABELA 1  
Razão de prevalência e intervalo de confiança de 95% do excesso de peso de acordo com variáveis socioeconômicas no sexo masculino. Assentamentos subnormais de Maceió/AL-2004

Variáveis	Total	Excesso de peso			RP*	IC95%‡
		Sim		Não		
<b>Idade</b>						
≥ 40 anos	466	197	42,3	269	57,7	1,62 (1,37-1,90)
< 40 anos	696	182	26,2	514	73,8	1,00
<b>Procedência</b>						
Rural	321	124	38,6	197	61,4	1,27 (1,07-1,51)
Urbana	840	255	30,4	585	69,6	1,00
<b>Estado marital</b>						
Sem cônjuge	86	31	36,0	55	64,0	1,25 (0,81-1,92)
Com cônjuge	90	26	28,9	64	71,1	1,00
<b>Emprego</b>						
Sim	585	199	34,0	386	66,0	1,09 (0,92-1,29)
Não	577	180	31,2	397	68,8	1,00
<b>Escolaridade (anos)</b>						
≤8	1013	319	31,5	694	68,5	0,78 (0,63-0,97)
>8	146	59	40,4	87	59,6	1,00
<b>Renda Familiar Bruta<sup>!</sup></b>						
> 1SM	338	131	38,8	207	61,2	1,29 (1,09-1,53)
≤ 1SM	824	248	30,1	576	69,9	1,00

\*RP (Razão de Prevalência); ‡IC95% (Intervalo de Confiança de 95%); !Salário mínimo de referência = R\$ 283,16 - Média dos valores referentes aos meses de setembro de 2004 a abril de 2005 (260,00) e Maio de 2005 a março de 2006 (300,00).

TABELA 2  
Razão de prevalência e intervalo de confiança de 95% do excesso de peso de acordo com variáveis socioeconômicas no sexo feminino. Assentamentos subnormais de Maceió/AL-2004

Variáveis	Total	Excesso de peso			RP*	IC95%‡
		Sim		Não		
<b>Idade</b>						
≥ 40 anos	747	445	59,6	302	40,4	1,55 (1,41-1,69)
< 40 anos	1305	503	38,5	802	61,5	1,00
<b>Procedência</b>						
Rural	960	627	65,3	333	34,7	2,23 (2,01-2,47)
Urbana	1087	319	29,3	768	70,7	1,00
<b>Estado marital</b>						
Sem cônjuge	486	236	48,6	250	51,4	0,99 (0,89-1,11)
Com cônjuge	1083	529	48,9	554	51,1	1,00
<b>Emprego</b>						
Não	1543	724	46,9	819	53,1	1,07 (0,95-1,19)
Sim	509	224	44,0	285	56,0	1,00
<b>Escolaridade</b>						
≤8	1791	856	47,8	935	52,2	1,40 (1,17-1,66)
>8	257	88	34,2	169	65,8	1,00
<b>Renda Familiar Bruta<sup>!</sup></b>						
> 1SM	221	114	51,6	107	48,4	1,13 (0,99-1,30)
≤ 1SM	1831	834	45,6	997	54,4	1,00

\*RP (Razão de Prevalência); ‡IC95% (Intervalo de Confiança de 95%); !Salário mínimo de referência = R\$ 283,16 - Média dos valores referentes aos meses de setembro de 2004 a abril de 2005 (260,00) e Maio de 2005 a março de 2006 (300,00).

TABELA 3  
Razão de prevalência e intervalo de confiança de 95% do excesso de peso de acordo com as condições de moradia no sexo masculino. Assentamentos subnormais de Maceió/AL-2004

Variáveis	Total	Excesso de peso				RP*	IC95%‡
		Sim		Não			
		n	%	n	%		
<b>N.º cômodos</b>							
>4	477	196	41,1	281	58,9	1,54	(1,31-1,81)
≤4	685	183	26,7	502	73,3	1,00	
<b>Banheiro</b>							
Unifamiliar	965	336	34,8	629	65,2	1,60	(1,21-2,11)
Inexistente ou coletivo	197	43	21,8	154	78,2	1,00	
<b>Destino do lixo</b>							
Coleta pública	863	316	36,6	547	63,4	1,73	(1,36-2,20)
Céu aberto	288	61	21,2	227	78,8	1,00	
<b>Esgotamento sanitário</b>							
Esgoto público	78	19	24,4	59	75,6	0,73	(0,49-1,09)
Céu aberto ou Fossa	1082	360	33,3	722	66,7	1,00	
<b>Tipo de construção</b>							
Alvenaria	896	322	36,0	574	64,0	1,68	(1,31-2,15)
Materiais precários	266	57	21,4	209	78,6	1,00	
<b>Abastecimento d'água</b>							
Rede pública	536	189	35,3	347	64,7	1,16	(0,98-1,37)
Outra	625	190	30,4	435	69,6	1,00	
<b>Geladeira</b>							
Sim	804	297	36,9	507	63,1	1,61	(1,31-1,99)
Não	358	82	22,9	276	77,1	1,00	
<b>Televisão</b>							
Sim	927	331	35,7	596	64,3	1,75	(1,34-2,28)
Não	235	48	20,4	187	79,6	1,00	

\*RP (Razão de Prevalência); ‡IC95% (Intervalo de Confiança de 95%).

As prevalências de excesso de peso apresentadas entre os adultos de baixa renda integrantes da amostra se revelaram maiores que as encontradas na última pesquisa de base populacional realizada no Brasil (POF, 2002-2003) (11), em que se estimou para o Nordeste Urbano 38,6% de excesso de peso.

Em relação ao efeito da idade sobre a prevalência de excesso de peso obteve-se resultados que corroboram com a literatura (3,11,15). Homens e mulheres com mais idade (≥ 40 anos) apresentaram maiores chances de terem excesso de peso do que os mais jovens. Segundo dados da POF (11), a prevalência de excesso de peso tende a aumentar com a idade, sendo as maiores prevalências encontradas acima dos 35 anos em ambos os sexos.

No presente estudo, chama à atenção as altas prevalências

de excesso de peso encontradas entre os indivíduos procedentes de áreas rurais, em especial entre as mulheres, cuja associação mostrou-se mais forte (RP=2,23, IC95% 2,01-2,47) que a associação entre os homens (RP=1,27, IC95% 1,07-1,51).

Este número significativo de indivíduos procedentes da zona rural, residentes nos assentamentos subnormais de Maceió, possivelmente encontra-se relacionado ao intenso êxodo rural característico do processo de transição demográfica que vem ocorrendo nos países em desenvolvimento. Em Maceió, este processo migratório foi incrementado pela crise do setor açucareiro, e trouxe para a capital de Alagoas alto grau de exclusão social, elevado índice de subemprego e ocupação desordenada do espaço urbano. (16,17). Este crescimento urbano desenfreado acarretou

TABELA 4

Razão de prevalência e intervalo de confiança de 95% do excesso de peso de acordo com as condições de moradia no sexo feminino. Assentamentos subnormais de Maceió-2004/AL

Variáveis	Total	Excesso de peso				RP*	IC95%‡
		Sim		Não			
		n	%	n	%		
<b>N.º cômodos</b>							
>4	828	424	51,2	404	48,8	1,20	(1,09-1,31)
≤4	1222	523	42,8	699	57,2	1,00	
<b>Banheiro</b>							
Unifamiliar	1714	814	47,5	900	52,5	1,20	(1,04-1,38)
Inexistente ou coletivo	338	134	39,6	204	60,4	1,00	
<b>Destino do lixo</b>							
Coleta pública	1575	749	47,6	826	52,4	1,13	(1,00-1,27)
Céu aberto	457	193	42,2	264	57,8	1,00	
<b>Esgotamento sanitário</b>							
Esgoto público	146	68	46,6	78	53,4	1,01	(0,84-1,21)
Céu aberto ou fossa	1904	880	46,2	1024	53,8	1,00	
<b>Tipo de construção</b>							
Alvenaria	1629	782	48,0	847	52,0	1,22	(1,08-1,39)
Matérias precárias	423	166	39,2	257	60,8	1,00	
<b>Abastecimento d'água</b>							
Rede pública	944	461	48,8	483	51,2	1,11	(1,01-1,22)
Outro	1108	487	43,9	621	56,1	1,00	
<b>Geladeira</b>							
Sim	1441	704	48,9	737	51,1	1,22	(1,10-1,37)
Não	611	244	39,9	367	60,1	1,00	
<b>Televisão</b>							
Sim	1705	809	47,4	896	52,6	1,18	(1,03-1,36)
Não	346	139	40,2	207	59,8	1,00	

\*RP (Razão de Prevalência); ‡IC95% (Intervalo de Confiança de 95%).

mudanças no padrão de vida desta população imigrante, tornando-a vulnerável ao desenvolvimento do excesso de peso.

Alguns autores (18,19) afirmam que o processo de transição demográfica e econômica ao qual estão submetidos muitos países em desenvolvimento, como o Brasil, contribui para mudanças no padrão alimentar, tais como uma tendência a uma dieta densa em energia, rica em gordura saturada e carboidratos refinados, além de um baixo consumo em carboidratos complexos e fibras. Desta forma, o predomínio dessa dieta e ainda o declínio progressivo da atividade física, ambos decorrentes da mudança da zona rural para urbana, estariam possivelmente contribuindo com excesso de peso nos indivíduos procedentes da zona rural integrantes da amostra.

Com relação às variáveis escolaridade e renda, foi observado que o excesso de peso em relação à escolaridade

apresentou associação negativa entre as mulheres e positiva entre os homens, enquanto que em relação à renda a associação, em ambos os sexos, mostrou-se positiva, apesar de estatisticamente significativa apenas no sexo masculino. Monteiro, Conde e Popkin (20), em estudo realizado também na região Nordeste do Brasil em 2001, encontraram resultados bem semelhantes. Os autores relataram na época, que a obesidade feminina mostrava associação positiva com a renda e negativa com a escolaridade, enquanto a obesidade masculina apresentava associação positiva apenas com a renda.

Segundo Sobal & Stunkard, 1989 (7), uma possível explicação para tal comportamento no sexo masculino, seria a menor disponibilidade de alimentos e a maior atividade física encontrada entre os homens de menor renda, o que estaria possivelmente associado as suas precárias condições de

trabalho. Por outro lado, a associação negativa vista entre escolaridade e excesso de peso, como a encontrada nas mulheres, assemelhava-se ao padrão observado em países desenvolvidos, sendo facilmente explicada pela relação existente entre o nível de escolaridade e os conhecimentos sobre alimentação, controle do peso corporal e prática de atividade física. (7).

Na análise das variáveis socioeconômicas e do domicílio, apenas três das oito variáveis estudadas não apresentaram associação com o risco de excesso de peso. Todas as outras variáveis analisadas evidenciam que pequenas melhorias nas condições de moradia e na aquisição de bens de consumo estão associadas ao maior risco de excesso de peso. A esse respeito, vale lembrar que mais de 80% da população estudada subsistia com renda familiar bruta igual ou inferior a um salário mínimo, constituindo um grupo homogêneo dentre os indivíduos de muito baixa renda. Desse modo, mesmo dentro desse grupo tão semelhante, foi possível identificar um diferencial importante quanto à ocorrência de excesso de peso e condições de moradia.

Em uma revisão com 144 estudos publicados até a década de 1980, foi observado que, nos países desenvolvidos, marcadores diversos de posição socioeconômica apresentavam associação inversa com a prevalência de obesidade entre mulheres e ausência de associação no sexo masculino. Ao contrário, em países menos desenvolvidos, observava-se relação direta entre posição socioeconômica e obesidade em ambos os sexos (7). Mc Laren, 2007 (8) em recente revisão encontrou tendência semelhante à anterior, onde entre as mulheres de países de médio a baixo índice de desenvolvimento humano a associação positiva entre condições socioeconômicas e obesidade foram mais comuns, enquanto para o sexo masculino as associações foram não significantes. No entanto, Mc Laren obteve que para alguns indicadores, tais como educação e ocupação, a associação foi mais negativa que positiva, sugerindo que talvez o padrão social de distribuição de peso estivesse em transição. Monteiro et al. (9) em revisão com 14 estudos relacionando obesidade e condições socioeconômicas em países em desenvolvimento encontraram uma tendência ainda de associação positiva no sexo masculino (em 7 dos 14 estudos), enquanto entre as mulheres a maioria dos estudos revelaram uma associação inversa estatisticamente significativa.

O presente estudo evidencia então que melhorias nas condições socioeconômicas, tais como nas condições de moradia, em populações de baixa renda tendem a se comportar como fator de risco para excesso de peso em ambos os sexos, enquanto que a educação se comporta como fator protetor no sexo feminino e a renda como fator de risco do sexo masculino.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Chopra M, Galbraith S, Darnton-Hill I. A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bull World Health Organ* 2002; 80: 952-58.
2. Kain J, Vio F, Albala C. Obesity trends and determinant factors in Latin American. *Cad Saúde Pública* 2003; 19(Suppl1): S77- S86.
3. WHO Consultation on Obesity. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000. WHO Technical Report Series 894.
4. Pérez AP, Muñoz JY, Cortés VB, Velasco PP. Obesity and cardiovascular disease. *Public Health Nutr* 2007; 10: 1156-63.
5. Duncan GJ, Daly MC, McDonough P, Williams DR. Optimal indicators of socioeconomic status for health research. *Am J Public Health* 2002; 92 (7): 1151-57.
6. Wardle J, Waller J, Jarvis MJ. Sex differences in the association of socioeconomic status with obesity. *Am J Public Health* 2002; 92(8): 1299-04.
7. Sobal J, Stunkard AJ. Socioeconomics status and obesity: a review of the literature. *Psychol Bull* 1989; 105: 260-75.
8. McLaren L. Socioeconomic status and Obesity. *Epidemiol Rev* 2007; 29: 29-48.
9. Monteiro CA, Moura EC, Conde WL, Popkin BM. Socioeconomic status and obesity in adult populations of developing countries: a review. *Bull World Health Organ* 2004; 82: 940-46.
10. Monteiro CA, conde WL, popkin BM. Is obesity replacing or adding to undernutrition? Evidence from different social classes in Brazil. *Public Health Nutr* 2002; 5(1A): 105-112.
11. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003. Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2004.
12. Sawaya AL, Dallal G, Solymos G, Sousa MH, Ventura ML, Roberts SB, Sigulem DM. Obesity and malnutrition in a shantytown population in the city of São Paulo, Brazil. *Obes Res* 1995; 3 (Suppl 2): 107s-115s.
13. Florêncio TMMT, Ferreira HS, França APT, Cavalcante JC, Sawaya AL. Obesity and undernutrition in a very-low-income population in the city of Maceió, Northeast Brazil. *Brit J Nutr* 2001; 86: 277-283.
14. Marinho SP, Martins IS, Perestrelo JPP, Oliveira DC. Obesidade em segmentos pauperizados da sociedade. *Rev Nutr* 2003; 16(2): 195-201.
15. Grundy SM. Multifactorial causation of obesity: Implication for prevention. *Am J Clin Nutr* 1998; 67: 563S-72S.
16. Cavalcante VR, Lins RDB, Zacharias PRV. Identificação e caracterização preliminar dos vazios urbanos em Maceió (2003-2004). Relatório técnico. Maceió: UFAL, 2004. 114p.

17. Lira FJ. Potencialidades e ilusão do desenvolvimento do Estado de Alagoas. Maceió: EDUFAL, 2004. 320p.
18. Mondini L, Monteiro CA. Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira (1962-1988). Rev Saúde Pública 1994; 28(6): 433-9.
19. Caballero B, Rubinstein S. Environmental factors affecting nutritional status in urban areas of developing countries. Arch Latinoamer Nutr 1997; 47: S3-S8.
20. Monteiro CA, Conde WL, Popkin BM. Independent Effects of Income and Education on the Risk of Obesity in the Brazilian Adult Population. J Nutr 2001; 131:881S-886S.

Recibido: 09-07-2008

Aceptado: 19-09-2008

# Estado nutricional de preescolares asistentes a la Junta Nacional de Jardines Infantiles de Chile: evaluación de la concordancia entre indicadores antropométricos de obesidad y obesidad central

*Yareni Gutiérrez-Gómez, Juliana Kain, Ricardo Uauy, Marcos Galván, Camila Corvalán*

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile-Chile, División de Ciencias de la Salud, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey-México, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo-México, Departamento de Epidemiología, Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile- Chile

**RESUMEN.** Históricamente, el monitoreo nutricional de los programas de ayuda nutricional infantil ha utilizado indicadores de peso-edad y talla-edad para detectar deficiencias nutricionales. Recientemente, dado el aumento de la obesidad infantil se ha recomendado también incorporar mediciones de peso-talla y de circunferencia de cintura. Sin embargo, en preescolares no está claro cuál es el grado de concordancia existente entre estos indicadores. Los objetivos de este artículo son: reportar el estado nutricional de niños beneficiarios de la Junta Nacional de Jardines Infantiles de Chile y evaluar la concordancia entre medidas antropométricas de obesidad general y obesidad central en este grupo. En 574 niñas y 580 niños entre 3,0 y 5,9 años de edad se midió peso, talla, circunferencia de cintura y de cadera y 5 pliegues. Los puntajes Z se estimaron según los estándares de crecimiento OMS 2006. Se definió obesidad general como  $Z_{P/T}$  ó  $Z_{IMC/E} \geq + 2DE$  y obesidad central como circunferencia de cintura  $\geq$  percentil 90 para el sexo y la edad según NHANES III. La prevalencia de obesidad fue cercana al 16% con ambos indicadores, mientras que la de obesidad central fue 15%. La concordancia entre indicadores antropométricos de obesidad general y central fue buena (Kappa entre 0,6 y 0,7). En conclusión, en niños beneficiarios de un programa de ayuda social chileno se encontró una alta prevalencia de obesidad y obesidad central. En este grupo, existe una buena concordancia entre indicadores antropométricos de obesidad general y obesidad central, lo que sugiere que no se justificaría la incorporación de mediciones de circunferencia de cintura al monitoreo nutricional del programa.

**Palabras clave:** Estado nutricional, antropometría, obesidad, obesidad central, preescolares, Chile, niños de bajos recursos.

**SUMMARY.** Nutritional status of preschool children attending the Chilean National Nursery Schools Council Programs (JUNJI): assessment of the agreement among anthropometric indicators of obesity and central obesity. Historically, the anthropometric assessment of nutritional welfare programs has been targeted to assess nutritional deficiencies based on weight-to-age and height-to-age indicators. Recently, given the increase on childhood obesity, it has been also recommended the measurement of indicators of obesity (i.e. weight-to-height) and central obesity (i.e. waist circumference). However, the agreement of these indicators in preschool children is unclear. The aims of this study were: 1) assess the nutritional status of children attending the Chilean National Nursery Schools Council Program (JUNJI); 2) assess the agreement between general and central obesity anthropometric measurements in these children. In 574 girls and 580 boys, 3.0 to 5.9 years old, we measured: weight, height, waist and hip circumference, and five skinfolds. We used the WHO 2006 growth standards to estimate Z-scores. We defined general obesity as WHZ or BAZ= 2, and central obesity as waist circumference  $\geq$  90 percentile of NHANES III. The participants were on average slightly shorter but considerably heavier and obese than the reference populations. Prevalence of general obesity was close to 16% with both indicators while prevalence of central obesity reached 15%. There was good agreement among general obesity indicators and central obesity indicators (Kappa = 0.6-0.7). In summary, we found a high prevalence of obesity and central obesity among Chilean preschool children beneficiaries of a welfare program. At this age, there was a good agreement among general obesity indicators and central obesity indicators. These results suggest that waist circumferences measurements should not be incorporated to the program.

**Key words:** Nutritional status, anthropometry, waist, obesity, central obesity, preschool children, Chile, low income children.

## INTRODUCCION

La obesidad infantil es un importante problema de salud pública, tanto en países desarrollados como en aquéllos en vías de desarrollo. Actualmente, en las Américas uno de cada 10 niños es obeso y se estima que para el 2010 esta cifra habrá aumentado a 1 de cada 7 niños (1). La obesidad en la infancia tiene un impacto significativo sobre la salud, pues no sólo se asocia a aparición temprana de resistencia a insulina, dislipidemia, disfunción endotelial y diabetes tipo 2 (2,3) sino que también a mayor riesgo de presentar obesidad en la adolescencia y la etapa adulta (4).

La antropometría y las referencias de crecimiento son las herramientas más sencillas y de bajo costo para evaluar el estado nutricional. En niños, los indicadores antropométricos más utilizados se basan en peso y estatura, como peso para la talla y talla para la edad. Recientemente para unificar los criterios con los utilizados en adultos, también se está utilizando el índice de masa corporal (IMC; peso/talla<sup>2</sup>). Estos indicadores sin embargo, tienen la limitante que no diferencian tejido graso de tejido muscular y, lo que es aún más relevante, no dan cuenta de la distribución de la grasa corporal (5). En escolares, adolescentes y adultos, la circunferencia de cintura se ha propuesto como una medida indirecta de obesidad central (6,7) ya que se correlaciona bien con masa grasa abdominal (subcutánea e intraabdominal) y con riesgo cardiovascular (8,9). El uso de este indicador para monitorizar el estado nutricional de poblaciones es atractivo dada la sencillez de su medición, sin embargo es poco probable que su uso cambiaría el manejo clínico en pacientes ya diagnosticados con sobrepeso (10). Cuánto aportaría el uso de circunferencia de cintura por sobre el uso de IMC en la identificación de personas en riesgo cardiometabólico es particularmente dudoso en la edad preescolar donde la evidencia existente en relación a su correlación con grasa abdominal y riesgo cardiovascular es escasa e inconsistente.

En Chile, la obesidad es el problema nutricional más relevante en todas las edades y todos los estratos socio-económicos (11,12), y su disminución, especialmente en los niños menores de 6 años, es uno de los objetivos sanitarios del Ministerio de Salud para el periodo 2000-2010 (13). La Junta Nacional de Jardines Infantiles (JUNJI) es una institución del Estado de Chile creada para entregar educación parvularia integral de calidad y alimentación a niños en situación de pobreza. Como parte de las actividades rutinarias del programa, cada 3 meses se mide el peso y la talla de todos los niños lo que permite no sólo monitorizar el estado nutricional de los preescolares de bajos ingresos de todo el país, sino que también evaluar la respuesta a cualquier intervención que se implemente a nivel local o del país. En el año 2005, uno de cada 10 niños asistentes a la JUNJI era obeso (evaluados por peso/talla), sin embargo no se recolectan otras mediciones

antropométricas que proporcionen información sobre la distribución de grasa corporal, específicamente sobre la prevalencia de obesidad central (14). La JUNJI podría incorporar a sus evaluaciones mediciones de circunferencia de cintura, pero antes de hacerlo es importante no sólo validar la medición sino también tener una estimación de cómo se afectarían los porcentajes de niños detectados con obesidad u obesidad central. Por lo tanto, los objetivos de este artículo son: 1) reportar el estado nutricional de preescolares beneficiarios de la JUNJI; 2) evaluar la concordancia entre medidas antropométricas de obesidad general y obesidad central en estos niños, para valorar el posible impacto de la incorporación de estas mediciones antropométricas en el programa de monitoreo nutricional. Los resultados sobre la validación de circunferencia de cintura como predictor de riesgo cardiovascular en esta población se reportarán en otro artículo (15).

## MATERIALES Y METODOS

**Sujetos:** La muestra de este estudio fue seleccionada a partir del universo de niños de 3,0 a 5,9 años que asistían a jardines infantiles JUNJI (n=54) de 6 comunas del área Sur de Santiago, Chile cuyas características socio-demográficas y situación nutricional era representativa de los beneficiarios del programa a nivel nacional. Fueron invitados a participar en este estudio todos los niños que cumplieron con los criterios de inclusión siguientes: estar matriculado en el jardín en septiembre del 2006, no ser hijo de embarazo gemelar, haber nacido entre las 37-42 semanas de edad gestacional, haber tenido un peso al nacer >2500 g. (en Chile, menos del 5% de los recién nacidos pesa <2500 g al nacer) (16) y ausencia de condiciones físicas o fisiológicas que pudieran afectar severamente el crecimiento. Los apoderados de 1154 niños (~85% del total elegible) accedieron a que sus hijos participaran en este estudio. Los preescolares participantes de este estudio no difirieron significativamente con los niños elegibles que no participaron en el estudio, en términos de edad (43,1 vs. 42,1 meses), sexo (49,7 vs. 48,4% niñas), antropometría al nacer (3471 vs. 3372 g; 50,7 vs. 49,7 cm.) y a los 4 años de edad (17,9 vs. 18,5 kg; 104,1 vs. 105,1 cm.)

Este estudio fue aprobado por la directora general de la JUNJI y el Comité de Ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile.

**Mediciones antropométricas.** La evaluación del estado nutricional y de la composición corporal se hizo con antropometría y se midió: peso, talla, pliegues (subescapular, tríceps, bíceps, suprailíaco y abdominal) y circunferencias (cintura, cadera y pantorrilla). Estas mediciones fueron realizadas por tres nutricionistas (estandarizadas) con ayuda de un codificador. Todas las mediciones se hicieron en los niños con el mínimo de ropa, siguiendo el mismo protocolo. El

peso fue medido con una balanza portátil SECA modelo 770, con capacidad de 200 Kg. y precisión de 100 g. La talla se midió con un estadiómetro portátil HARPENDEEN modelo 603, con capacidad de 200 cm y precisión de 0,1 cm. Los pliegues se determinaron con un caliper Lange con capacidad de 67 mm y precisión de 1 mm. Con el dedo pulgar e índice se tomó el pliegue cutáneo del lado derecho del cuerpo, las mediciones en cada pliegue se realizaron por triplicado y como medida final, se considero el promedio de las tres mediciones. Las circunferencias fueron tomadas con una cinta LUFKIN W606PM con capacidad de 200 cm y una precisión de 0,1 cm. La cintura fue medida en el punto medio entre la última costilla y la cresta ilíaca derecha; la cadera en la parte más amplia de la región glútea, a nivel del trocánter mayor; y la pantorrilla en el punto de circunferencia máxima de ésta.

**Evaluación del estado nutricional y de la composición corporal.** En los niños menores de 61 meses los puntajes Z de peso para la edad (P/E), talla par la edad (T/E), peso para la talla (P/T), índice de masa corporal para la edad (IMC/E) y de los pliegues tríceps y subescapular se calcularon con el software WHO Anthro 2005 (17), siguiendo los nuevos estándares de crecimiento OMS 2006 (24). Hubo 24 (2,0%) niños mayores de 61 meses en los que los puntajes Z se calcularon con el software WHO 2007 SAS macro package (18), siguiendo las nuevas referencias OMS 2007 para niños de 5 a 19 años (19). En estos niños no fue posible estimar los puntajes Z de peso para la talla ya que en la referencia no se encontraba disponible.

El estado nutricional se clasificó como sigue: bajo peso (Z P/E por debajo de -2 desviaciones estándar (DE), emaciación (Z P/T ó Z IMC/E por debajo de -2 DE), talla baja (Z T/E por debajo de -2 DE), talla alta (Z T/E por arriba de +2 DE), sobrepeso (Z P/T ó Z IMC/E por arriba de +1 DE), obesidad (Z P/T ó Z IMC/E por arriba de +2 DE) y la normalidad fue considerada entre -1,99 y +0,99 DE para todos los indicadores excepto para la talla (normalidad T/E entre -1,99 DE y +1,99 DE). Las medianas de los pliegues fueron comparadas con la mediana del estándar OMS 2006 (19).

El porcentaje de grasa se calculó con una fórmula predictiva antropométrica validada en niños preescolares (3-4 años) asistentes a la JUNJI utilizando dilución isotópica (20). La ecuación utiliza edad, sexo, peso, circunferencia de pantorrilla y los pliegues tricpital y bicipital. Los porcentajes de grasa obtenidos fueron comparados con los promedios normativos de la Academia Americana de Pediatría (21).

Se definió obesidad central cuando la circunferencia de cintura se encontraba igual o por sobre el percentil 90, para el sexo y la edad, según la referencia de la Tercera Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de los Estados Unidos (NHANES III) (6). Los valores correspondientes al percentil 90 según edad y sexo se presentan en la Tabla 1.

**TABLA 1**  
Percentil 90 de circunferencia de cintura, punto de corte tomado para definir obesidad central, por edad y sexo de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de los Estados Unidos (NHANES III) (6)

Edad (años)	Cintura P90 (cm)	Cintura P90 (cm)
	Niñas	Niños
3,0-3,99	55,3	54,2
4,0-4,99	58,3	57,6
5,0-5,99	61,4	61,0

P90, Percentil 90

**Análisis estadístico.** Se aplicó el test de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad de las variables, previa verificación de datos y presencia de valores extraños (outliers). Se reportan la mediana y rango intercuartil (RI) de todas las variables para describir la muestra, dada la alta frecuencia de variables sin distribución normal. Para evaluar las diferencias entre niños y niñas se aplicó el test T-Student (variables con distribución normales) y Mann-Whitney (variables con libre distribución) y se consideró significativo un  $p < 0,05$ .

Se determinó la prevalencia de bajo peso, emaciación, talla baja, talla alta, sobrepeso, obesidad y normalidad; las diferencias por sexo se evaluaron utilizando el test Chi cuadrado ó el test exacto de Fisher, según correspondió y se consideró significativo un  $p < 0,05$ . La concordancia entre obesidad general y obesidad central fue calculada con el índice Kappa de Cohen. Usualmente valores  $< 0,20$  son considerados como concordancia pobre, 0,21-0,40 insuficiente, 0,41-0,60 moderada, 0,61-0,80 buena y 0,81-1,00 muy buena (22). Los análisis de datos se hicieron con el paquete estadístico para las ciencias sociales (SPSS) versión 11.5 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA 2002).

## RESULTADOS

Se evaluaron 1154 niños (580 niños, 574 niñas) entre 3,0-5,9 años de edad. Las características antropométricas de la muestra se presentan en la Tabla 2. La edad promedio de los participantes fue un poco más de 4 años, sin diferencias entre niñas y niños ( $p > 0,05$ ). La talla fue mayor en los niños que en las niñas, así como, el tejido muscular y la circunferencia de cintura ( $p < 0,05$ ). Por el contrario, los pliegues cutáneos, el porcentaje de grasa y la circunferencia de cadera fueron mayores en las niñas ( $p < 0,05$ ). Otros indicadores antropométricos no fueron significativamente diferentes por sexo ( $p > 0,05$ ).

TABLA 2  
Características antropométricas de 1154 preescolares asistentes en el año 2006 a jardines infantiles de la Junta Nacional de Jardines Infantiles de Chile, por sexo

Variable	Total n= 1154 Mediana (RI)	Niñas n= 574 Mediana (RI)	Niños n= 580 Mediana (RI)	P*
Edad (años)	4,3 (4,1-4,5)	4,3 (4,1-4,5)	4,3 (4,1-4,5)	0,91
Peso (kg)	17,9 (16,5-19,7)	17,7 (16,4-19,7)	18,0 (16,6-19,8)	0,19
Talla (cm)	104,1 (101,2-107,2)	103,9 (100,9-106,8)	104,3 (101,4-107,6)	0,01
Índice de masa corporal (kg <sup>2</sup> /m)	16,5 (15,6-17,6)	16,5 (15,5-17,7)	16,5 (15,6-17,5)	0,77
Circunferencia de Pantorrilla (cm)	22,6 (21,6-23,8)	22,6 (21,6-23,7)	22,6 (21,6-23,8)	0,66
Circunferencia de Cintura (cm)	52,8 (50,8-55,2)	52,6 (50,6-55,1)	53,0 (51,0-55,3)	0,04
Circunferencia de Cadera (cm)	57,7 (55,5-60,7)	58,0 (56,1-61,2)	57,3 (55,0-60,2)	<0,0001
Relación cintura/cadera	0,91 (0,25-0,94)	0,91 (0,88-0,93)	0,92 (0,90-0,95)	<0,0001
Índice Cintura/Talla	0,51 (0,49-0,53)	0,51 (0,49-0,53)	0,51 (0,49-0,53)	0,49
Pliegue subescapular (mm)	6,0 (5,0-7,3)	6,5 (5,5-8,0)	5,5 (5,0-6,8)	<0,0001
Pliegue tricúspital (mm)	8,5 (7,0-10,7)	9,0 (7,8-11,3)	8,0 (7,0-9,8)	<0,0001
Pliegue bicúspital (mm)	4,3 (3,5-5,7)	4,7 (3,8-6,0)	4,2 (3,3-5,3)	<0,0001
Pliegue abdominal (mm)	8,0 (6,3-10,5)	8,8 (7,0-11,3)	7,0 (5,8-9,3)	<0,0001
Pliegue suprailíaco (mm)	7,2 (6,0-9,8)	8,0 (6,5-10,8)	6,8 (5,5-8,6)	<0,0001
Tejido graso (kg)	3,9 (3,3-4,8)	4,2 (3,6-5,1)	3,7 (3,1-4,4)	<0,0001
Tejido muscular (kg)	13,9 (13,0-15,0)	13,5 (12,7-14,5)	14,3 (13,3-15,4)	<0,0001
Masa Grasa (%)	22,1 (19,9-24,9)	23,8 (21,8-26,5)	20,5 (18,7-22,7)	<0,0001
Z Peso/Talla	0,86 (0,23-1,60)	0,86 (0,22-1,60)	0,87 (0,23-1,59)	0,92
Z Talla/Edad	-0,22 (-0,79-0,40)	-0,20 (-0,75-0,36)	-0,24 (-0,84-0,46)	0,81
Z Peso/Edad	0,43 (-0,15-1,13)	0,41 (-0,14-1,09)	0,46 (-0,18-1,17)	0,65
Z IMC/Edad	0,86 (0,23-1,57)	0,84 (0,21-1,54)	0,89 (0,23-1,60)	0,36
Z Tríceps/Edad	0,17 (-0,41-1,05)	0,22 (-0,38-1,07)	0,15 (-0,42-0,99)	0,19
Z Subescapular/Edad	0,19 (-0,57-1,09)	0,29 (-0,46-1,11)	0,09 (-0,61-0,98)	0,02
Peso/Edad < -2 DE (%)	0,2	0,2	0,2	0,95
Talla/Edad < -2 DE (%)	2,1	2,1	2,1	0,99
Peso/Talla > +1 DE (%)	22,7	25,1	20,3	0,56
Peso/Talla > +2 DE (%)	15,8	15,3	16,2	0,68
Talla/Edad > +2 DE (%)	0,9	0,5	1,2	0,82

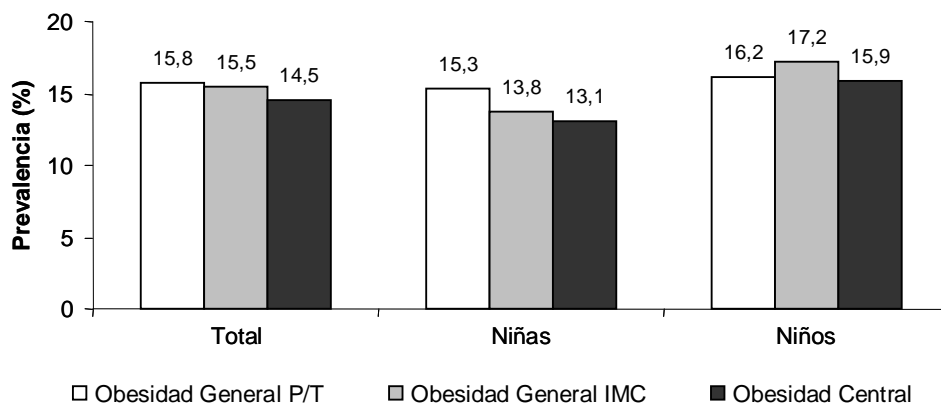
Los n varían levemente para algunas de las mediciones, \*Diferencias por sexo, RI, rango intercuartil (Percentil 25-Percentil 75) Índice de Masa Corporal (IMC= peso/talla<sup>2</sup>), Masa grasa (%), según fórmula predictiva antropométrica que utiliza edad, sexo, peso circunferencia de pantorrilla y los pliegues tríceps y bíceps (27). Puntajes Z estimados en base a OMS 2006.

Al ser comparados con los estándares de crecimiento de la OMS, tanto las niñas como los niños tuvieron un promedio menor de talla ( $Z\ T/E = -0,22$ ), pero mayor de peso ( $Z\ P/E = 0,43$ ). En promedio, los participantes tuvieron mayor adiposidad que las poblaciones de referencia al utilizar como indicador el IMC ( $IMC/E = 0,86$ ) y el porcentaje de grasa corporal (22,1% versus 17,0% en AAP 1988) y en menor medida al utilizar como indicador los pliegues de tríceps ( $Z = 0,17$ ) y subescapular ( $Z = 0,19$ ). La circunferencia de cintura también fue mayor que la mediana de la población de referencia (51,1

cm para uno u otro sexo) (11). En esta muestra no se registró emaciación, mientras que la prevalencia de bajo peso y de baja talla estuvo por debajo de lo esperado en una distribución normal (0,2% y 2,1% versus 2,3%), sin diferencias por sexo ( $p > 0,05$ ). En contraste, sólo el 50% de los niños estudiados tuvieron un P/T dentro de los rangos de normalidad, mientras que la prevalencia de sobrepeso alcanzó un 29% y la de obesidad fue cercana al 16%. La prevalencia de talla alta fue de 0,5% en niñas y 1,2% en niños ( $p > 0,05$ ). En general, el estado nutricional no fue significativamente diferente por sexo ( $p > 0,05$ ).

FIGURA 1

Prevalencia de obesidad general (según peso para la talla e índice de masa corporal para la edad), y obesidad central en 1154 preescolares asistentes en el año 2006 a jardines infantiles de la Junta Nacional de Jardines Infantiles de Chile, por sexo



Obesidad general según P/T: peso para la talla  $\geq +2$  DE, OMS 2006.

Obesidad general según IMC: índice de masa corporal para la edad  $\geq +2$  DE, OMS 2006.

Obesidad central: circunferencia de cintura  $\geq$  Percentil 90, NHANES III (11).

No hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre: las prevalencias de obesidad general P/T e IMC; entre las prevalencias de obesidad general según P/T e IMC y obesidad central; entre las prevalencias de obesidad general y central por sexo.

La prevalencia de obesidad general según P/T e IMC/E, y la prevalencia de obesidad central se presentan en la Figura 1. En el total de la muestra, así como en las niñas, la prevalencia de obesidad general fue menor al utilizar IMC/E que P/T (15,5 vs 15,8 y 13,8 vs 15,3% respectivamente), mientras que en los niños se observó lo opuesto (17,2 vs 16,2%), sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Tanto en niñas como en niños, la prevalencia de obesidad central fue inferior que la de obesidad general según los dos indicadores, aunque estas diferencias no fueron significativas ( $p > 0,05$ ).

La concordancia entre los indicadores antropométricos utilizados para diagnosticar obesidad general y obesidad central se presentan en la Tabla 3.

En ambos sexos, las concordancias entre los indicadores de obesidad general (P/T e IMC) y obesidad central fueron buenas (Kappa entre 0,6 y 0,7).

## DISCUSION

El exceso de peso es el principal problema nutricional de los preescolares evaluados en este estudio. En el análisis se aplicaron diferentes indicadores de obesidad general y obesidad central, y se compararon con referencias internacionales, evidenciando que esta población se encuentra desplazada hacia la adiposidad. Se encontró una alta prevalencia tanto de obesidad general como de obesidad central y se demostró que a esta edad, el índice de concordancia entre ambos diagnósticos es bueno.

TABLA 3

Índice de concordancia (Kappa de Cohen), entre indicadores de obesidad general y obesidad central en 1154 preescolares asistentes en el año 2006 a jardines infantiles de la Junta Nacional de Jardines Infantiles de Chile, por sexo

	Obesidad General: Peso/Talla				Obesidad General: IMC/Edad	
			NO	SI	NO	SI
Total (N=1129)			(N=1153)			
	NO	N (%)	908 (80,4)	56 (5,0)	933 (80,9)	53 (4,6)
Obesidad central:	SI	N (%)	43 (3,8)	122 (10,8)	41 (3,6)	126(10,9)
			Kappa=0,66 (p<0,001)		Kappa=0,68 (p<0,001)	
Niñas ( N=563)			(N=574)			
	NO	N (%)	461 (81,9)	27 (4,8)	477 (83,1)	22 (3,8)
Obesidad central:	SI	N (%)	16 (2,8)	59 (10,5)	18 (3,1)	57 (9,9)
			Kappa=0,69 (p<0,001)		Kappa=0,70 (p<0,001)	
Niños (N=566)			(N=579)			
	NO	N (%)	447 (79,0)	29 (5,1)	456 (78,8)	31(5,4)
Obesidad central:	SI	N (%)	27 (4,8)	63 (11,1)	23 (4,0)	69 (11,9)
			Kappa=0,63 (p<0,001)		Kappa=0,66 (p<0,001)	

Obesidad general según P/T: peso para la talla  $\geq +2$  DE, OMS 2006.

Obesidad general según (IMC/E): índice de masa corporal para la edad  $\geq +2$  DE, OMS 2006.

Obesidad central: circunferencia de cintura  $\geq$  Percentil 90, NHANES III (11).

Para comparar el estado nutricional de nuestra población se utilizó el nuevo estándar de crecimiento y desarrollo infantil de la OMS, que describe cómo los niños deben crecer en un ambiente óptimo, más que definir como los niños crecen en un lugar y tiempo específico (18). Con este estándar se encuentra que la obesidad es un serio problema de salud para estos preescolares, siendo la desnutrición casi inexistente. Éstos resultados son concordantes con lo observado en escolares, adolescentes, y adultos chilenos (11, 12), ubicando a la población Chilena en una fase de post-transición nutricional.

El IMC es una medida de peso ajustada por estatura y por ende, es un método fácil, económico, no invasivo y factible de medir a nivel poblacional (23). Aún cuando el IMC no distingue entre masa grasa y masa libre de grasa, múltiples estudios han mostrado que se correlaciona con medidas directas de adiposidad y con factores de riesgo cardiovasculares (24-26). Actualmente, el IMC es la herramienta más utilizada para evaluar la obesidad en adultos, y recientemente, se ha empezado a generalizar su uso en la evaluación nutricional infantil. Sin embargo, dado que los niños se encuentran en pleno crecimiento, los valores límite del IMC varían con la edad y con el sexo, por lo que para definir el estado nutricional

se deben comparar las mediciones contra una población de referencia. En el caso de obesidad infantil las referencias y valores límite más utilizados son: la del Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) (Z IMC = percentil 95) (27), la del International Obesity Task Force (IOTF) (percentiles de IMC para la edad y sexo asociados al corte de sobrepeso y la obesidad del adulto 25 y 30 kg/m<sup>2</sup>) (28) y la de OMS 2006, que es la utilizada en este estudio (18). Dependiendo de la definición que se utilice la prevalencia de obesidad puede variar de forma importante (29), lo que complica la comparación de resultados entre diferentes estudios.

Numerosos estudios reportan que adiposidad central en niños escolares y adolescentes se asocia con mayor riesgo cardiovascular (8,9); sin embargo, en preescolares esta asociación aún no es clara. El indicador antropométrico más utilizado para definir obesidad central es la circunferencia de cintura. Diferentes sitios anatómicos han sido usados para medir la circunferencia de cintura, pero los sitios más utilizados son el punto medio entre la última costilla y la cresta ilíaca, la parte más estrecha de la cintura y la medida de la cintura a nivel del ombligo (10). Recientemente, en una población de niños británicos se encontró que existe una alta

correlación entre los 3 métodos más utilizados para medir circunferencia de cintura (30). Sin embargo, para poder hacer una recomendación definitiva es necesario comparar los diferentes métodos contra un estándar de oro de distribución de grasa corporal (Ej. Resonancia Nuclear Magnética) o contra indicadores funcionales como factores de riesgo cardiovascular. El índice cintura-talla mayor a 0,5 también ha sido propuesto como indicador de obesidad central y predictor de riesgo cardiovascular (31), sin embargo, en niños menores de 6 años, este valor límite podría sobrestimar el número de niños considerados en riesgo (7). Un ejemplo de esto, es que si se hubiera utilizado este valor límite en la presente muestra, el 70% de los niños hubiera sido calificado con obesidad central (en contraste con el 14,5% detectado utilizando sólo circunferencia de cintura).

En este estudio, se encontró buena concordancia entre los indicadores antropométricos de obesidad general (P/T, IMC/E) y obesidad central (cintura > P90). La maduración y evolución de las diferentes partes del cuerpo humano no se producen siempre de una forma armónica, por lo que la propia morfología del preescolar podría explicar el hecho que la circunferencia de cintura no esté midiendo distribución de grasa corporal a esta edad (32,33). En análisis realizados en una submuestra de estos niños utilizando indicadores inflamatorios y de riesgo cardio-metabólicos se encontró que el IMC y la circunferencia de cintura predicen de forma muy similar el riesgo cardiovascular lo que apoyaría esta hipótesis (15). Un estudio de niños preescolares brasileños de bajos ingresos también ha reportado que la circunferencia de cintura no es un buen predictor de riesgo cardiovascular medido por perfil lipídico y presión sanguínea (34). Otros estudios realizados en diferentes poblaciones de niños preescolares son necesarios para confirmar estos hallazgos. Actualmente, en la JUNJI se realizan mediciones de peso y talla que fácilmente podrían utilizarse para calcular el IMC de los niños; adicionalmente, las mediciones de talla permitirían tener una idea más detallada del estado nutricional de los niños. En contraste, si se incorporara la medición de cintura al programa de la JUNJI, se tendría que sensibilizar, capacitar y estandarizar a todo el personal en la toma de esta medición. Se considera que este esfuerzo no se justifica ya que estos resultados indican que al medir obesidad con IMC, sólo el 4% de los niños con obesidad central no serían detectados.

En conclusión, en la presente muestra se encontró una alta prevalencia de obesidad general y obesidad central. Esto es relevante desde un punto de vista de salud pública, dado que la obesidad se asocia a diversas complicaciones biológicas, psicológicas y sociales en esta etapa y existe el riesgo que se perpetúe en la etapa adulta. En este estudio se demuestra que la obesidad y obesidad central tienen buena concordancia a esta edad, por lo que no se justificaría la incorporación de mediciones de circunferencia de cintura en el programa. En

cambio, el programa debería focalizarse en asegurar la calidad de las mediciones de peso y talla que se realizan y en la implementación de los estándares de crecimiento de la OMS como parte central del monitoreo del estado nutricional de los beneficiarios. El contar con un adecuado sistema de monitoreo del estado nutricional es el paso inicial para evaluar modificaciones en la dieta y/o en el componente de actividad física y/o en los contenidos educacionales, etc. que se implementen en el programa para revertir la epidemia de obesidad de los niños beneficiarios.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Junta Nacional de Jardines Infantiles por haber permitido la realización de este estudio y a los niños y sus familias que participaron en este estudio.

## REFERENCIAS

1. Wang Y, Lobstein T. Worldwide trends in childhood overweight and obesity. *Int J Pediatr Obes* 2006;1: 7-10.
2. Reinehr T, Kiess W, de Sousa G, Stoffel-Wagner B, Wunsch R. Intima media thickness in childhood obesity: relations to inflammatory marker, glucose metabolism, and blood pressure. *Metabolism* 2006; 55(1):113-118.
3. Nathan B, Moran A. Metabolic complications of obesity in childhood and adolescence: more than just diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 2008; 15:21-29.
4. Dehghan M, Akhatar-Danesh N, Merchan A. Childhood obesity, prevalence and prevention. *Nutr J* 2005; 4:24.
5. Dietz W, Bellizzi M. Introduction: the use of body mass index to assess obesity in children. *Am J Clin Nutr* 1999; 70 (suppl):123S-125S.
6. Fernández J, Redden D, Pietrobelli A, Allison D. Waist circumference percentiles in nationally representative samples of African-American, European-American and Mexican-American children and adolescents. *J Pediatr* 2004;145: 439-444.
7. Li C, Ford E, Mokdad A, Cook S. Recent trends in waist circumference and waist-height ratio among US children and adolescents. *Pediatrics* 2006; 118: 1390-1398.
8. Savva S, Tornaritis M, Savva M, Kourides Y, Panagi A, Silikiotou N, et al. Waist circumference and waist-to-height ratio are better predictors of cardiovascular disease risk factors in children than body mass index. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(11):1453-1458.
9. Sung R, Yu C, Choi K, McManus A, Li A, Xu S, et al. Waist circumference and body mass index in Chinese children: cut-off values for predicting cardiovascular risk factors. *Int J Obes* 2007; 31(3):550-558.
10. Klein S, Allison D, Heymsfield S, Kelley D, Leiflé R, Nonas C, et al. Waist circumference and cardiometabolic risk: a consensus statement from Shaping America's Health: Association for Weight Management and Obesity Prevention; NAASO, The Obesity Society; the American Society for Nutrition; and the American Diabetes Association. *Am J Clin Nutr* 2007; 85:1197-1202.

11. Kain J, Lera L, Rojas J, Uauy R. Obesidad en preescolares de la Región Metropolitana de Chile. *Rev Méd Chile* 2007; 135 (1):63-70.
12. Vio F. Prevención de la obesidad en Chile. *Rev Chil Nutr* 2005; 32:80-87.
13. MINSAL, Ministerio de Salud. Los objetivos sanitarios para la década 2000-2010. Gobierno de Chile 2002.
14. JUNJI, Junta Nacional de Jardines Infantiles. Evaluación del estado nutricional programa jardín infantil. Diagnóstico y resultados año 2004. Chile, 2005:1-13.
15. Corvalán C, Uauy R, Kain J, Martorell R. Inflammatory and cardio-metabolic correlates of obesity in low-income preschool children. *Submitted*.
16. González R, Merialdi M, Lincetto O, Lauer J, Becerra C, Castro R, et al. Reduction in neonatal mortality in Chile between 1990 and 2000. *Pediatrics* 2006; 117:e949-e954.
17. WHO World Health Organization. WHO Anthro 2005 software. Geneva, Switzerland, 2005.
18. OMS, Organización Mundial de la Salud. Patrones de crecimiento infantil de la OMS. Longitud/estatura para la edad, peso para la edad, peso para la longitud, peso para la estatura e índice de masa corporal para la edad: Métodos y desarrollo. Ginebra, 2006.
19. WHO, World Health Organization. The WHO 2007 SAS Macro Package. Geneva, Switzerland, 2007.
20. Velásquez M, Salazar G, Vio F, Díaz N, Anziani A. Validación de ecuaciones antropométricas para evaluar composición corporal en niños preescolares chilenos *Rev Méd Chile* 2008; 136: 433-41
21. AAP, American Academy of Pediatrics. Comité on Nutrition. *Pediatric Nutrition Handbook* 2nd ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 1985:346.
22. Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33:159-174.
23. Must A, Anderson S. Body mass index in children and adolescents: considerations for population-based applications. *Int J Obes* 2006; 30:590-594.
24. Widhalm K, Schönegger K, Huemer C, Auterith A. Does the BMI reflect body fat in obese children and adolescents? A study using the TOBEC method. *Int J Obes* 2001; 25:279-285.
25. Freedman D, Dietz W, Srinivasan S, Berenson G. The relation of overweight to cardiovascular risk factors among children and adolescents: The Bogalusa Heart Study. *Pediatrics* 1999; 103:1175-1182.
26. Pietrobelli A, Faith M, Allison D, Gallagher D, Chiumello G, Heymsfield S. Body mass index as a measure of adiposity among children and adolescents: a validation study. *J Pediatr* 1998; 132:204-210.
27. Kuczmarski R, Ogden C, Guo S, Grummer-Strawn L, Flegal K, Mei Z, et al. 2000 CDC growth charts for the United States: Methods and development. *National Center for Health Statistics. Vital Health Stat* 2002;11: 1-190.
28. Cole T, Bellizzi M, Flegal K, Dietz W. Establishing a Standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320:1-6.
29. Kain J, Uauy R, Vio F, Albala C. Trends in overweight and obesity prevalence in Chilean children: comparison of three definitions. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56:200-204.
30. Rudolf M, Walker J, Cole T. What is the best way to measure waist circumference? *Int J Pediatr Obes* 2007; 2:58-61.
31. McCarthy H, Ashwell M. A study of central fatness using waist-to-height ratios in UK children and adolescents over two decades supports the simple message 'Keep your waist circumference to less than half your height'. *Int J Obes* 2006; 30:988-992.
32. Bogin B. Basic principles of human growth. In: Bogin B editor, *Patterns of Human Growth*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cambridge University Press 1999, UK.
33. Cameron N. The biology of growth. In: Barker Dj, Bergmann RL, and Ogra PL editors, *The window of opportunity: pre-pregnancy to 24 months of age*. Nestlé Nutrition Workshop Series Pediatric Program Vol.61. Nestec Ltd., Vevey, Karger AG, Basel, 2008, Switzerland.
34. Sarni RS, de Souza FI, Schoeps D de O, Catherino P, de Oliveira MC, Pessotti CF, et al. Relationship between waist circumference and nutritional status, lipid profile and blood pressure in low socioeconomic level pre-school children. *Arq Bras Cardiol* 2006; 87:1-6.

Recibido:22-09-2008

Aceptado: 20-01-2009

## Estado nutricional de la población mayor de Cataluña de diferentes niveles asistenciales

*Pilar Jürschik Jiménez, Joan Torres Puig-gros, Román Solá Martí, Carmen Nuin Órreo, Teresa Botigué Satorra*

Escuela de Enfermería de la Universidad de Lleida

**RESUMEN.** Los objetivos de este estudio fueron evaluar la prevalencia de desnutrición a través de la Mini Encuesta Nutricional del Anciano (MNA) en la población mayor de Lleida (Cataluña) de diferentes niveles asistenciales y valorar si dicha escala es un buen método de monitorización en nuestro medio. Para ello se diseñó un estudio transversal en el que se incluyeron personas de ambos sexos, igual o mayores de 65 años, procedentes del centro de salud, del hospital de agudos de la residencia asistida y de centros socio-sanitarios. Se utilizó la MNA en su versión corta (cribado) y versión íntegra (MNA total). Este cuestionario está diseñado para la valoración nutricional de los individuos mayores tanto a la admisión en hospitales e instituciones como para la monitorización durante su estancia. Se incluyeron 398 individuos (184 hombres), con una edad media de 77 años. Según las categorías de la MNA, la prevalencia de desnutrición del total de la muestra fue del 22,6% y de riesgo de desnutrición del 35,4%. La MNA ha sido validada en nuestro medio obteniendo una sensibilidad del 77% y una especificidad del 70%. Se podría afirmar como conclusión que existe una elevada prevalencia de riesgo de desnutrición y desnutrición establecida en Cataluña sobretodo en los centros socio-sanitarios y en el servicio de medicina interna del hospital de agudos. Los resultados son similares a otros estudios contrastados. La MNA es una herramienta útil para el monitoreo nutricional en los distintos niveles asistenciales tanto en el cribado como en su versión íntegra.

**Palabras clave:** Nutrición, Mini encuesta Nutricional del Anciano (MNA), centros asistenciales, personas mayores.

### INTRODUCCION

En la actualidad, España posee una de las más altas expectativas de vida: 78 años en hombres y 84 años en mujeres. El principal objetivo es que esta mayor expectativa de vida vaya acompañada de una mayor esperanza de salud y calidad de vida. Es por ello que cada vez adquieren mayor importancia los problemas de salud de la gente mayor. Entre dichos problemas está la desnutrición que es considerada uno de los grandes síndromes geriátricos.

Una realidad actual es que no existen recursos disponibles para evaluar el estado de nutrición de todos los pacientes que acuden a los diferentes centros asistenciales. Por ello, se

**SUMMARY. Nutritional status of Catalonia's elderly people with different health care needs.** The aims of this study were to assess the prevalence of malnutrition through the Mini Nutritional Assessment (MNA) in the elder population of Lleida (Catalonia) from different levels of care and to determine if that scale is a good way of monitoring our population. A cross-sectional study was designed. It included men and women of 65 years or more users of primary health care centre, the acute hospital, nursing home and health and assisted social services. The MNA was used in your short form (MNA-SF) and MNA total (MNA). This questionnaire is designed to screen the nutritional status of elderly people, when they arrived to the hospital and during their stay. Three hundred and ninety-eight individuals (184 men) were included aging 77 on average. According to the categories of the MNA, the prevalence of malnutrition of the total sample was 22.6% and risk of malnutrition of 35.4%. The MNA has been validated in our population getting a sensitivity of 77% and specificity of 70%. In conclusion, it can be affirmed that there was a high prevalence of undernourishment, foremost in health and social care services and in the medicine service of acute hospital. The MNA is a useful tool for monitoring nutritional care at different levels in both the short form and in total form.

**Key words:** Nutrition, Mini Nutritional Assessment, health care services, elderly.

debería utilizar herramientas de cribado que permitan llevar a cabo una valoración inicial encaminada a detectar precozmente los pacientes desnutridos o en riesgo de desarrollar desnutrición para remitirlos a una valoración nutricional más específica e instaurar, si es preciso, un plan de tratamiento nutricional. En definitiva, seleccionar rigurosamente los pacientes que se pueden beneficiar de un tratamiento nutricional (1,2).

La Mini encuesta Nutricional del Anciano (MNA) fue diseñada para ser un instrumento rápido, económico y no invasivo para el monitoreo nutricional de las personas mayores tanto en el ingreso como durante la estancia en hospitales o instituciones (3). La encuesta ha sido utilizada en hospitales, en cuidados domiciliarios, en residencias geriátricas y en la comunidad, tal y como se puede ver en la Tabla 1 (4-38).

TABLA 1  
Estado nutricional en la población mayor de diferentes niveles asistenciales

Nivel Asistencial	Autor	Año	Lugar	n	Puntuación MNA			Estado nutricional insatisfactorio	
					< 17	17-23,5	≥ 24		
CENTRO DE SALUD	Guigoz <sup>4</sup>	1994	USS	330	1	18	81	19	
	De Grott <sup>5</sup>	1998	Europa	1161	1	44	55	45	
	Maaravi <sup>6</sup>	2000	Israel	605	1	8	91	9	
	Grupo invest <sup>7</sup>	2001	España	3460	3	40	57	43	
	Soini <sup>8</sup>	2004	Fidlandia	51	0	47	52	47	
HOSPITAL DE AGUDOS	Pertoldi <sup>9</sup>	1996	Suiza	166	15	33	52	48	
	Cohendy <sup>10</sup>	1999	Francia	408	7	25	68	32	
	Azad N <sup>11</sup>	1999	Canadá	152	3	43	54	46	
	Murphy <sup>12</sup>	2000	Inglaterra	49	16	47	37	63	
	Gazotti <sup>13</sup>	2000	Bélgica	175	22	48	30	70	
	Fanello <sup>14</sup>	2000	Francia	71	31	49	20	80	
	Beck <sup>15</sup>	2001	Dinamarca	61	0	38	62	38	
	Persson <sup>16</sup>	2002	Suecia	80	26	56	8	82	
	Araujo <sup>17</sup>	2004	México	85	19	42	39	61	
	Gomez <sup>18</sup>	2005	España	200	50	38	12	88	
	Jukkola <sup>19</sup>	2005	Australia	200	30	42	28	72	
	Izaola <sup>20</sup>	2005	España	145	68	30	2	98	
	Gutiérrez <sup>21</sup>	2007	México	97	19	50	31	69	
	<i>* Sin enfermedad aguda</i>								
RESIDENCIA GERIATRICA	Fulöp <sup>22</sup>	1999	Canadá	23	17	70	13	87	
	Lauque <sup>23</sup>	2000	Francia	88	32	47	21	79	
	Saletti <sup>24</sup>	2000	Suecia	872	36	48	16	84	
	Giepp <sup>25</sup>	2000	Bélgica	81	2	37	39	61	
	Beck <sup>26</sup>	2002	Dinamarca	66	32	55	13	87	
	Saava <sup>27</sup>	2002	Estonia	51	27	10	37	63	
	Suominen <sup>28</sup>	2004	Finlandia	23	0	86	14	86	
	Choon <sup>29</sup>	2005	Singapore	43	10	72	18	82	
	Cairella <sup>30</sup>	2005	Italia	237	5	60	35	65	
	Ruiz-Lopez <sup>31</sup>	2005	España	89	8	62	30	70	
	Abajo <sup>32</sup>	2008	España	50	6	12	82	18	
	UNIDADES SOCIO SANITARIAS	Wissing <sup>**33</sup>	1999	Suecia	70	3	46	51	49
		Thomas <sup>**34</sup>	2002	USS	104	29	63	8	92
		Visvanathan <sup>**35</sup>	2003	Australia	215	5	38	57	43
Arellano <sup>**36</sup>		2004	Barcelona	118	46	47	7	93	
Ricart <sup>**37</sup>		2004	España	104	20	52	28	93	
Soini <sup>**8</sup>		2004	Finlandia	178	3	48	49	50	
Neuman <sup>**38</sup>		2005	Australia	133	53	47	53	53	

\* Cuidados domiciliarios. \*\* Media estancia.

Resulta muy difícil conocer de manera fiable la prevalencia real de desnutrición en España. Mientras que el estudio de Esteban y cols (39), refleja una prevalencia de desnutrición del 9,1% en adultos mayores institucionalizados y del 50,5% en la población mayor hospitalaria de larga estancia, parece ser que dicha prevalencia se situaría por debajo del 3% en la población que vive en la comunidad (40,41).

En Cataluña, Salvá y cols (42) investigaron el comportamiento de la MNA en tres muestras diferentes de personas de edad avanzada. El resultado fue que a nivel domiciliario la prevalencia de desnutrición (MNA < 17) era del 0,5%, en residencia geriátrica del 6% y en la unidad de media estancia del 33%.

Otros estudios españoles en los que se ha utilizado el MNA

para la valoración nutricional muestran un 50 y un 68% de desnutridos a nivel hospitalario (18,20), un 6 y 8% en régimen de institucionalización (32,31), un 46% en unidad de convalecencia (36) y un 20% en cuidados domiciliarios (37).

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la prevalencia de desnutrición a través de la MNA en la población mayor de Lleida (Cataluña) de diferentes niveles asistenciales y valorar si dicha escala es un buen método de monitorización en nuestro medio.

## MÉTODOS

Se diseñó un estudio epidemiológico transversal en el que se incluyeron personas de ambos sexos igual o mayores de 65 años, procedentes de Instituciones de diferentes niveles asistenciales: centros de salud, hospital de agudos (servicio de medicina interna y cirugía general) residencias asistidas y centros sociosanitarios (larga y media estancia) todos ellos ubicados en la ciudad de Lleida.

Por motivo de operatividad y viabilidad del estudio, se siguieron unos criterios para elegir un centro de cada tipo: en primer lugar, la magnitud, (a más magnitud, más oportunidad de elección y mayor representatividad), en segundo lugar, las posibilidades de las Instituciones de colaborar en el estudio y finalmente, la existencia de enfermeros/as preparados para poder participar en la recogida de datos. La información se obtuvo entre octubre de 2003 y julio de 2004.

Se incluyeron en el estudio los sujetos susceptibles de poder ser evaluado su estado nutricional a través del MNA al ingreso y/o durante su estancia en el centro. Se excluyeron aquellas personas a las que por su estado cognitivo no se podía aplicar el test, a las que no era posible obtener información subrogada de familiares y cuidadores en el caso que se necesitara y aquellas que presentaban un estado terminal o estaban con tratamiento paliativo. El método de muestreo fue no probalístico por cuotas de edad y sexo respetando las proporciones de esta población atendida en cada tipo de centro y nivel asistencial.

Las variables utilizadas en el presente estudio fueron además de la MNA, las principales patologías, el IMC y datos bioquímicos.

El formato de encuesta MNA utilizado fue la que proponen sus autores y que está accesible en su versión en castellano en la página Web de Nestlé Nutrition Services (43). La valoración total de la escala MNA es de 30 puntos. Si  $< 17$  puntos se considera desnutrición, entre 17-23,5 puntos riesgo de desnutrición y  $= 24$  puntos bien nutridos.

La primera parte de la MNA corresponde al cribado o versión corta cuya valoración total es de 14 puntos. Se considera que si la puntuación es  $= 12$  puntos, no hace falta seguir con la valoración ya que es signo de buena nutrición. Si la puntuación es  $< 11$  puntos, existe una posible desnutrición

y se ha de continuar con la evaluación completa. La evaluación nutricional se realizó de forma íntegra (cribado y MNA total) a todos los sujetos integrados en la muestra.

Para facilitar la comparación de resultados con otros autores y para el análisis de validación de la MNA, se definió que los individuos con estado nutricional satisfactorio eran aquellos que tenían una puntuación en la escala MNA  $= 24$  puntos (bien nutridos) y con estado nutricional insatisfactorio  $< 23,5$  puntos (riesgo de desnutrición y desnutridos).

La medida del peso se realizó en una báscula convencional con el sujeto con la mínima ropa posible y sin zapatos. Para el cálculo del peso en personas que no podían mantener la bipedestación, se utilizó un sillón báscula (hospital de agudos y residencia asistida) o una báscula grúa (centros de media y larga estancia). En aquellos individuos que no fue posible medir la altura, se utilizó la medida alternativa del largo del brazo (LB) (44-46) utilizando la siguiente fórmula: mujeres:  $1,35 \times \text{medida del LB (cm.)} + 60,1$  y hombres:  $1,40 \times \text{medida del LB (cm.)} + 57,8$ .

El procesamiento de las muestras para la analítica se realizó en el laboratorio del hospital de agudos. La recogida de las muestras sanguíneas, traslado y procesamiento se realizó según el protocolo de cada centro.

Se compararon las tres categorías del MNA (mal nutridos, riesgo de malnutrición y bien nutridos) a través de la prueba del  $X^2$ .

Se estudió también la asociación del resultado obtenido en el MNA con el Sistema de Control nutricional (CONUT) descrita por Ulíbarri y cols (47), basada en tres parámetros, dos de ellos bioquímicos (albúmina sérica y colesterol) y uno inmunológico (linfocitos totales). La albúmina sérica se utiliza como indicador de las reservas proteicas, el colesterol como parámetro de la evaluación del aspecto calórico de la desnutrición y los linfocitos totales como parámetro relacionado con la depleción proteica y expresivo de la pérdida de defensas inmunitarias a consecuencia de la desnutrición. Como resultado se obtiene una clasificación del grado de desnutrición en normal, leve, moderada y grave.

El CONUT es un sistema integrado que permite el diagnóstico precoz y evolutivo de desnutrición con sensibilidad y especificidad elevadas (92,3 y 85 respectivamente). Se utilizó dicho instrumento en la validación porque el CONUT lo componen parámetros nutricionales que no se valoran en la MNA y porque al igual que el MNA permite agrupaciones de variables con diferente peso específico.

Para el estudio de la diferencia de medias entre los grados de desnutrición según la MNA y los distintos grados de desnutrición según las variables del CONUT (albúmina, colesterol y linfocitos) se utilizó el análisis de la varianza. La asociación entre los resultados de la herramienta CONUT con los de la MNA se estudió mediante el test de  $X^2$ . Posteriormente se evaluó la sensibilidad y especificidad del MNA utilizando

la herramienta CONUT como estándar de oro mediante dos categorías: desnutrición (leve, moderada, grave) y bien nutrido y las dos categorías del MNA: satisfactorio (= 24 puntos) e insatisfactorio (< de 23,5 puntos). En todos los casos se consideraron significativos los valores de  $p < 0,05$ . Los análisis se realizaron con la ayuda del programa SPSS v. 14,5.

## RESULTADOS

El total de la muestra fue de 398 individuos. De éstos 184 eran hombres (46,2%) y 214 mujeres (53,8%), con una media de edad de 77 años (DE: 7,2) La Tabla 2 muestra las características principales de los encuestados.

TABLA 2  
Descripción de la muestra

Variable		n= 398
Edad (años)	Media (SD)	76,9±7,2
Sexo	Hombres	46,2 %
	Mujeres	53,8 %
Nivel asistencial		
• Centros sociosanitarios	Larga estancia	14,8 %
	Media estancia	9,8 %
• Residencia geriátrica		10,6 %
• Hospital de agudos	Medicina interna	24,4 %
	Cirugía	15,6 %
• Centro de salud		24,9 %
Talla (cm)	Media (SD)	158,2 ± 9,6
Peso	Media (SD)	68,8 ± 13,5
IMC (peso/talla <sup>2</sup> )	Media (SD)	27,7 ± 5,0
	IMC < 22	12,3 %
	IMC 22-27	36,2 %
	IMC > 27	51,5 %
Albúmina (g/dl)	Media (SD)	3,6 ± 0,5
	< 35	37,0 %
Colesterol (mg/dl)	Media (SD)	186 ± 51,5
	< 180	45,7 %
Recuento linfocitos (RTL) cel/mm <sup>3</sup>	Media (SD)	1.881 ± 960
	< 1.600	41,0 %

Los antecedentes patológicos más frecuentes fueron la hipertensión (56,8%), las enfermedades osteoarticulares (35,4%) y las enfermedades del corazón (36,6%) y los motivos más frecuentes por los que acudían al centro asistencial fueron el accidente vascular cerebral (16,6%), la neoplasia (10,8%) y el control de la patología crónica en los sujetos que acudían al centro de salud (24,3%).

La fase de cribado del MNA detectó a 246 (61,8%) usuarios en posible riesgo de desnutrición. La prevalencia del estado nutricional del total de la muestra según las categorías de la MNA fue del 22,6% de desnutridos, el 35,4 % de riesgo de desnutrición y el 42% de bien nutridos. La prevalencia de los distintos niveles asistenciales está reflejada en la Tabla 3.

En la Tabla 4 se presentan las medias de los valores de las dos categorías del cribado y las tres categorías del estado nutricional del MNA total según las variables de la CONUT. Se observa que a medida que aumenta el grado de desnutrición, los valores de albúmina, colesterol y linfocitos totales descienden.

En la Tabla 5 se presentan los porcentajes de las categorías MNA para los distintos grados de nutrición según las categorías de la CONUT, encontrándose que la relación entre ambas valoraciones es significativa.

La sensibilidad y especificidad para el MNA versión íntegra y cribado frente a CONUT, se puede ver en las Tablas 6 y 7.

TABLA 3  
Prevalencia (%) e intervalo de confianza del 95% de las categorías de la MNA según el nivel asistencial

Nivel asistencial	Desnutridos (MNA<17)		Categorías MNA Riesgo desnutrición (MNA 17-23,5)		Bien nutridos (MNA>24)	
	n(%)	IC 95%	n(%)	IC 95%	n(%)	IC 95%
CAP	0 (0,0)	0	15 (15,2)	-3,0-33,4	84 (84,8)	77,1-92,5
Residencia	8 (19,0)	-8,2-46,2	19 (45,2)	22,8-67,6	15 (35,7)	11,5-59,9
Cirugía	4 (6,5)	-17,7-30,7	22 (35,5)	15,5-55,5	36 (58,1)	42,0-72,2
Medicina	25 (25,8)	8,6-43,0	44 (45,4)	30,7-60,1	28 (28,9)	12,1-45,7
Med E.	20 (51,3)	29,4-73,2	16 (41,0)	16,9-65,1	3 (7,7)	-22,5-37,9
Larga E.	33 (55,9)	39,0-72,8	25 (42,4)	23,0-61,8	1 (1,7)	-23,6-27,0
Total	90 (22,6)	14,0-31,2	141 (35,4)	27,5-43,3	167 (42)	34,5-49,5

TABLA 4  
Media y DE de las variables de CONUT según las categorías del MNA (cribado y MNA total)

	Riesgo desnutrición	Bien nutridos	Desnutridos (1) n=90	Riesgo desnutrición (2) n=141	Bien nutridos (3) n=167
Albúmina	3,4 ± 0,6	3,9 ± 0,5***	3,2 ± 0,5	3,5 ± 0,5	3,9 ± 0,5*** <sup>1,2</sup>
Colesterol	180 ± 55	196 ± 44**	173 ± 60	182 ± 49	196 ± 47** <sup>1</sup>
Linfocitos	1775 ± 1044	2038 ± 780*	1732 ± 1300	1751 ± 768	2053 ± 829* <sup>2</sup>

\* p < 0,01; \*\* p < 0,001; p < 0,0001 Análisis de la varianza con el test bonferroni. \*<sup>1,2</sup>: Diferencias significativas con MNA (1) y MNA (2).  
\*<sup>1</sup> Diferencias significativas con MNA (1) \*<sup>2</sup> Diferencias significativas con MNA (2)

TABLA 5  
Porcentaje de los grados de desnutrición según CONUT en las diferentes categorías del MNA

		Cribado MNA			Total MNA	
		Riesgo desnutrición	Bien nutridos	Desnutridos	Riesgo desnutrición	Bien nutridos
		n %	n %	n %	n %	n %
Albumina	Grave	9 (5,1)	2 (1,7)	5 (7,7)	3 (3,0)	3 (2,3)
	Moderado	27 (15,4)	2 (1,7)	16 (24,6)	10 (10,1)	3 (2,3)
	Leve	52 (29,7)	17 (14,3)	20 (30,8)	34 (34,3)	15 (11,5)
	Normal	87 (49,7)	98 (82,4)	24 (36,9)	52 (52,5)	109 (83,8)
Colesterol	Grave	5 (2,9)	2 (1,7)	3 (4,6)	2 (2,0)	2 (1,5)
	Moderado	24 (13,7)	13 (10,9)	10 (15,4)	11 (11,1)	16 (12,3)
	Leve	63 (36,0)	30 (25,2)	29 (44,6)	33 (33,3)	31 (23,8)
	Normal	83 (47,4)	74 (62,2)	23 (35,4)	53 (53,5)	81 (62,3)
Linfocitos	Grave	20 (11,4)	7 (5,9)	8 (12,3)	13 (13,1)	6 (4,6)
	Moderado	30 (17,1)	7 (5,9)	15 (23,1)	12 (12,1)	10 (7,7)
	Leve	35 (20,0)	19 (16,0)	12 (18,5)	26 (26,3)	16 (12,3)
	Normal	90 (51,4)	86 (72,3)	30 (46,2)	48 (48,5)	98 (75,4)

TABLA 6  
Relación de los resultados según el CONUT y el cribado MNA

		Grado desnutrición CONUT		Total
		Desnutrición	Normal	
CRIBADO	Possible desnutrición	123	51	174
	Bien nutrido	36	82	118
Total		159	133	292

$X^2 = 45,773$ ;  $p = 0,000$     Sensibilidad 77%, Especificidad 61%    VP (-) 69%, VP (+) 70%

TABLA 7  
Relación de los resultados según el CONUT y el MNA total

		Grado desnutrición CONUT		Total
		Desnutrición	Normal	
MNA TOTAL	Insatisfactorio	123	40	163
	Satisfactorio	36	93	129
Total		159	133	292

$X^2 = 65,655$ ;  $p < 0,000$     Sensibilidad = 77%, Especificidad: 70%    VP (+) 75%, VP (-) 72%

## DISCUSION

Llama la atención las diferencias de prevalencia de desnutrición según el nivel asistencial estudiado. Los niveles asistenciales que poseían mayor porcentaje de desnutridos eran el centro de larga estancia y el servicio de medicina interna del hospital de agudos. Estas dos instituciones tienen en común que acogen los sujetos con mayor número de patologías médicas crónicas, uno de los factores que pueden producir mayor desnutrición (48).

La prevalencia del estado nutricional según las categorías de la MNA en el conjunto de la población, fue similar al estudio de Salvá y cols (42) realizado también en Cataluña que estudiaron la población mayor en distintos ámbitos asistenciales. Nuestra prevalencia fue superior en los desnutridos. Esto puede ser debido a que en este estudio, además de los niveles asistenciales estudiados por Salvá, contempla a pacientes ingresados en el hospital de agudos y en centros de larga estancia, dos de las Unidades donde se encontraron mayor prevalencia de individuos desnutridos.

Compan y cols (49) estudiaron la valoración nutricional a pacientes procedentes de diversos niveles asistenciales de un mismo hospital observando, al igual que en Cataluña, que dentro

del grupo socio-sanitario, estaban peor nutridos los pacientes ingresados en larga estancia que en media estancia, aunque los resultados de este estudio son ligeramente más altos. Por el contrario, la prevalencia de desnutrición en el hospital de agudos fue menor en este estudio que en el de Compan.

González y cols (50) valoraron el estado nutricional de ancianos cubanos atendidos en 3 escenarios diferentes: comunidad, servicio de geriatría y hogar de ancianos. La cifra de desnutridos fue mayor que la del presente estudio sobretodo en el Hogar de Ancianos. Esta diferencia puede ser debida a que el mayor número de los pacientes incluidos en el estudio de González presentaban enfermedades de tipo psiquiátrico. De los pacientes institucionalizados del estudio en Cataluña solo el 19% presentaba algún tipo de demencia.

No se detectaron casos de desnutrición proteica energética en los individuos que acudían al centro de salud (puntuación  $< 17$ ). Este hecho es similar al observado en la población Europea (5), en Estados Unidos por Guigoz y cols (4) y en Israel por Maaravi y cols (6), en la que se contemplan prevalencias del 1%. Llama la atención, la alta prevalencia de riesgo de desnutrición que va desde el 15,2% en este estudio hasta del 40% y 47% en otros (5,7,8). Es de gran importancia poder detectar este grupo de riesgo antes de que se observen

severos cambios de peso o modificaciones en la albúmina, pues estas personas podrían ser más propensas a la disminución de ingesta calórica, lo que puede ser fácilmente corregido mediante una intervención nutricional (3,51).

Las cifras de prevalencia de estado nutricional insatisfactorio en adultos mayores ingresados en los hospitales de agudos se encuentran entre el 32% y el 98% según los autores. Los resultados de este estudio muestran una prevalencia del 56,6% siendo esta cifra similar a estudios realizados en Inglaterra (12) y México (17), mayor que los observados en Suiza (9), Francia (10), Dinamarca (15) y Canadá (11) e inferiores a los realizados en Bélgica (13), Suecia (16), Australia (19), y en otros estudios españoles (18,20). El estudio de Beck y cols (15) muestra una prevalencia de desnutrición bastante más baja que el resto seguramente porque los pacientes incluidos en su estudio no presentaban enfermedades agudas.

La diferencia encontrada en la prevalencia de riesgo o desnutrición entre el servicio de medicina interna (71%) y el de cirugía general (42%), ambos del hospital de agudos, puede ser debida a que los pacientes ingresados en el servicio de medicina, al contrario que los del servicio de cirugía, presentan diversas patologías crónicas o reagudización de las mismas que generalmente conllevan a un incremento de medicación farmacológica. La pluripatología y la polimedición son dos condiciones que pueden comportarse como factores etiológicos importantes en el desarrollo de la desnutrición (52,53).

La prevalencia de estado nutricional insatisfactorio en las residencias geriátricas se encuentra entre el 61 y el 87%. En Cataluña el porcentaje es del 64,2%. Esta cifra es similar a investigaciones realizadas en Francia (23) y en España (31), superior a la de países centro europeos (25,27,30) y más baja que la observada en los países nórdicos (24,26,28).

La prevalencia de estado nutricional insatisfactorio en los centros socio-sanitarios es muy elevada (95,3%) y es similar a otros estudios catalanes (36,37), a la comunicada en Estados Unidos (34) y superior a la observada en Finlandia (8) y en Australia (35). Una de las causas de esta cifra elevada podría ser que estos pacientes, además de que pueden presentar diversos factores de riesgo nutricional, se le añade el hecho de que la mayoría de ellos ingresan procedentes de un hospital de agudos (en nuestro caso el 60% de larga estancia y el 90% de media estancia). Está descrito que el aumento de estancia hospitalaria es un factor añadido de riesgo nutricional para las personas mayores. (54)

Un hallazgo importante es que la puntuación de la MNA tanto en su versión corta como en su versión íntegra tuvo una buena capacidad predicativa comparándola con otros parámetros que no se valoran en la MNA como son los parámetros bioquímicos.

Se encontró una asociación significativa entre los grados de desnutrición de la MNA con los resultados del CONUT.

La MNA coincide con el CONUT en su diferenciación de pacientes normales de los de riesgo o desnutridos y en esta diferenciación es donde se halla el origen de la significación de la asociación. Esto apoyaría la utilidad de la MNA a la hora de diferenciar a los pacientes que necesitarían una valoración nutricional más extensa (pacientes con riesgo o desnutrición) de aquellos que no la necesitarían.

Se podría confirmar pues que la MNA es una herramienta útil para valorar el estado nutricional de la población mayor de nuestro entorno. Estos datos refuerzan los resultados observados en estudios de otros países (12,15,55), el realizado por Salvá y cols (56) en Cataluña y los de aquellos que confirman la utilidad de la versión corta o cribado (57,58,59).

## CONCLUSIONES

Existe una elevada prevalencia de riesgo de desnutrición o desnutrición establecida entre las personas mayores de 65 años de diferentes niveles asistenciales de Cataluña sobretodo en los centros socio-sanitarios y en el servicio de medicina interna del hospital de agudos. La prevalencia a nivel comunitario es muy baja y similar a la de otros países, aunque se debería tener en cuenta la proporción de usuarios con riesgo con el fin de evitar una desnutrición establecida. En el hospital de agudos y en la residencia asistida es alta, aunque se halla por debajo de la observada en otros estudios españoles y extranjeros.

El MNA tanto en su versión corta o cribado como en su versión íntegra representa un instrumento útil, fiable y sencillo para valorar el estado nutricional de los usuarios adultos mayores de nuestro entorno de distintos niveles asistenciales.

## REFERENCIAS

1. Raja R, Lim AV, Lim P, Chan P, Vu CK. Malnutrition screening in hospitalized patients and its implication on reimbursement. *Int Med J* 2004; 34:176-181.
2. Elia M, Zellipour L, Stratton RJ. To screen or not to screen for adult malnutrition? *Clin Nutr* 2005; 24:867-884.
3. Vellas BJ, Guigoz Y, Garry PJ, Nourhashemi F, Bennahum D, Lauque S Albarade JL. The Mini-nutritional assessment and its use in grading the nutritional state of elderly patient. *Nutrition* 1999; 15(2):116-122.
4. Guigoz Y, Vellas B, Garry PJ. Mini Nutritional Assessment: a practical assessment tool for grading the nutritional state of elderly patients. *Facts Res Gerontol* 1994; 4 (suppl 2):15-59.
5. De Groot LC, Beck AM, Schroll M, van Staveren WA. Evaluating the DETERMINE Your Nutritional Health Checklist and the Mini Nutritional Assessment as tools to identify nutritional problems in elderly Europeans. *Eur J Clin Nutr*. 1998; 52(12):877-83.
6. Maaravi Y, Berry EM, Ginsberg G, Cohen A, Stessman J. Nutrition and quality of life in the aged: the Jerusalem 70-year olds longitudinal study. *Aging (Milano)* 2000; 12(4):320.

7. The Spanish Geriatric Oral Health Research Group. Oral Health Research Group. Oral health issues of Spanish adults aged 65 and over. *Int Dent J* 2001; 51 (supl 3):228-234.
8. Soini H, Routasalo P, Lagström H. Characteristics of the Mini Nutritional Assessment in elderly home-care patients. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58:64-70.
9. Pertoldi W, Fragiaco C, Rapin CH, Guigoz Y, Quadri P. The Mini nutritional Assessment (MNA) a predictor of hospital costs in geriatric patients. *J Am Geriatr Soc* 1996; 44:230.
10. Cohendy R, Gros T, Arnaud-Battandier F, Tran G, Plaze JM, Eledjam J. Preoperative nutritional evaluation of elderly patients: the Mini Nutritional Assessment as a practical tool. *Clin Nutr* 1999; 18(6):345-8.
11. Azad N, Murphy J, Amos SS, Toppan J. Nutrition survey in an elderly population following admission to a tertiary care hospital. *CMAJ* 1999; 161(5): 511-515.
12. Murphy MC, Brooks CN, New SA, Lumbers ML. The Use of the Mini Nutritional Assessment (MNA) tool in elderly orthopaedic patients. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54:555-62.
13. Gazzotti C, Albert A, Pepinster A, Petermans J. Clinical Usefulness of the Mini Nutritional Assessment. *JNHA* 2000; 4(3):176-181.
14. Fanello S, Foucault S, Delbos V, Jousset N. Evaluation of nutritional status in hospitalized aged persons. *Sante Publique* 2000; 12(1):83-90.
15. Beck AM, Ovesen L, Shtoll M. A six month's prospective follow-up of 65 + -y-old patients from general practice classified according to nutritional risk by Mini Nutritional Assessment. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55:1028-1033.
16. Persson MD, Brismar KE, Katzarski KS, Nordenstrom J, Cederholm TE. Nutritional status using mini nutritional assessment and subjective global assessment predict mortality in geriatric patients. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50(12):1996-2002.
17. Araujo GJ, Avila L, Jerónimo V. Escala para identificar desnutrición energética-proteica del adulto mayor hospitalizado. *Rev Med IMSS* 2004; 42(5):387-394.
18. Gomez J, González M, Sánchez C. Estudio del estado nutricional en la población anciana hospitalizada. *Nutr Hosp*. 2005; 20(4):286-92.
19. Jukkola K, MacLennan P. Improving the efficacy of nutritional supplementation in the hospitalized elderly. *Australasian Jour Ageing* 2005; 24(2):119.
20. Izaola O, de Luis Román DA, Cabezas G, Rojo S, Cuellar L, Terroba MC, Aller R, González Sagrado M. Mini Nutritional Assessment (MNA) como método de evaluación nutricional en pacientes hospitalizados. *An Med Interna (Madrid)* 2005; 22:313-316.
21. Gutiérrez JG, Serralde A, Guevara M. Prevalencia de desnutrición del adulto mayor al ingreso hospitalario. *Nutr Hosp*. 2007; 22(6): 702-9.
22. Fulöp T Jr, Wagner JR, Khalil A, Weber J, Trottier L, Payette H. Relationship between the response to influenza vaccination and the nutritional status in institutionalized elderly subjects. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1999; 54(2):M59-64.
23. Lauque S, Arnaud-Battandier F, Mansourian R, Guigoz Y, Paintin M, Nourhashemi F, Vellas B. Protein-energy oral supplementation in malnourished nursing-home residents. A controlled trial. *Age Ageing*. 2001; 30(1):85.
24. Saletti A, Lindaren EY, Johansson L, Cederholm T. Nutritional status according to Mini Nutritional Assessment in an institutionalized elderly population in Sweden. *Gerontology* 2000; 46:139-45.
25. Griep MI, Mets TF, Collys K, Ponjaert-Kristoffersen K, Massart DL. Risk of Malnutrition in Retirement Homes Elderly Persons Measured by the "Mini-Nutritional Assessment. *The J Gerontol Med Sci* 2000; 55A (2):M57-63.
26. Beck AM, Ovesen L, Schroll M. Home-made oral supplement as nutritional support of old nursing home residents, who are undernourished or at risk of undernutrition based on the MNA. A pilot trial. *Aging Clin Exp Res* 2002; 14(3):212-5.
27. Saava M, Kisper-Hint IR. Nutritional assessment of elderly people in nursing house and at home in Tallinn. *J Nutr Health Aging*. 2002; 6(1):93-5.
28. Suominen M, Laine T, Routasalo P, Pitkala KH, Rasanen L. Nutrient content of served food, nutrient intake and nutritional status of residents with dementia in a finish nursing home. *J Nutr Health Aging* 2004; 8(4):234-8.
29. Choon G, Koh H. Overnutrition among Older Persons in Maltese Nursing Home. *Malta Medical Journal* 2005; 17(1): 28-32.
30. Cairella G, Baglio G, Censi L, Ciaralli F, Marchetti A, Rebella V, Sonni L, Tarsitani G. Mini Nutritional Assessment (MNA) and nutritional risk in elderly. A proposal of nutritional surveillance system for the Department of Public Health. *Ann Ig* 2005; 17(1):35-46.
31. Ruiz-López, M, Artacho R, Oliva P, Moreno-Torres R, Bolaños J, de Teresa C, López MC. Nutritional Risk in Institutionalized Older Women Determined by the Mini Nutritional Assessment test: What Are the Main factors?. *Nutrition* 2003; 19:767-771.
32. Abajo C, García S, Calabozo B, Ausín L, Casado J, Catalá MA. Protocolo de valoración, seguimiento y actuación nutricional en un centro residencial para personas mayores. *Nutr Hosp* 2008;23(2): 100-104
33. Wissing U, Unosson M. The relationship between nutritional status and physical activity, ulcer history and ulcer-related problems in patients with leg and foot ulcers. *Scand J Caring Sci* 1999; 13(2):123-8.
34. Thomas DR, Zdrowski CD, Wilson MM, Conright KC, Lewis C, Taiq Syed, Morley JE. Malnutrition in subacute care. *Am Clin Nutr* 2002; 75:308-13.
35. Vivanathan, R, Macintosh C, Callary M, Penhall R, Horowitz M, Chapman I. The nutritional status of 250 Older Australian Recipients of Domiciliary Care Services and its Association with Outcomes at 12 Months. *JAGS* 2003; 51:1007-1011.
36. Arellano M, Garcia MP, Márquez MA, Miralles R, Vazquez O, Cervera AM. Valoración del estado nutricional en una unidad de convalecencia: evaluación inicial y seguimiento. *Rev Mult Gerontol* 2004; 14(5):258-261.
37. Ricart J, Pinyol M, de Pedro, B, Devant M, Benavides A. Desnutrición en pacientes en atención primaria. *Aten Primaria* 2004; 34(5):238-43.
38. Neumann SA, Miller MD, Daniels L, Crotty M. Nutritional status and clinical outcomes of older patients in rehabilitation. *J Hum Nutr Dietet* 2005; 18:129-136.
39. Esteban M, Fernández-Ballart J, Salas-Salvado J. Estado nutricional de la población anciana en función del régimen de

- institucionalización. *Nutr Hosp* 2000; 3:64-72.
40. Ramon JM, Subira C. Prevalencia de malnutrición en la población anciana española. *Med Clin* 2001; 117 (20): 766-770.
  41. Carbajal A, Varela-Moreiras G, Ruiz-Roso B, Perea I, Moreiras O. Nutrición y salud de las personas de edad avanzada en Europa: Euronut-SENECA. Estudio en España (3). Estado nutricional: antropometría, hematología, lípidos y vitaminas. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 1993; 28:230-42.
  42. Salva A, Jose Bleda M, Bolibar I. The Mini Nutritional Assessment in clinical practice. In: Vellas B, Gerry PJ, Guigoz Y, editors. *Nestle Nutrition Workshop Ser Clin Perform Programme*. Basel: S. Karger AG; 1999. p 123-129.
  43. [http://www.mna-elderly.com/forms/MNA\\_spanish.pdf](http://www.mna-elderly.com/forms/MNA_spanish.pdf).
  44. Dequeker JV, Baeyens JP, Claessens J. The significance of stature as a clinical measurement of aging. *J Am Geriatr Soc* 1969; 17: 169-179.
  45. Bassey EJ. Demi-Span as a Measure of skeletal size. *Annals of human biology* 1986; 13:499-502.
  46. Haboubi NY, Hudson PR, Pathy MS. Measurement of height in the elderly. *J Am Geriatric Soc* 1990; 38:1008-1010.
  47. de Ulíbarri JI, González-Madroño A, González P y cols. Nuevo procedimiento para la detección precoz y control de la desnutrición hospitalaria. *Nutr Hosp*. 2002; (4): 179-188.
  48. Gómez MJ, González FM. Alta prevalencia de la desnutrición en ancianos españoles ingresados en un hospital general y factores asociados. *Arch Latinoam Nutr* 2005; 55(1):71-6.
  49. Compan B, di Castri A, Plaze JM, Arnaud-Battandier F. Epidemiological study of malnutrition in elderly patients in acute, sub-acute and long-term care using the MNA. *J Nutr Health Aging* 1999; 3(3):146-51.
  50. González A, Cuvá M, González H, Sánchez R, Cortina R, Barreto J, Santana S, Rojas A. *Arch Latinoam Nutr*. 2007; 57(3):266-72. `javascript:PopUpMenu2_Set(Menu18271405);`
  51. Beltran B, Carbajal A, Cuadrado, C, Varela-Moreiras, G, Ruiz-Roso B, Martín, ML, Suárez J, Moreiras O. Nutrición y salud en personas de edad avanzada en Europa. Estudio SENECA's finales en España. *Rev Esp Geriatr Gerontol* 2001; 36(2):82-93.
  52. Gariballa SE, Parker SG, Taub N, Castleden CM: The influence of nutritional status on clinical outcome after acute ischaemic stroke. *Am J of Clin Nutr* 1998; 68(2):275-281.
  53. Weinsier RL, Heimburger DC. Distinguishing malnutrition from disease; the search goes on. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:1063.
  54. Mias C, Jürschik P, Massoni T, Sadurní M, Aguilà JJ, Solá R, Nuin C, Torres J. Evaluación del estado nutricional de los pacientes atendidos en una unidad de hospitalización a domicilio. *Nutr Hosp* 2003; 18 (1):6-14.
  55. Vellas B. Relationships between nutritional markers and the mini nutritional assessment in 155 older persons *J AM Geriatr Soc* 2000; 48 (10):1300-9.
  56. Salvá A, Bolibar I, Muñoz, M, Sacristán, V. Un nuevo instrumento para la valoración nutricional en geriatría: el "Mini Nutritional Assessment (MNA)". *Rev Gerontol* 1996; 6:319-328.
  57. Borowiak E, Kostka T. Usefulness of short (MNA-SF) and full version of the Mini Nutritional Assessment (MNA) in examining the nutritional state of older persons.
  58. Rubenstein LZ, Harker JO, Salvá A, Guigoz Y, Vellas B: Screening for Undernutrition in Geriatric Practice: Developing the Short-Form Mini-Nutritional Assessment (MNA-SF). *Journal of gerontology: Medical Sciences*. 2001; 56A, 6:M366-M372.
  59. Cohendy, R, Rubenstein LZ, Eledjam JJ. The Mini nutritional assessment-Short Form for preoperative nutritional evaluation of elderly patients. *Aging Clin Exp Res* 2001; 13:293-297.

Recibido: 10-03-2008

Aceptado: 22-12-2008

## Increase in digestive organs of rats due to the ingestion of dietary fiber with similar solubility to that of common bean

Telma Angelina Faraldo Corrêa, Soely Maria Pissini Machado Reis and Admar Costa de Oliveira

Department of Food and Nutrition, Food Engineering College, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

**SUMMARY.** The aim of the present work is to study the effect of dietary dietary fiber of similar solubility to that of the cooked common bean in the increase of the small intestine, liver, and pancreas of rats. Recently weaned male Wistar rats were fed *ad libitum* balanced diets containing cooked common bean (12.9% of dietary fiber plus resistant starch) or casein with 5.0% (control group), 10.0%, 12.5% or 15.0% of dietary fiber plus resistant starch added, with the same proportions of insoluble and soluble fibers and resistant starch found in bean (8:3:1) for 14 days. Weight gain and diet intake were smaller in the group fed the cooked bean diet. However, this group showed the highest increase in the studied organs. Rats that ingested the diet containing casein with 15.0% of dietary fiber added showed a growth of 21.4% in the pancreas. Rats fed other casein diets did not show significant differences ( $p>0.05$ ). The diet containing the cooked common bean led to weight gain of all studied organs (50.0% in the pancreas, 25.0% in the liver and 33.4% in the small intestine) and an increase of 47.1% in the small intestine length. Therefore, dietary fiber plus resistant starch had a trophic effect on digestive organs, although they were not the only stimulation factor, because the cooked bean has other chemical components, like phytates and tannins, that probably contribute to that effect.

**Key words:** Casein, common bean, dietary fiber, digestive organs, rats.

### INTRODUCTION

The nutritional value of the common bean is universally acknowledged. Bean contain approximately 60% of carbohydrates, 2/3 of which is starch (18% resistant starch), from 16 to 33% of proteins and a small quantity of lipids, 1 to 3%, most of which is linoleic acid. The common bean has a significant quantity of dietary fiber, minerals such as calcium, iron, phosphorus, potassium, and magnesium and vitamins such as folate, tiamin, and niacin (1-4). It is considered an important source of energy and nutrients, especially for developing countries population (5) and it complements the quality and biological value (percentage of nitrogen absorbed that is retained) of cereal proteins (6).

Several studies have shown that the intake of cooked bean has a trophic effect on digestive organs, among which are the

**RESUMEN. Incremento en órganos digestivos de ratas debido a la ingestión de fibra dietética de solubilidad similar al del frijol común.** Ratas Wistar machos recién destetados fueron alimentados *ad libitum* con dietas balanceadas, conteniendo frijol común cocinado (12,9% de fibras dietéticas + almidón resistente) o caseína agregado de 5,0% (grupo control), 10,0%, 12,5% o 15,0% de fibras dietéticas + almidón resistente, con las mismas proporciones de fibras insolubles y solubles y almidón resistente, encontradas en el frijol (8:3:1) por 14 días. El aumento de peso y la ingesta de dieta fueron más pequeños en el grupo alimentado con la dieta del frijol cocinado. Sin embargo, este grupo mostró el aumento más alto en los órganos estudiados. Las ratas que ingirieron la dieta conteniendo caseína con agregado de 15,0% de fibra dietética mostraron un crecimiento de 21,4% en el páncreas. Las ratas alimentadas con las otras dietas de caseína no mostraron diferencias significativas ( $p>0,05$ ). El consumo de dieta conteniendo frijol común cocinado provocó un aumento de peso en todos los órganos estudiados (50,0% en el páncreas, 25,0% en el hígado y 33,4% en el intestino delgado) y un incremento del 47,1% en el tamaño del intestino delgado. La fibra dietética más almidón resistente ejerce un efecto trófico en los órganos digestivos, aunque no fue ese el único factor estimulante. El frijol cocinado puede tener otros componentes químicos, además de los inhibidores de proteasas, lectinas, fitatos y taninos, que probablemente contribuyen a ese efecto.

**Palabras clave:** Caseína, frijol común, fibra dietética, órganos digestivos, ratas.

small intestine, liver, and pancreas (7,8). However, further research is needed to understand which chemical component of bean is responsible for such effect. Thus, this study aimed at verifying whether diets whose protein source was casein with dietary fiber (cellulose and pectin) and resistant starch (chemically modified) added, in the same proportions found in the common bean, cause an increase in the small intestine weight and length and liver and pancreas weight of rats.

### MATERIALS AND METHODS

#### Preparation of cooked beans and diets

The raw common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), cv. IAC-Carioca ETÉ, with average crude protein value (N x 5.40) of  $18.72 \pm 0.09\%$  was provided by the Grains and Fibers Center of the Campinas Agronomic Institute, SP, Brazil, and the com-

mercial casein, containing  $83.34 \pm 0.64\%$  of crude protein ( $N \times 6.38$ ) was purchased from M. CASSAB Comércio e Indústria Ltda, SP. The common bean and casein crude protein was determined in our laboratory.

Bean grains were washed in running water, soaked at room temperature ( $25^{\circ}\text{C}$ ) for 16 hours, using a 3:1 water:bean proportion. Then they were cooked without discarding the soaking water, using the same water:bean proportion, in a domestic pressure cooker (14.1 psi), for 40 minutes, after the air exhaustion and a constant steam flux flows through the pressure valve. After cooked, grains were frozen, freeze-dried in a Terroni Lyophilizer, model LH 0500 and ground in a Marconi mill, model MA 630, up to  $250 \mu\text{M}$  granulometry.

Diets were prepared with only one protein source, cooked bean or casein and they were formulated according to the specifications of the American Institute of Nutrition, diet AIN - 93G (9), except for protein value, which was 12% (10). The dietary fiber values of casein diets were 5.0%, 10.0%, 12.5% e 15.0%, using cellulose (microfine, pharmaceutical degree, Microcel, M. CASSAB Comércio e Indústria Ltda., SP), pectin (Genu type 8140 – Cpkelko) and chemically modified resistant starch (Hi Maize™ 260, National Starch & Chemical) in the proportion of 8:3:1, respectively. These additions aimed at simulating possible physiological and/or biochemical effects of the dietary fiber fraction and resistant starch present in the common bean in rats. The two types of fiber (pectin and cellulose) were chosen due to the fact that they are the most prevalent in the common bean (5, 11). For control, a diet containing 12% of casein as protein source, with 5.0% of dietary fiber added with similar solubility to that of the common bean was used. The quantities of insoluble and soluble dietary fiber added to the casein diets depended on the quantity present in the common bean and the quantity of resistant starch depended on the value present in the common bean and in corn starch and dextrinized starch. The proportions of dietary fiber and resistant starch added to casein diets were calculated in our laboratory and they are showed on Table 1.

All diets were completed to 100% with the carbohydrates, and they became isoprotein ( $12.0 \pm 0.2\%$ ) and isoenergetic ( $1551.8 \pm 22.8 \text{ kJ}/100\text{g}$ ). To calculate the energetic value,  $8.4 \text{ kJ}/\text{g}$  were attributed for soluble fiber and resistant starch due to the formation of short chain fatty acids (12,13).

#### Chemical characterization of cooked and lyophilized common bean

The following components were determined in the cooked bean: moisture (14), ashes (14), crude protein, using the semi-micro Kjeldahl method, titanio dioxide as digestion catalyzer (15) and a conversion factor of 5,40 (16); total lipids (17); crude fiber (14), total, soluble and insoluble dietary fiber (18); and resistant starch (19). The carbohydrates value was evaluated by difference. All the analyses were performed at least in triplicate.

TABLE 1  
Cellulose, pectin and resistant starch addition to casein diets in grams per kilo (kg) of diet

Additions (%)	Quantity of fibers in diets (g/kg)
5.0	33.8 cellulose
	11.9 pectin
	4.3 resistant starch
10.0	67.7 cellulose
	23.8 pectin
	8.5 resistant starch
12.5	84.6 cellulose
	29.7 pectin
	10.7 resistant starch
15.0	101.5 cellulose
	35.7 pectin
	12.8 resistant starch

#### Animals and experiment procedures

All the procedures were approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation of the Biology Institute of the Unicamp, Campinas, SP, Brazil (Protocol number 1005-1). Fifty recently weaned (21-23 days) male albino Wistar rats ( $47.2 \pm 9.9\text{g}$ ) were used. They were provided by the Multidisciplinary Center for Biological Investigation of the State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. The animals were randomly separated in 5 groups and they were maintained on individual growth cages, during all the experiment period, in controlled environment conditions, to keep temperature at  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  and 50 to 60% of relative humidity, with a light/dark alternated cycle of 12-hour. Animals had free access to water and diet during all the experiment. The adaptation time was 4 days, during which the experimental diets were already being used. After this period, they weighed  $64.3 \pm 11.3 \text{ g}$ . The experiment lasted 10 days and rats' weight was checked in the morning, on day 5 and on day 10 of the experiment. Diet intake was verified every two days.

#### Digestive organs

Rats were killed through cervical dislocation. The liver, pancreas, and small intestine were removed. The small intestine was removed from the pylorus (stomach-duodenum junction) to the ileocecal valve. Length measurement of this organ was performed by means of a measuring tape, holding the small intestine suspended, with a weight of 5.60g hanging from its inferior extremity to guarantee the same tissue stretching. After length measurement, the small intestine was

emptied, rinsed with 20 to 30 ml of iced physiologic solution, carefully blotted, and weighed. The liver and pancreas were rinsed with iced physiologic solution, blotted, and weighed on Petri dishes previously weighed.

### Statistical analysis

Results were submitted to analysis of variance (ANOVA) and to Tukey's means test, using the STATISTICA 7.0® software (StatSoft, Tulsa, OK, USA), considering  $p < 0.05$  as the minimum acceptable probability for the difference between the means.

## RESULTS

### Chemical composition of the common bean

The centesimal composition of the cooked and lyophilized bean was: moisture ( $5.10 \pm 0.13\%$ ) and ashes ( $3.45 \pm 0.03\%$ ). Quantitatively, the bean studied is considered a good source of proteins ( $N \times 5.40$ ) and carbohydrates, since it has  $19.03 \pm 0.03\%$  and  $68.36 \pm 0.37\%$ , respectively; characteristically, bean grains have a small quantity of total lipids ( $2.80 \pm 0.06\%$ ) and a moderate content of crude fiber ( $6.36 \pm 0.40\%$ ). The values are expressed on dry basis, in g/100g, and represent the average and the standard deviation of the hexaplicate.

TABLE 2  
Total Dietary Fiber (TDF), Insoluble (IDF) and Soluble (SDF) and resistant starch (RS) in the cooked and lyophilized common bean and in diets

Legume and Diets*	TDF	IDF	SDF	RS
C5.0%**	$4.6 \pm 0.15$	$3.3 \pm 0.19$	$1.3 \pm 0.20$	$0.9 \pm 0.0$
C10.0%	$8.3 \pm 1.06$	$6.3 \pm 0.46$	$2.0 \pm 0.62$	$1.0 \pm 0.06$
C12.5%	$11.0 \pm 0.58$	$8.5 \pm 0.0$	$2.5 \pm 0.64$	$1.1 \pm 0.04$
C15.0%	$12.8 \pm 0.67$	$10.2 \pm 0.26$	$2.6 \pm 0.88$	$1.3 \pm 0.03$
CB	$25.1 \pm 0.26$	$18.5 \pm 0.37$	$6.6 \pm 0.58$	$2.3 \pm 1.23$
CBD	$11.9 \pm 0.70$	$9.4 \pm 0.87$	$2.5 \pm 0.19$	$1.0 \pm 0.08$

Average and standard deviation of values (g/100g of body weight) determined at least in triplicate.

\*CB = Common bean, CBD = Common bean diet, C5.0% = Casein + 5.0 % of dietary fiber plus RS, C10.0% = Casein + 10.0 % of dietary fiber plus RS, C12.5% = Casein + 12.5 % of dietary fiber plus RS, C15.0% = Casein + 15.0 % of dietary fiber plus RS, with similar solubility to that of the common bean.

\*\* Casein + 5.0% of dietary fiber and resistant starch is the control diet.

### Total Insoluble and Soluble Dietary Fibers and Resistant Starch

The contents of total, insoluble and soluble dietary fiber and resistant starch in the cooked and lyophilized common bean and in the experimental diets are shown on Table 2. The dietary fiber with similar solubility to that found in the common bean additions grew increasingly, from 5.0% (control diet) to 15.0% in the casein diets. The 12.5% value was chosen for being comparable to the common bean diet, which showed 12.9% of dietary fiber plus resistant starch. The ratio insoluble/ soluble fiber showed that there was a prevalence of insoluble fiber, which represented 74% of the total dietary fiber.

### Biological essay

The initial and final weight of the rats, their weight gain and the diet intake after 10 days of experiment can be seen on Table 3. For both weight gain and diet intake, it was observed that rats fed casein diets did not differ among them. However, they differed from the group fed the diet containing the cooked bean as protein source. The lower weight gain of the rats fed the diet containing the common bean can be related to the smaller diet intake. Weight gain increased in all groups during the experiment. Results show that increasing additions of dietary fiber to diets did not alter the animals' growth rate.

Liver and pancreas weight, small intestine weight and length can be seen on Table 4. Rats fed the diet containing bean showed a considerable increase in pancreas weight (50.0%) in comparison to the control group, and differed from the other groups. Among the groups fed casein diets with dietary fiber plus resistant starch added, only the group whose diet had a 15.0% addition differed from the control group, regarding the pancreas weight, showing a 21.4% increase in the pancreas weight (Table 4). Results suggest a possible pancreas hypertrophy, especially in the rats fed a diet whose protein source was the cooked bean.

The group fed the diet containing bean showed the highest liver weight, differing of the control group, but this group did not differ from the groups whose diets had casein with 10.0%, 12.5% and 15.0% addition of dietary fiber plus resistant starch. These last three groups did not differ from the control group (Table 4).

Regarding small intestine weight and length (Table 4), it was observed that only the group fed diet containing bean differed from the control group, showing an increase in the length (47.1%) and weight (33.4%) of that organ.

TABLE 3  
Initial and final weight (g), weight gain (g) and diet intake after 10 days of experiment

Diets	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight gain (g)	Diet intake (g)
Casein + 5.0%	64.95 ± 6.50 <sup>ab</sup>	114.64 ± 7.74 <sup>b</sup>	49.69 ± 4.60 <sup>b</sup>	128.18 ± 21.86 <sup>b</sup>
Casein + 10.0%	71.46 ± 9.91 <sup>b</sup>	123.59 ± 13.97 <sup>b</sup>	52.13 ± 5.33 <sup>b</sup>	135.10 ± 18.41 <sup>b</sup>
Casein + 12.5%	69.02 ± 10.28 <sup>b</sup>	119.49 ± 12.09 <sup>b</sup>	50.47 ± 6.68 <sup>b</sup>	136.45 ± 16.11 <sup>b</sup>
Casein + 15.0%	64.88 ± 6.42 <sup>ab</sup>	118.31 ± 9.69 <sup>b</sup>	53.43 ± 5.32 <sup>b</sup>	136.17 ± 13.13 <sup>b</sup>
Common bean diet	55.92 ± 8.44 <sup>a</sup>	83.79 ± 7.24 <sup>a</sup>	27.87 ± 4.28 <sup>a</sup>	96.32 ± 11.84 <sup>a</sup>

Casein + 5.0% of dietary fiber and resistant starch is the control diet

Data represent average and standard deviation for n=10

Different letters in the same column indicate statistical difference (p<0.05), according to Tukey's Test.

TABLE 4  
Weight of pancreas, liver and small intestine (g/100g of body weight) and length (cm) of the small intestine of rats after 10 days of experiment

Diets	Pancreas (g/100g)	Liver (g/100g)	Small Intestine	
			Weight (g/100g)	Length (cm)
Casein + 5.0%	0.42 ± 0.12 <sup>a</sup>	3.46 ± 0.23 <sup>a</sup>	4.07 ± 0.49 <sup>a</sup>	101.12 ± 11.21 <sup>a</sup>
Casein + 10.0%	0.47 ± 0.05 <sup>ab</sup>	3.74 ± 0.56 <sup>ab</sup>	4.34 ± 0.44 <sup>a</sup>	101.39 ± 10.51 <sup>a</sup>
Casein + 12.5%	0.49 ± 0.07 <sup>ab</sup>	3.87 ± 0.53 <sup>ab</sup>	4.36 ± 0.31 <sup>a</sup>	102.68 ± 7.84 <sup>a</sup>
Casein + 15.0%	0.51 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.98 ± 0.29 <sup>ab</sup>	4.51 ± 0.44 <sup>a</sup>	106.68 ± 9.45 <sup>a</sup>
Common bean diet	0.63 ± 0.05 <sup>c</sup>	4.33 ± 0.79 <sup>b</sup>	5.43 ± 1.06 <sup>b</sup>	148.77 ± 0.32 <sup>b</sup>

Casein + 5.0% of dietary fiber and resistant starch is the control diet.

Data represent average ± standard deviation for n=10

Averages with different letters in the same column indicate difference in the significance level p<0.05 (Tukey's Test).

## DISCUSSION

The results for the centesimal composition of the cooked bean are similar to those of Costa et al. (20), Queiroz-Monici et al. (21) and Oliveira et al. (22), when the same cultivar was used. This bean cultivar showed a protein value similar to that found in literature, in which values vary from 16 to 33% (23). Bean grains were cooked using the soaking water to preserve their nutrients. Helbig et al. (24) did not find a significant difference in phytate and tannin contents, considered anti-nutritional factors, in diets containing bean cooked with or without the soaking water.

The cooked and lyophilized bean dietary fibers plus resistant starch values and the bean diet dietary fiber plus resistant starch values (Table 2) are in accordance with the values found by Costa et al. (20), Queiroz-Monici et al. (21) and Kutos et al. (25). The entire levels of the cooked bean dietary fiber vary from 11.2 to 27.5% and the resistant starch levels vary from 2.24 to 3.49%, depending on the preparation storage time (26). The bean soluble and insoluble fibers levels vary according to the cultivation method, the grain cultivation conditions, the

bean previous treatments, and the analytic determination method. Soluble fiber is more sensitive to such alterations (6, 25). It is well known that gravimetric methods that use thermoestable amylase at 100°C to eliminate starch leave part of the resistant starch in the insoluble fiber residues. However, we decided not to discount this resistant starch because an exact value for it was not found in the literature. Moreover, there are some authors who do not include resistant starch as dietary fiber; they consider it a substance similar to dietary fiber (27,28).

The rats' weight gain is directly related to their abilities to use nutrients. Therefore, the better is the protein amino acids balance, the better is its use (29). The statistical difference between the group fed the diet containing bean and those groups fed diets containing casein with different additions of dietary fiber plus resistant starch may have occurred due to the fact that the nutritive value of the bean proteins are lower (30,31) and due to cholecystokinin (CCK) secretion, which is associated to satiation both in humans and in animals (32). The weight gain increased linearly in all groups during the experiment, similarly to what was observed by Brunsgaard &

Eggum (33). The results of the experiment showed that increasing additions of dietary fiber to diets did not alter the growth rate of the animals, which is similar to what was verified by Pirman et al. (7).

Liver and pancreas weight gain may have occurred due to hyper secretion of bile and pancreatic enzymes, respectively, in an attempt to compensate for digestion and absorption inefficiency. For the liver, the alteration in the intestine transit and the pH reduction cause inhibition of *Lactobacillus* dehydroxilation and consequent reduction in the deoxicolonic acid production, preventing bile salts from being re-absorbed into the ileo. Moreover that, in comparison to animal proteins, vegetable proteins are less broken by proteases, and they are consequently less absorbed. Therefore, the intensification in liver activity may occur to regulate protein seric levels (34).

Ikegami et al. (34) and Corring et al. (35) observed an increase in amylase and proteases secretion and a volume of bile excreted increased when dietary fiber was added to the rats' diet. Besides dietary fiber and resistant starch, other factors such as the intact protein or peptides presence and the protein type may exert important influence on secretions, provoking the digestive organs adaptation (8,35,36).

The small intestine weight gain and the length increase of rats fed the bean diet may have occurred due to an attempt to increase the nutrient absorption area. Moreover, there is an interaction among cooked common bean dietary fiber, resistant starch and other chemical components that have not been identified yet, with the small intestine mucosa, exerting hormonal and mechanical stimulation (37,38). If small intestine weight gain and length increase would be confirmed in humans, the cooked bean could be used in Short Bowel Syndrome treatment.

Similarly to the findings of this study, other authors have observed a small intestine weight and length increase in rats when dietary fiber was added to the diet. Brunsgaard & Eggum (33) and Brunsgaard et al. (37) observed that its weight and length tripled when 8.0% of dietary fiber and resistant starch were added to rats' diets after 9 days of experiment. Ikegami et al. (34) found a 55.3% weight gain and a 16.4% length increase of the small intestine in rats fed a diet containing bean for 14 days. Pirman et al. (7) found a 28.2% small intestine weight gain in rats fed diets containing cooked bean for 15 days in comparison to those fed a casein diet. McCullough et al. (39) observed a 6% weight gain of this organ in rats fed a diet containing 30.0% of a mix of dietary fiber after 14 of experiment (Table 4).

The dietary fiber increasing additions to diets containing casein were responsible for the increase of the studied organs measures, although without statistical difference, except for the pancreas. Pirman et al. (7) suggested that dietary fiber seem to be the main factor responsible for the trophic effect of legumes on intestine tissues.

The presence of dietary fiber and resistant starch alters the transit and the intestine pH, the intraluminal content viscosity and the digestive enzymes activity, modifying nutrients digestion and absorption (34,40). They can form indigestible complexes with proteins and amino acids, mainly during the heating treatment (8,20,33,41). The heating treatment promotes the formation of high molecular weight protein aggregates, which are hydrolyzed much more slowly by proteolytic enzymes (42). In the casein diets, such complexes were probably not formed in the same proportion, since they did not undergo any heating treatment. Dietary fiber may also exert a direct mechanical stimulation over the intestine mucosa and cause an increase in cell exfoliation (8).

The studied organs increase is not a continuous process. It was observed only in the first 9 days after the diet containing fiber introduction and there was no significant difference after that period. In addition, these alterations seem to be permanent (33,37,38). Corring et al. (35) studied the alterations in pancreatic and bile secretions and stated that such alterations are completed in 5 to 7 days after the diet starts.

Anti-nutritional factors were not among the stimulator components, because they are heat-labile or show very low residues after the thermal treatment. Lectins and protease inhibitors are inactivated or remained at very low levels, nonharmful, after the thermal treatment (41,43). Helbig et al. (24) found a reduction of 53% in phytates and 89% in tannins when beans were cooked with the soaking water.

The diet containing cooked common bean resulted in the studied digestive organs weight gain and in the small intestine length increase. The casein diet, with an addition of 15.0% of dietary fiber plus resistant starch, caused pancreas weight gain. Therefore, dietary fiber plus resistant starch were responsible for the digestive organs increase. However, they were not the only stimulation factor, because the cooked bean has other chemical components, like phytates and tannins, that probably contributed to such effect. Thus, there is a need for further research to know what these other components are.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the concession of a research scholarship to CORRÊA, TAF; They also thank the Campinas Agronomic Institute, SP, Brazil for providing the pure cultivar of the common bean (*Phaseolus vulgaris*, L.), the National Starch & Chemical Industrial Ltda, SP for donating of resistant starch, Tovani Benzaquen Representações Ltda, SP for giving the enzymes used in dietary fiber and resistant starch determinations.

## REFERENCES

1. Rehman Z, Salariya AM, Zafar SI. Effect of processing on available carbohydrate content and starch digestibility of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chem* 2001; 73: 351-355.
2. Messina MJ. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* 1999; suppl. 70: 439s-50s.
3. Hughes JS. Potential contribution of dry bean dietary fiber to health. *Food Tech* 1991; 45: 122-26.
4. Uebersax MA, Ruengsakulrach S, Occeña LG. Strategies and procedures for processing dry beans. *Food Tech* 1991; 45: 104-08.
5. Shiga TM, Lajolo FM, Filisetti TMCC. Cell wall polysaccharides of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ci Tecnol Alim* 2003; 23: 141-48.
6. González GCA. Efecto del tratamiento térmico sobre el contenido de fibra dietética total, soluble e insoluble en algunas leguminosas. *Arch Latinoam Nutr* 2000; 50: 281-85.
7. Pirman T, Combe E, Mirand PP, Stekar J, Oresnik A. Differential effects of cooked common bean (*Phaseolus vulgaris*) and lentil (*Lens esculenta puyensis*) feeding on protein and nucleic acid contents in intestines, liver and muscles in rats. *Ann Nutr Metab* 2004; 48: 281-87.
8. Nascentes RB. Efeito do consumo de leguminosas cozidas (beans-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) e ervilha (*Pisum sativum*, L.) no tamanho e atividade celular do intestino delgado e nas secreções digestivas de ratos [dissertação]. Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas 1996.
9. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute on Nutrition ad Hoc Writing Committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-51.
10. Goena M, Marzo F, Fernández-González L, Tosar A, Frühbeck G, Santidrián S. Effect of the raw legume *Vicia ervilia* on the muscle and liver protein metabolism in growing rats. *Rev Esp Fisiol* 1989; 455 Suppl: 55-60.
11. Candela M, Astiasaran I, Bello J. Cooking and warm-holding: effect on general composition and amino acids of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*), chickpeas (*Cicer arietinum*), and lentils (*Lens culinaris*). *J Agric Food Chem* 1997; 45: 4763-67.
12. Salgado SM, Faro ZP, Guerra NB, Livera AVS. Aspectos físico-químicos e fisiológicos do amido resistente. *B Cent Pesq Proc Alim* 2005; 23: 109-22.
13. Champ M, Langkilde AM, Brouns F, Kettlitz B, Bail-Collet YL. Advances in dietary fibre characterization. 2. Consumption, chemistry, physiology and measurement of resistant starch; implications for health and food labeling. *Nutr Res Rev* 2003; 16: 143-61.
14. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*. 15. ed., Washington, D.C. 1990.
15. Williams PC. The use of titanium dioxide as a catalyst for large-scale Kjeldahl determination of the total nitrogen content of cereal grains. *J Sci Food Agric* 1973; 24: 343-48.
16. Mossé J. Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seeds protein content. *J Agric Food Chem* 1990; 38: 18-24.
17. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37: 911-17.
18. Asp NG, Johansson CG, Hallmer H, Siljestrom M. Rapid and enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *J Agric Food Chem* 1983; 31: 476-82.
19. Faisant N, Planchot V, Kozłowski F, Paccouret MP, Colonna P, Champ M. Resistant starch determination adapted to products containing high level of resistant starch. *Sci Alim* 1995; 15: 83-89.
20. Costa GEA, Queiroz-Monici KS, Reis SMPM, Oliveira AC. Chemical composition, dietary fibre and resistant starch contents of raw and cooked pea, common bean, chickpea and lentil legumes. *Food Chem* 2006; 94: 327-30.
21. Queiroz-Monici KS, Costa GEA, Silva N, Reis SMPM, Oliveira AC. Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutr* 2005; 21: 602-08.
22. Oliveira AC, Nery ACC, Jackix EA, Santos EF, Carvalho IR, Correa TAF et al. 2005. O cultivar de feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*, L.) IAC-Carioca-Eté apresentou elevada biodisponibilidade de metionina. In: Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, Campinas, São Paulo, Brasil. Universidade Estadual de Campinas 2005.
23. Chiaradia ACN, Costa NMB, Gomes JC. Retirada do tegumento e da extração dos pigmentos na qualidade protéica do feijão-preto. *Rev Nutr* 1999; 12: 131-36.
24. Helbig E, Oliveira AC, Queiroz KS, Reis SMPM. Effect of soaking prior to cooking on the levels of phytate and tannin of the Common Bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) and the protein value. *J Nutr Sci Vitaminol* 2003; 49: 81-86.
25. Kutos T, Golob T, Kac M, Plestenjak A. Dietary fibre content of dry and processed beans. *Food Chem* 2003; 80: 231-35.
26. Osorio-Díaz P, Agama-Acevedo E, Carmona-García R, Tovar J, Paredes-López O, Bello-Pérez L. A. Resistant starch and in vitro starch digestibility of cooked "ayocote" bean (*Phaseolus coccineus*). *Interciencia* 2004; 29: 510-15.
27. Roberfroid MB. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1993; 33: 103-48.
28. Saura-Calixto F, García-Alonso A. Metodología para el análisis de fibra y carbohidratos. In: Lajolo FM, Saura-Calixto F, Penna EW, Menezes EW, editores. *Fibra Dietética en Iberoamérica: tecnología y salud*. São Paulo: Varela; 2001. p. 15-25.
29. Onyeike EN, Ayalogu EO, Uzogara SG. Influence of the heat processing of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) flour on the growth and organ weights of rats. *Plant Foods Hum Nutr* 1995; 48: 85-93.
30. Rubio LA, Grant G, Daguid T, Brown D, Pusztai A. Organs relative weight and plasma amino acid concentrations in rats fed diets based on whole legume (faba bean, lupin, chickpea, defatted soybean) seed meals or their fractions. *J Sci Food Agric* 1999; 79: 187-94.
31. Lanfer Marquez UML, Lajolo FM. In vivo digestibility of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: the role of endogenous protein. *J Agric Food Chem* 1991; 39: 1211-15.

32. Bourdon I., Olson B, Backus R, Richter BD, Davis PA, Schneeman BO. Beans, as a source of dietary fiber, increase cholecystokinin and apolipoprotein B48 response to test meals in men. *J Nutr* 2001; 131: 1485-90.
33. Brunsgaard G, Eggum BO. Small intestine tissue structure and proliferation as influenced by adaptation period and indigestible polysaccharides. *Comp Bioch Physiol* 1995; 112A: 365-77.
34. Ikegami S, Tsuchihashi F, Harada H, Tsuchihashi N, Nishide E, Innami S. Effect of viscous indigestible polysaccharides on pancreatic biliary secretion and digestive organs in rats. *J Nutr* 1990; 120: 353-60.
35. Corring T, Juste C, Lhoste EF. Nutritional regulations of pancreatic and biliary secretions. *Nutr Res Rev* 1989; 2: 161-80.
36. Ide T, Horii M. Predominant conjugation with glycine of biliary and lumen bile acids in rat fed on pectin. *Br J Nutr* 1989; 61: 545-57.
37. Brunsgaard G, Eggum BO, Sandström B. Gastrointestinal growth in rats as influenced by indigestible polysaccharides and adaption period. *Comp Biochem Physiol* 1995; 111A: 369-77.
38. Yang Y, Joern A. Gut size changes in relation to variable food quality and body size in grasshoppers. *Funct Ecol* 1994; 8: 36-45.
39. McCullough JS, Ratcliffe B, Mandir N, Carr KE, Goodlad RA. Dietary fibre and intestinal microflora: effects on intestinal morphology and crypt branching. *Gut* 1998; 42: 799-806.
40. McDonald DE, Pethick DW, Mullan BP, Hampson DJ. Increasing viscosity of the intestinal contents alters small intestinal structure and intestinal growth, and stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* in newly-weaned pigs. *Br J Nutr* 2001; 86: 487-98.
41. Carbonaro M, Grant G, Cappelloni M, Puzstai A. Perspectives into factors limiting in vivo digestion of legume protein: antinutritional compounds or storage proteins?. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 742-49.
42. Lanfer Marquez UM, Lajolo FM. Nutritional value of cooked beans (*Phaseolus vulgaris*) and their isolated major protein fractions. *J Sci Food Agric* 1990; 53: 235-42.
43. Kadam SS, Smithard RR, Eyre MD, Armstrong DG. Effects of heat treatments of antinutritional factors and quality of proteins in winged bean. *J Sci Food Agric* 2006; 39: 267-75.

Recibido: 26-02-2008

Aceptado: 24-06-2008

## Associação entre medidas de adiposidade, variáveis demográficas e bioquímicas com os níveis séricos de proteína C-reativa em população rural

*Amanda Carla Fernandes, Andrea Gazzinelli, Gustavo Velásquez-Meléndez*

Departamento de Enfermagem Materno-Infantil e Saúde Pública, Escola de Enfermagem,  
Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brasil

**RESUMO.** A proteína C-reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda que tem sido associada ao risco aumentado para doenças cardiovasculares. Diversos estudos têm demonstrado associação entre acúmulo de gordura corporal e níveis elevados de PCR. O objetivo deste trabalho foi verificar a associação entre medidas de adiposidade, variáveis demográficas e bioquímicas com os níveis de PCR em uma população rural. A população foi constituída por indivíduos com idade maior ou igual a 18 anos de ambos os sexos e pelo menos dois anos de residência no local. Foram excluídos mulheres grávidas, indivíduos diabéticos e indivíduos com PCR acima de 10mg/l. A coleta de dados incluiu variáveis antropométricas, demográficas, de estilo de vida e bioquímicas. Os dados foram analisados por meio do STATA 9.0. Dos 536 participantes, 50,37% eram do sexo masculino, a idade variou entre 18 e 94 anos com média de 43,34 anos. A prevalência de sobrepeso e obesidade foi significativamente maior no sexo feminino. Na análise bivariada o IMC, circunferência da cintura, RCQ, idade, educação, pressão arterial sistólica e diastólica, colesterol total, LDL-c, HDL-c, triglicérides, insulinemia de jejum e HOMA-IR correlacionaram-se significativamente com o lnPCR. As variáveis que se mantiveram associadas com o lnPCR, após ajuste do modelo de regressão linear múltipla foram IMC, idade, sexo, insulinemia de jejum e HDL-c. A associação independente de tradicionais fatores de risco para as doenças cardiovasculares (idade, sexo, IMC, insulina de jejum e HDL-c) com a PCR evidencia uma estreita relação entre tecido adiposo, doenças cardiovasculares e inflamação.

**Palavras-chave:** Antropometria, proteína C-reativa, população rural, obesidade, doenças cardiovasculares, tecido adiposo, fatores de risco.

### INTRODUÇÃO

A prevalência de obesidade vem aumentando em populações de todo o mundo, sendo hoje considerada uma epidemia global (1). Nos países latino-americanos, observou-se um aumento marcante da prevalência de obesidade, principalmente na população de baixo nível sócio-econômico (2).

---

Apoio financeiro:  
Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG),  
National Institute of Health (NIH)

**SUMMARY.** Association between adiposity measures, demographic and biochemical variables with C-reactive protein serum levels in rural population. Acute-phase proteins as C-reactive protein (CRP) have been associated with cardiovascular diseases. Recent studies have shown the relation between body fat and elevated serum levels of CRP. This study verifies relation between adiposity measures, demographic and biochemical variables with CRP serum levels in a rural population. The study was conducted among individuals aged 18 or more, both sexes and at least two years of residency in the place of study. Pregnant women, diabetic and CRP over 10mg/l individuals were excluded. Data collection included anthropometric, demographic, lifestyle and biochemical variables. Data was processed in STATA 9.0. From the 536 subjects, 50.37% were men. Age varied from 18 to 94, age mean was 43.34. Overweight and obesity prevalence were significantly higher among women than men. Bivariate analysis found significant correlations between lnCRP and the following variables: BMI, waist circumference, WHR, age, education, systolic and diastolic blood pressure, total cholesterol, LDL-c, HDL-c, triglycerides, fasting insulin and HOMA-IR. After adjusting for confounding variables in multiple linear regression analysis only BMI, age, sex, fasting insulin and HDL-c remained significantly associated with lnCRP. The independent association of traditional risk factors for cardiovascular disease (age, sex, BMI, fasting insulin and HDL-c) with PCR evidences a close relationship between adipose tissue, cardiovascular diseases and inflammation.

**Key words:** Anthropometry, C-reactive protein, rural population, obesity, cardiovascular diseases, adipose tissue, risk factors.

A prevalência de obesidade na área rural brasileira tem aumentado significativamente nos últimos anos (3). Estudos realizados no meio rural indicam que o aumento de peso nessa população pode ser atribuído à incorporação dos hábitos de vida urbanos, como o aumento do consumo calórico (4) e diminuição do esforço físico, que contribuem para o desequilíbrio do balanço energético e favorecem o ganho de peso corporal (5).

A obesidade está relacionada à comorbidades e mortalidade aumentada, especialmente por doenças cardiovasculares e diabetes (6). Atualmente, as doenças cardiovasculares são

apontadas como a principal causa de morte e a maior causa de incapacidade produtiva em adultos de todo o mundo (7). O excesso de gordura corporal, principalmente a gordura visceral, é um importante preditor para eventos cardiovasculares (8).

Estudos epidemiológicos têm apontado que elevações discretas das concentrações de PCR, mesmo ainda dentro da faixa de referência, podem prever o aparecimento de doenças cardiovasculares (9) e diabetes (10,11).

A PCR é um marcador sensível de inflamação que desempenha papel importante no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (12). A síntese de PCR ocorre no fígado e é fundamentalmente modulada pela IL-6, embora a IL-1 e TNF- $\alpha$  também participem desta modulação (13). Atualmente, sabe-se que o tecido adiposo, além de atuar como estrutura de proteção e sustentação, apresenta intensa atividade endócrina e metabólica (14). Dentre as diversas substâncias secretadas pelos adipócitos, tem-se a citocina pró-inflamatória IL-6 (15), sendo o tecido adiposo responsável pela produção de aproximadamente 30,0% dessa citocina (16). Diversos estudos evidenciaram a associação entre o acúmulo de tecido adiposo e o aumento dos níveis de PCR (17,18).

O reconhecimento de que o tecido adiposo é um órgão metabolicamente ativo, que pode gerar um estado de inflamação crônica de baixa intensidade, abriu novas perspectivas de pesquisas para elucidar as relações entre medidas de adiposidade e marcadores inflamatórios como a PCR. Assim, frente ao aumento da prevalência de obesidade também em populações da área rural é necessária a verificação dessas relações para este grupo populacional. Este trabalho teve o objetivo de verificar a associação entre medidas de adiposidade, variáveis demográficas e bioquímicas com os níveis séricos de PCR em duas comunidades rurais da região do Vale do Jequitinhonha – MG.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foi realizado um estudo epidemiológico de base populacional e delineamento transversal nas comunidades de Virgem das Graças e Caju, respectivamente, áreas rurais dos municípios de Ponto dos Volantes e Jequitinhonha, ambas localizadas no Vale do Jequitinhonha, região nordeste de Minas Gerais. Essas comunidades foram escolhidas por serem locais onde se realizam diversos projetos de pesquisa e de extensão relacionados ao controle de parasitoses intestinais em convênio com instituições nacionais e internacionais (19). A população estudada constituiu-se de indivíduos com idade maior ou igual a 18 anos, de ambos os sexos e pelo menos dois anos de residência no local. Foram excluídos mulheres grávidas, indivíduos diabéticos e indivíduos com valor de PCR acima de 10 mg/l, por ser um valor indicativo de alteração transitória dos níveis de PCR, devido, possivelmente, a uma infecção e/ou estado inflamatório agudo (20).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Minas Gerais segundo o parecer n. ETIC 144/04. Todos os participantes foram informados sobre os objetivos do estudo bem como de seus direitos como participantes e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Os participantes do estudo responderam a um questionário contendo aspectos demográficos e de estilo de vida. Ao final da entrevista foi realizada uma avaliação clínica que consistiu na aferição de medidas antropométricas e hemodinâmicas, além de coleta de sangue para a realização de exames bioquímicos.

A aferição da pressão arterial foi realizada seguindo-se todos os passos preconizados no VII Relatório da Joint National Committee (21). A aferição foi realizada três vezes com intervalos de dois minutos entre cada procedimento, sendo o valor final determinado pela média das três.

Todas as medidas antropométricas foram realizadas em triplicata por antropometristas treinados de acordo com recomendações padronizadas (22), sendo considerada na análise o valor médio entre elas. O peso foi aferido em uma balança digital (Modelo PL 150, Filizola Ltda., Brasil) com aproximação de 0,1 kg, estando o indivíduo sem sapatos e com roupas leves. A altura foi aferida através de uma fita métrica inextensível fixada em uma parede sem rodapé a uma distância de 50 cm do chão com aproximação de 0,1 cm. Os indivíduos foram posicionados em pé, com os pés juntos, olhando para frente, em posição de Frankfurt. O índice de massa corporal foi calculado utilizando a equação  $IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura (m)}^2$  e classificado segundo pontos de corte propostos pela Organização Mundial de Saúde (23). A circunferência da cintura foi aferida com uma fita métrica inelástica, posicionando-a no ponto médio entre a última costela e a parte superior da crista ilíaca. Aferiu-se a medida com aproximação de 0,1 cm ao final de uma expiração normal (23). A circunferência do quadril foi aferida no local de maior protuberância da região glútea com aproximação de 0,1 cm. A razão cintura-quadril (RCQ) foi obtida através da equação  $RCQ = \text{circunferência da cintura} / \text{circunferência do quadril}$ .

Amostras de sangue foram obtidas por meio de punção venosa com o participante em jejum de 12 horas. A coleta e a centrifugação da amostra sanguínea ocorreram no local da pesquisa. O soro e o plasma de cada indivíduo foram separados em tubos de ensaios devidamente identificados e enviados ao laboratório no mesmo dia da coleta, seguindo as especificações técnicas recomendadas. No laboratório, as amostras de soro e plasma foram armazenadas em um refrigerador a -20° C. As concentrações do colesterol total, triglicérides e glicose foram determinadas por um método enzimático colorimétrico utilizando o analisador COBAS MIRA PLUS (Roche Diagnostics). A concentração HDL-c também foi medida por um teste enzimático colorimétrico, após precipitação das

frações LDL-c e VLDL-c pelo ácido fosfotungstico e cloreto de magnésio. Níveis de LDL-c foram calculados por aplicação da equação de Friedwald (24). As concentrações de PCR e insulina foram determinadas por método de alta sensibilidade quimioluminescente usando o analisador IMMULITE 2000 (EURO/DPC). O método é sensível para detectar valores de PCR acima de 0,1 mg/l e valores de insulina acima de 2  $\mu$ U/ml. O índice de resistência à insulina foi avaliado pelo método Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR) a partir da equação  $HOMA-IR = \text{insulinemia de jejum (mU/l)} \times \text{glicemia de jejum (mmol/l)} / 22,5$  (25).

Os dados foram processados e analisados por meio do programa STATA versão 9.0 e, para efeito de interpretação, o limite de erro tipo I foi de até 5% ( $p=0,05$ ). Para caracterizar a população, foram apresentadas tabelas de frequência e tabelas de medidas de tendência central e dispersão das variáveis, segundo o sexo. As variáveis que apresentaram distribuição simétrica, foram descritas por meio de média  $\pm$  desvio padrão e aquelas que apresentaram distribuição fortemente assimétrica, foram descritas por meio da mediana (intervalo interquartilico). Para comparar as diferenças entre as frequências e as médias foram utilizados os testes Qui-quadrado e t-Student respectivamente. O teste de Mann-whitney foi utilizado para comparar os postos das observações que não apresentavam simetria na distribuição. Para as correlações entre variáveis contínuas de interesse foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson. Os valores de PCR, variável dependente de interesse, sofreram transformação logarítmica a fim de reduzir a assimetria da distribuição. Para medir a associação entre as variáveis independentes e o logaritmo neperiano de PCR (lnPCR) foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson. A regressão linear múltipla foi utilizada para avaliar o efeito das variáveis independentes sobre os níveis de lnPCR. A significância do modelo final foi avaliada pelo teste F da análise de variância (ANOVA) e a qualidade do ajuste pelo coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  ajustado). Os resíduos foram avaliados segundo as suposições de normalidade, variância constante e independência.

## RESULTADOS

A população foi constituída por 536 indivíduos sendo 270 (50,37%) do sexo masculino e 266 (49,63%) do sexo feminino. A Tabela 1 apresenta as características demográficas e de estilo de vida de segundo o sexo. A idade variou entre 18 e 94 anos com uma média de 43,34 anos. Para o sexo masculino a média de idade foi 43,57 e para o sexo feminino 43,12 ( $p = 0,764$ ). Observou-se que 69% das pessoas viviam com cônjuge; 75,19% eram de cor não branca; 23,51% ingeriam bebida alcoólica e 34,7% eram analfabetos. Aproximadamente um terço da população era tabagista, entre os que fumavam

71,51% eram do sexo masculino e 28,49% do sexo feminino com uma média de 6,68 e 7,43 cigarros/dia para o sexo masculino e feminino respectivamente.

TABELA 1  
Distribuição da população estudada segundo variáveis demográficas e de estilo de vida, de acordo com o sexo

Variáveis	Sexo Masculino		Sexo Feminino	
	n	%	n	%
Idade (anos)				
18 - 29	74	27,41	75	28,20
30 - 39	55	20,37	57	21,43
40 - 49	46	17,04	43	16,17
50 - 59	44	16,30	36	13,53
> 60	51	18,89	55	20,68
Cor de pele*				
Branca	47	17,41	86	32,33
Não branca	223	82,59	180	67,67
Estado marital				
Com cônjuge	182	67,41	188	70,68
Sem cônjuge	88	32,59	78	29,32
Educação (anos)				
0	103	38,15	83	31,20
1 - 4	112	41,48	111	41,73
5 - 8	37	13,70	38	14,29
> 9	18	6,67	34	12,78
Consumo de álcool*				
Sim	94	34,81	32	12,03
Não	176	65,19	234	87,97
Tabagismo*				
Sim	114	42,22	48	18,05
Não	93	34,44	193	72,56
Ex-fumante	63	23,33	25	9,40

Nota: \*  $p<0,01$  (Teste Qui-quadrado).

Os valores de PCR variaram de 0,09 a 9,94 mg/l com mediana de 2,23 mg/l. A Tabela 2 apresenta as características hemodinâmicas, antropométricas e bioquímicas da população de acordo com o sexo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a pressão arterial sistólica e diastólica, circunferência da cintura e glicemia de jejum. Observou-se maiores níveis de IMC, circunferência do quadril, insulinemia de jejum, HOMA-IR, triglicérides, colesterol total, LDL-c, HDL-c e PCR para o sexo feminino.

Observou-se que 12,22% dos homens e 23,11% das mulheres apresentavam sobrepeso ( $p=0,000$ ) e, 2,22% dos homens e 8,33% das mulheres apresentavam obesidade ( $p=0,000$ ).

A Tabela 3 apresenta a relação entre níveis de PCR e as variáveis estudadas. Os valores de idade, pressão arterial sistólica e diastólica, IMC, circunferência da cintura e do quadril, RCQ, insulinemia de jejum, HOMA-IR, triglicérides, colesterol total e LDL-c correlacionaram-se positivamente com o lnPCR. As variáveis educação e HDL-c apresentaram

correlação inversa com o lnPCR. Não houve associação entre tabagismo e os níveis séricos de lnPCR.

**TABELA 2**  
Características hemodinâmicas, antropométricas e bioquímicas da população estudada de acordo com o sexo

Variáveis	Masculino	Feminino
PA sistólica (mmHg)	136,20 ± 23,55	138,12 ± 29,60
PA diastólica (mmHg)	81,82 ± 13,65	83,93 ± 15,68
IMC (kg/m <sup>2</sup> )**	22,12 ± 2,87	23,61 ± 4,30
Circunferência da cintura (cm)	80,69 ± 8,07	79,98 ± 10,94
Circunferência do quadril (cm)**	90,87 ± 6,07	94,05 ± 8,08
Razão cintura-quadril**	0,89 ± 0,06	0,85 ± 0,08
Glicemia de jejum (mg/dl)	86,59 ± 11,87	86,51 ± 11,06
Insulinemia de jejum (μU/ml)**	1,99 (1,99; 2,97)	3,35 (1,99; 6,45)
HOMA-IR**	0,45 (0,40; 0,64)	0,68 (0,43; 1,38)
Triglicérides (mg/dl)*	83,50 (62; 112)	98 (66; 124)
Colesterol total (mg/dl)**	179,31 ± 42,36	194,27 ± 48,99
LDL colesterol (mg/dl)**	113,11 ± 33,89	123,19 ± 43,61
HDL colesterol (mg/dl)*	46,99 ± 12,60	49,27 ± 13,05
PCR (mg/l)**	1,44 (0,66; 2,75)	2,23 (0,92; 4,22)

Valores apresentados como média ± desvio padrão ou mediana (intervalo interquartilico).

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01 (Teste t-Student ou Mann-Whitney)

**TABELA 3**  
Coeficiente de correlação de Pearson (r) e intervalo de confiança (IC 95%) entre as variáveis de interesse e a concentração de lnPCR

Variáveis	r	IC 95%	Valor-p
Idade (anos)	0,20	0,12 – 0,29	0,000
Tabagismo (cigarros/dia)	0,04	-0,05 – 0,13	0,409
Educação (anos)	-0,11	-0,20 – -0,02	0,017
PA sistólica (mmHg)	0,21	0,12 – 0,29	0,000
PA diastólica (mmHg)	0,18	0,09 – 0,27	0,000
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	0,25	0,17 – 0,34	0,000
Circunferência da cintura (cm)	0,27	0,19 – 0,35	0,000
Circunferência do quadril (cm)	0,21	0,12 – 0,29	0,000
Razão cintura-quadril	0,20	0,11 – 0,28	0,000
Glicemia de jejum (mg/dl)	0,04	-0,05 – 0,13	0,374
Insulinemia de jejum (μU/ml)	0,18	0,09 – 0,27	0,000
HOMA-IR	0,17	0,08 – 0,26	0,000
Triglicérides (mg/dl)	0,15	0,07 – 0,24	0,001
Colesterol total (mg/dl)	0,15	0,06 – 0,23	0,002
LDL colesterol (mg/dl)	0,17	0,08 – 0,25	0,000
HDL colesterol (mg/dl)	-0,11	-0,20 – -0,02	0,019

Após o ajuste do modelo de regressão linear múltipla, as variáveis IMC, idade, sexo, insulinemia de jejum e HDL-c foram independentemente associadas com o aumento do lnPCR na população estudada (Tabela 4). As variáveis independentes contempladas nesse modelo explicaram, aproximadamente, 20% da variação nos níveis de lnPCR ( $R^2_{\text{ajustado}}=0,197$ ).

**TABELA 4**  
Modelo final de regressão linear múltipla com lnPCR como variável dependente

Variável	Coefficiente β	IC 95%	Valor-p
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	0,051	0,029 – 0,073	0,000
Idade (anos)	0,014	0,009 – 0,018	0,000
Sexo (0 = M, 1 = F)	0,375	0,212 – 0,537	0,000
Insulinemia (μU/ml)	0,018	0,002 – 0,034	0,026
HDL-c (mg/dl)	-0,009	-0,015 – -0,003	0,003

Notas:  $R^2_{\text{ajustado}} = 0,197$ ; Coeficiente  $\alpha = -1,085$  ( $p = 0,001$ ).

## DISCUSSÃO

Nesse trabalho foram associados indicadores de adiposidade, variáveis demográficas e bioquímicas com a inflamação crônica de baixa intensidade avaliada por meio da PCR em duas comunidades da área rural. Ressalta-se que a população foi composta por indivíduos adultos não diabéticos, sendo a maioria de cor de pele não branca e com um baixo nível de escolaridade. Os valores médios de IMC e RCQ assim como a prevalência de sobrepeso e obesidade foram maiores para os indivíduos do sexo feminino. Estes resultados estão de acordo com estudos nacionais que revelam que na área rural brasileira o problema de excesso de peso é mais expressivo para o sexo feminino quando comparado ao sexo masculino (3).

Neste estudo todas as variáveis indicadoras de adiposidade foram positivamente correlacionadas com o aumento dos níveis de PCR. Corroborando os nossos resultados, recente trabalho evidenciou correlação significativa entre medidas de adiposidade e PCR (26). Outro estudo envolvendo 1088 indivíduos não diabéticos também evidenciou forte associação entre IMC e PCR e entre circunferência da cintura e PCR (27). Nossos resultados demonstraram que após análise multivariada o IMC continuou significativamente associado com os níveis de PCR. Em estudo realizado com 16.616 participantes do NHANES III observou-se que após ajuste pelas potenciais variáveis confundidoras os homens obesos e mulheres obesas possuíam respectivamente 2,13 e 6,21 vezes a chance de ter os níveis de PCR elevados quando comparados aos não obesos (28).

A PCR, avaliada por meio de técnica de alta sensibilidade, é um reconhecido marcador de inflamação crônica subclínica que tem sido associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (29,9). A PCR é produzida pelos hepatócitos sob estímulo de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 (12), a qual é referida como a principal reguladora da produção de PCR pelo fígado (30). Níveis elevados de PCR podem ser atribuídos, entre outros fatores, a um aumento da expressão desta citocina pelo tecido adiposo (16). Tais resultados sugerem que o risco aumentado para as doenças

cardiovasculares em indivíduos com excesso de peso, pode ser explicado, em parte, pelo estado inflamatório de baixa intensidade gerado pelo acúmulo de gordura corporal.

A inflamação crônica subclínica está intensamente relacionada com o desenvolvimento e progressão da aterosclerose. Estudos indicam que a PCR desempenha um papel importante nos diferentes estágios da aterosclerose (31). Alguns dos mecanismos podem ser explicados pelos efeitos proinflamatórios e proaterogênicos da PCR nas células endoteliais que levam ao aumento da expressão de moléculas de adesão celular (32), de proteína quimioatraente de monócito-1 (33), inibidor de ativação do plasminogênio-1 (34) e diminuição da produção de óxido nítrico (35) e prostaciclina (36). Além disso, a PCR ativa o sistema do complemento (37) e contribui para a formação das células gordurosas nas lesões ateroscleróticas devido à capacidade de agregar moléculas de LDL-c (38).

A idade foi positivamente correlacionada com os níveis de lnPCR e se manteve associada com a mesma após análise multivariada. Em estudo envolvendo 1172 homens aparentemente saudáveis a idade foi um dos principais determinantes da concentração de PCR, visto que ela explicou cerca de 10,0% da variância nos níveis de PCR (39). O sexo também foi significativamente associado com o lnPCR indicando que as mulheres apresentavam níveis de lnPCR maiores que os homens. Em estudo realizado com 6101 indivíduos participantes do Dallas Heart Study foi demonstrado que as mulheres possuíam níveis de PCR significativamente maiores que os homens mesmo após ajuste por IMC e pelos tradicionais fatores de risco cardiovasculares (40).

Outro resultado importante foi a correlação entre os níveis plasmáticos de insulina e a resistência à insulina avaliada por meio do índice HOMA com o aumento nos níveis de PCR, corroborando os resultados encontrados no The Minoh Study (41). Em análise multivariada a insulinemia de jejum permaneceu significativamente associada com o aumento da PCR. Resultados encontrados no The Chennai Urban Rural Epidemiology Study evidenciaram aumentos nos níveis de marcadores inflamatórios como PCR e IL-6 de acordo com o aumento do grau de intolerância à glicose (42). Outros estudos demonstram que em indivíduos não diabéticos os níveis de PCR estão positivamente associados com medidas de resistência à insulina, tais resultados sugerem uma possível relação entre inflamação crônica subclínica e resistência à insulina (27,-43).

Após análise multivariada dos dados observou-se associação significativa entre HDL-c e PCR. Diversos estudos evidenciaram associação inversa e independente entre HDL-c e PCR sugerindo que baixos níveis de HDL-c podem favorecer o processo inflamatório (44,-45). Em recente trabalho envolvendo 10.059 indivíduos saudáveis foi evidenciado, pela

análise de regressão linear múltipla, que idade, sexo, IMC, HOMA, HDL-c e triglicérides foram preditores independentes para o aumento dos níveis de PCR (46).

Algumas limitações devem ser consideradas para este estudo. A primeira deve-se ao fato de não ter sido utilizada uma população com comprovada representatividade da população rural brasileira, podendo, em parte, restringir a validade externa dos resultados encontrados. A segunda limitação é intrínseca ao delineamento do estudo, por se tratar de um estudo transversal, a falta de comprovação de temporalidade nas associações encontradas nos impede uma relação mais segura de causalidade entre as variáveis envolvidas. Nossos resultados, no entanto, corroboram os resultados encontrados em importantes estudos longitudinais e, além disso, os ajustes multivariados excluem, em grande parte, a possibilidade de que as associações encontradas sejam explicadas por outros fatores que não os incluídos no modelo. Acreditamos então que em populações de indivíduos adultos, não diabéticos, com baixo nível socioeconômico e educacional e residentes em área rural, o aumento da idade, do IMC e da insulinemia de jejum, o sexo feminino e a diminuição do HDL-c podem ser bons preditores para caracterizar uma condição de inflamação subclínica.

Em conclusão, neste estudo evidenciamos que a adiposidade, avaliada por meio do IMC, constituiu-se um preditor independente para o aumento dos níveis séricos de PCR. Esse resultado vai ao encontro com a teoria de que o excesso de tecido adiposo é capaz de gerar um estado de inflamação crônica de baixa intensidade. Ressalta-se ainda que a associação independente de tradicionais fatores de risco para as doenças cardiovasculares (idade, sexo, IMC, insulina de jejum e HDL-c) com a PCR evidencia uma estreita relação entre tecido adiposo, doenças cardiovasculares e inflamação, no entanto, novos estudos são necessários a fim de esclarecer ainda mais as relações encontradas.

## REFERÊNCIAS

1. Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev.* 2007; 29:1-5.
2. Kain J, Vio F, Albala C. Obesity trends and determinant factors in Latin América. *Cad Saúde Publica.* 2003; 19 Suppl 1:S77-86.
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003: análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Rio de Janeiro (Brasil): IBGE; 2004.
4. Boeckner LS, Pullen CH, Walker SN, Oberdorfer MK, Hageman PA. Eating behaviors and health history of rural midlife to older women in the Midwestern United States. *J Am Diet Assoc.* 2007; 107:306-10.
5. Pérez-Bravo F, Carrasco E, Santos JL, Calvillán M, Larenas G, Albala C. Prevalence of type 2 diabetes and obesity in rural

6. Mapuche population from Chile. *Nutrition*. 2001; 17:236-8.
7. Field A, Coakley EH, Must A, Spadano JL, Laird N, William H, et al. Impact of overweight on the risk of developing common chronic disease during a 10-year period. *Arch Intern Med*. 2001; 161:1581-6.
8. Mensah GA, Brown DW. An overview of cardiovascular disease burden in the United States. *Health Aff*. 2007; 26:38-48.
9. Barroso SG, Abreu VG, Francischetti EA. A participação do tecido adiposo visceral na gênese da hipertensão arterial e doença cardiovascular aterogênica. Um conceito emergente. *Arq Bras Cardiol*. 2002; 78:618-30.
10. Rizzo M, Corrado E, Coppola G, Muratori I, Novo S. Prediction of cerebrovascular and cardiovascular events in patients with subclinical carotid atherosclerosis: the role of C-reactive protein. *J Investig Med*. 2008; 56:32-40.
11. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001; 286:327-34.
12. Onat A, Can G, Hergenç G. Serum C-reactive protein is an independent risk factor predicting cardiometabolic risk. *Metabolism*. 2008; 57:207-14.
13. Abdellaoui A, Al-Khaffaf H. C-reactive protein (CRP) as a marker in peripheral vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2007; 34:18-22.
14. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. 2000; 148:209-14.
15. Das UN. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition*. 2001; 17:953-66.
16. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004; 145:2273-82.
17. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawaesh A, Mile JM, Katz DR, Yudkin JS, et al. Human subcutaneous adipose tissue releases IL-6 but not TNF- $\alpha$  in vivo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82:4196-200.
18. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*. 2007; 56:1010-3.
19. Fogarty AW, Glancy C, Jones S, Lewis SA, McKeever TM, Britton JR. A prospective study of weight change and systemic inflammation over 9 y. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87:30-5.
20. Gazzinelli A, Velasquez-Melendez G, Crawford SB, LoVerde PT, Correa-Oliveira, R, Kloos H. Socioeconomic determinants of schistosomiasis in a poor rural area in Brazil. *Acta Trop*. 2006; 99:260-71.
21. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*. 2003; 107:499-511.
22. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. The seventh report of the Joint National Committee on detection, evaluation, and treatment of high blood pressure: the JNC 7 report. *JAMA*. 2003; 289:2560-72.
23. Lohman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign: Human Kinetics Books; 1988.
24. World Health Organization. Physical Status: The use and interpretation of anthropometry. Geneva: WHO; 1995.
25. Friedewald WT, Levy, AI, Frederickson DS. Estimation of concentrations of low density cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 18:499-502.
26. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor A, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia*. 1985; 28:412-9.
27. Mahadik SR, Deo SS, Mehtalia SD. Association of adiposity, inflammation and atherosclerosis: the role of adipocytokines and CRP in Asian Indian subjects. *Metab Syndr Relat Disord*. 2008; 6:121-8.
28. Festa A, D'Agostinho R, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome - the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. 2000; 102:42-7.
29. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA*. 1999; 282:2131-5.
30. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*. 2003; 107:391-7.
31. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med*. 1998; 128:127-37.
32. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Effect of C-reactive protein on vascular cells: evidence for a proinflammatory, proatherogenic role. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005; 14:33-37.
33. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000; 102:2165-8.
34. Pasceri V, Cheng J, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*. 2001; 103:2531-4.
35. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation*. 2003; 107:398-404.
36. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MVA, et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation*. 2002; 106:913-9.
37. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells. *Circulation*. 2003; 108:1676-8.
38. Wolbink GJ, Brouwer MC, Buysmann S, Berge IJ, Hack CE. CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes. *J Immunol*. 1996; 157:473-9.

38. Fu T, Borensztajn J. Macrophage uptake of low-density lipoprotein bound to aggregated C-reactive protein: possible mechanism of foam-cell formation in atherosclerotic lesions. *Biochem J.* 2002; 366:195-201.
39. Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM. Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Am J Cardiol.* 1999; 84:1018-22.
40. Khera A, McGuire DK, Murphy SA, Stanek HG, Das SR, Vongpatanasin W, et al. Race and gender differences in C-reactive protein levels. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46:464-9.
41. Nakanishi N, Shiraishi T, Wada M. Association between C-reactive protein and insulin resistance in a Japanese population: the Minoh Study. *Intern Med.* 2005; 44:542-7.
42. Deepa R, Velmurugan K, Arvind K, Sivaram P, Sientay C, Uday S, et al. Serum levels of interleukin 6, C-reactive protein, vascular cell adhesion molecule 1, and monocyte chemoattractant protein 1 in relation to insulin resistance and glucose intolerance—the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES). *Metabolism.* 2006; 55:1232-8.
43. Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De Pergola G. C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25:1416-20.
44. García-Lorda P, Bulló M, Balanzà R, Salas-Salvadó J. C-reactive protein, adiposity and cardiovascular risk factors in a Mediterranean population. *Int J Obes.* 2006; 30:468–74.
45. Nakamura H, Ito H, Egami Y, Kaji Y, Maruyama T, Koike G, et al. Waist circumference is the main determinant of elevated C-reactive protein in metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008; 79:330-6.
46. Rhee EU, Kim YC, Lee WY, Jung CH, Sung KC, Ryu SH, et al. Comparison of insulin resistance and serum high-sensitivity C-reactive protein levels according to the fasting blood glucose subgroups divided by the newly recommended criteria for fasting hyperglycemia in 10059 healthy Koreans. *Metabolism.* 2006; 55:83-7.

Recibido: 29-04-2008

Aceptado: 29-07-2008

## Acidos grasos de la leche materna madura de mujeres venezolanas de estratos socioeconómicos bajos: Influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento

*Virgilio Bosch, Iván Golfetto, Hilda Alonso, Zuly Laurentin, Mercedes Materan y Ninoska García.*

Instituto de Medicina Experimental. Sección de Lipidología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.  
Centro de Análisis Especiales "Dr Jacobo Domínguez Rochil" Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela

**RESUMEN.** La leche materna (LM) es el alimento por excelencia en los niños desde el nacimiento hasta los seis meses de edad. Es importante saber si las condiciones de vida precaria podrían limitar algunos nutrientes en la LM. El objetivo de este estudio fue evaluar el contenido de grasa total (GT) y de ácidos grasos esenciales de cadena larga (LC-PUFA), en leches maternas maduras de mujeres venezolanas de estratos socioeconómicos bajos. Los valores de GT ( $3.56 \pm 1.18$  g/%) coinciden con los reportados en otras publicaciones. La suma de LC-PUFA n-3 fue  $0,3 \pm 0.04\%$  lo cual se corresponde con una dieta materna baja en ácidos grasos serie n-3. Especialmente notorio es el hecho que al calcular la cantidad de 22:6 n-3 que podría aportar la leche materna promedio a un recién nacido de un mes (consumo de 750 ml/día de leche) está por debajo del requerimiento calculado (70 mg/día). La mayoría de estas muestras proveen la cantidad de DHA estimada como conveniente para mantener un adecuado crecimiento del recién nacido. También se exploró como el tiempo (8h y 24h) y la temperatura de almacenamiento ( $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $+15^{\circ}\text{C}$  y  $+25^{\circ}\text{C}$ ) pueden afectar su composición. Estos datos permitirán elegir las mejores condiciones de muestreo y almacenamiento de la leche materna para futuras investigaciones en diversas áreas de Venezuela. Si bien la mayor parte de los ácidos grasos de la leche materna pueden tolerar varias horas a temperatura de unos  $25^{\circ}\text{C}$ , los ácidos LC-PUFA son muy vulnerables. Se propone, en consecuencia, que las muestras, tomadas en recipientes estériles y en hielo seco deben ser transportadas en pocas horas al laboratorio para mantenerlas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

**Palabras clave:** Leche materna, ácidos grasos n-3, estrato socioeconómico, temperatura, almacenamiento.

**SUMMARY.** Fatty acids in mature breast milk from low socioeconomic levels of Venezuelan women: influence of temperature and time of storage. Breast milk is the main food in infants from birth until six months old. It is important to know if precarious life conditions could limit some nutrients in mother's milk. The objective of this study is to evaluate the total fat and essential long chain fatty acids in mature breast milk from low socioeconomic levels in Venezuelan women. The values of total fat ( $3.56 \pm 1.18$  g/%) are similar that reported in the literature, however the sum of LC-PUFA n-3 was  $0,3 \pm 0.04\%$  which is related with low n-3 fatty acid maternal diet. The sum LC-PUFA n-3 contained in this study is below most of the reviewed publications. The average amount of 22:6 n-3 in breast milk offered to newborn one month old (750 ml/day) is below estimated requirements (70mg/day). The majority of these samples provide to the infants, the amount of DHA estimated as convenient to sustain normal growth. Also it was explored how the time (8h to 24 h) and temperatura ( $+4^{\circ}\text{C}$ ,  $+15^{\circ}\text{C}$  y  $+25^{\circ}\text{C}$ ) can affect its composition. This data will permit to select the best conditions of sampling and storage of mother's milk in future investigations in different regions of Venezuela. Most of the breast milk fatty acids tolerate some hours at room temperature ( $25^{\circ}\text{C}$ ) but essential long chain fatty acids are very vulnerable. We propose that, in consequence, that samples should be transported in sterile conditions in dry ice to the laboratory in a few hours and should be kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until their analysis.

**Key words:** Breast milk, n-3 fatty acids, socioeconomic level, temperature, storage.

### INTRODUCCION

Como resultado de varias y convincentes investigaciones se sabe que el rápido crecimiento del sistema nervioso humano que se observa después del nacimiento, requiere un sostenido aporte, de ácidos grasos esenciales de cadena larga (LC-PUFA) entre otros variados nutrientes (1). La síntesis de estos ácidos por las células del sistema nervioso central (SNC) a partir de precursores de cadena más corta y menos insaturados (18:2 n6 y 18:3 n3) se produce en muy pequeñas cantidades, como

ha sido demostrado en astrocitos y células del hipocampo de la rata. Esta síntesis adquiere importancia solo cuando hay deficiencia en la dieta de los LCPUFA (2,3). En diversas investigaciones sobre el contenido de LC-PUFA en muestras de leche materna se ha podido constatar que hay una gran variabilidad en las distintas poblaciones y que existe un cierto grado de dependencia de la cantidad de LC-PUFA de la leche y la dieta materna. Como consecuencia de esto es predecible que en poblaciones con bajo contenido dietético de los ácidos grasos esenciales en general y en particular de los LC-PUFA,

puedan darse situaciones críticas en la composición de la leche materna que afecte adversamente el crecimiento y desarrollo del SNC (4,5,6). Por tanto, es necesario que en cada población se tenga una idea de la composición en ácidos grasos de la leche materna o de cualquier leche que intente usarse como sustituto cuando es absolutamente imposible el uso de la leche materna.

El objetivo de este trabajo fue analizar muestras de leche materna madura de un grupo de mujeres de estratos socio económicos bajos, e investigar si existen diferencias analíticas al variar las condiciones de almacenaje a distintas temperaturas y tiempos hasta la llegada de las muestras al laboratorio.

### MATERIALES Y METODOS

En este estudio participaron previo consentimiento 20 madres, que tenían cerca de 8 semanas amantando a sus hijos nacidos de un parto normal a término y peso al nacer normal (Tabla 1). Las madres se sometieron a un examen clínico y a un interrogatorio para asegurarse que ninguna tenía alguna enfermedad (diabetes mellitus, afección tiroidea, obesidad, hipertensión, síndrome metabólico, trastornos hepáticos o renales), o que estuviera bajo control terapéutico alguno.

TABLA 1  
Datos de las madres y de los recién nacidos

Edad (años)	Madres		n	TL (meses)	Recién nacidos	
	Paridad	ES			Talla (cm.)	PN (kg)
26,8 ± 0,9	2,15 ± 0,3	V	2	1,9 ± 0,2	51,05±0,8	3,343±100,7
		IV	17			
		III	1			

PN = Peso al nacer

ES = Estrato Socioeconómico TL = Tiempo de lactancia

Estas madres provenían de una clínica de control de embarazadas normales que asiste a madres de escasos recursos económicos. El estrato socioeconómico de las madres se determinó aplicando el método de Grafar-Méndez Castellano (8), el cual establece una escala del I al V, en base a la profesión del jefe de familia, la instrucción de la madre, la fuente de ingreso y el tipo de alojamiento. Las escalas I y II corresponden a los estratos de mejor condición socioeconómica, las escalas IV y V incluyen a los estratos de menores recursos y la escala III a una condición económica intermedia.

Las muestras de leche para el estudio fueron extraídas durante las mañanas, al mes de amamantamiento al final de una de las succiones del recién nacido (RN). Las muestras recibidas en envases estériles se colocaron inmediatamente a -70°C hasta el momento de realizar los estudios correspondientes.

Una vez descongeladas las muestras, de cada una de ellas se tomó una alícuota para el análisis inmediato, sin tiempo de

espera, a esta determinación se le denominó “Tiempo 0” (T0); otras porciones de la muestra descongelada se colocaron en baño de agua a tres temperaturas: +4°C, +15°C y +25°C, cada una con dos tiempos de exposición: 8 horas y 24 horas. Es decir, un total de 7 condiciones distintas incluyendo T0. Después de transcurrido el tiempo establecido las muestras se analizaron igual a la muestra T0.

Las muestras de leche se dividieron en dos partes, una para la determinación cuantitativa de lípidos totales y la otra para determinar el perfil de ácidos grasos. Los lípidos de cada una de las muestras de leche se extrajeron por el método de Folch y col (8). Los lípidos extraídos fueron evaporados en un roto-evaporador en tres pasos sucesivos con metanol con el fin de eliminar cualquier residuo de agua. Finalmente los lípidos se redisolieron en cloroformo, tanto para su análisis por gravimetría como para la determinación del perfil de ácidos grasos por cromatografía en fase gas líquido. Para la determinación de los lípidos totales de cada una de las leches por gravimetría, el cloroformo se evaporó completamente en atmósfera de nitrógeno.

Los ácidos grasos contenidos en los lípidos evaporados, se transesterificaron en una mezcla de metanol anhidro y cloruro de acetilo en proporción 100:15 v/v respectivamente, en baño de arena a una temperatura de 70 °C, durante tres horas de acuerdo al método de Ghebremeskel y col modificado 1995 (9). La reacción se detuvo con una solución de cloruro de sodio al 5% en agua, se neutralizó con una solución acuosa de bicarbonato de potasio al 2%, y se realizó la extracción de los metil ésteres de ácidos grasos (MAG) con éter de petróleo (40-60°C) que contenía tolueno beta hidroxibutirato (BHT) al 0,01%.

Los MAG obtenidos, fueron separados mediante cromatografía en fase gas líquido, usando un cromatógrafo Hewlett Packard, modelo HP 6890 Plus GC, versión A.03.07, con una columna capilar de 30 m x 0.32 mm d.i., 0.25 µm de película interna. Se usó helio como gas transportador, las temperaturas del inyector, horno y del detector fueron 250, 200 y 280°C respectivamente. Los MAG fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de un estándar Sigma (Cat: 189-19, St. Louis, USA). El área de los picos fueron cuantificados electrónicamente.

Se calculó la ingestión equivalente de DHA de un lactante que consuma 750ml de leche materna/día, de acuerdo a lo propuesto por Uauy y colaboradores (10).

### RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los datos de las madres incluidas en nuestra muestra así como la clasificación en la escala de Grafar-Méndez Castellano, también se muestran los datos de los RN.

En la Tabla 2 se observa el valor en porcentaje del área total de cada uno de los ácidos grasos considerados en nuestro

análisis en T0. En esta Tabla 2, se puede notar que cerca del 80% de los ácidos grasos de la leche está representado por la suma de los ácidos grasos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1, n-9) y linoleico (LN) (18:2, n-6). En cuanto a los ácidos grasos de cadena larga, de 20 ó más carbonos, es importante destacar el muy bajo contenido del ácido docosahexaenoico (DHA), de la serie n-3 (Tabla 2). En la Tabla 3 se muestran las desviaciones absolutas después de la exposición de las muestras a 4°C y 15°C durante 8 horas. Para simplificar se omiten los datos de 15°C y 25°C y 24 horas que mostraron mucho más variación. Sólo indicamos los valores correspondientes a los ácidos araquidónico (AA), eicosapentaenoico (EPA) y DHA, porque todos los otros ácidos grasos mostraron variaciones bajas (<5%). Para la elaboración de esta tabla se toma como 100% el dato correspondiente al ácido graso de la muestra inmediatamente congelada a -70°C (T0).

**TABLA 2**  
Porcentaje de los ácidos grasos en las leches maternas maduras en tiempo cero (T0)

Acidos grasos	%
6:0	0,2 ± 0,3
8:0	0,3 ± 0,3
10:0	1,2 ± 0,6
11:0	0,06 ± 0,05
12:0	5,8 ± 2,4
14:0	6,01 ± 2,5
14:1n-5	0,2 ± 0,09
15:0	0,3 ± 0,08
16:0	22 ± 1,4
16:1n-7	3 ± 0,8
17:0	0,33 ± 0,07
17:1n-7	0,23 ± 0,06
18:0	6 ± 1,6
18:1n-9	30,7 ± 4,4
18:2 n-6	18,7 ± 3,4
18:3 n-6	0,2 ± 0,08
18:3 n-3	1,03 ± 0,4
20:0	0,15 ± 0,04
20:1n-6	0,28 ± 0,13
20:2 n-6	0,4 ± 0,117
20:3 n-6	0,44 ± 0,12
20:4 n-6	0,44 ± 0,14
20:5 n-3	0,14 ± 0,16
22:6 n-3	0,17 ± 0,09
Σ n-6	21,2 ± 0,8
Σ n-3	1,5 ± 0,08
LC-PUFA n-6	1,6 ± 0,074
LC-PUFA n-3	0,3 ± 0,041
AA/DHA	2,8 ± 0,2
LN / ARA	49 ± 3,8

Promedio ± EE      N = 20      LC: larga cadena  
PUFA: ácidos grasos poliinsaturados      LN: linoleico  
ARA: araquidónico

**TABLA 3**

Desviaciones absolutas desde el valor “Tiempo 0” de los ácidos grasos C20:4 n6, C20:5n3 y C22:6n3, después de la exposición de las muestras a 4°C y 15°C durante 8 horas

Te/T	% C20:4 n6	% C20:5 n3	% C22:6 n3
4°C/ 8hs	6.3 (2.5)	16 (5)	17 (7)
15°C/ 8hs	9.7 (4)	12 (5)	11 (5)

Te/ T = Temperatura de exposición/ Tiempo

Los restantes ácidos grasos tuvieron desviaciones absolutas de < 5%

**DISCUSION**

Las madres venezolanas estudiadas muestran que la leche madura que segregan tiene un contenido bajo de ácidos grasos esenciales de cadena larga de la serie n-3, si se compara con los datos publicados de madres de países occidentales desarrollados. Notoriamente bajo es el porcentaje de DHA con un promedio de 0,17%, ninguna de las muestras supera el valor de 0,4%. Comparado con poblaciones asiáticas el valor de 0,17±0,09 % es notoriamente bajo en relación al 0,8±0,1% reportado en las mujeres tailandesas (11). Contrasta esto con el contenido de los ácidos de la serie n-6 que muestran valores de los más altos encontrados en la literatura médica.

Esta situación se parece a las publicadas para poblaciones con dietas pobres en grasas y ricas en carbohidratos como los que se han encontrado en China, Chile y Brasil (12,13,14) Esta característica de la serie n-3 se destaca más claramente cuando observamos que al hacer el cálculo de la cantidad de DHA que la leche de cada madre puede entregar a un niño que ingiera unos 750 mL/día de leche, que se presenta en la Tabla 4, no alcanza en promedio a los 70 mg que se han considerado necesarios para sostener el crecimiento de las estructuras del sistema nervioso y la retina. Un 30% de las madres está por debajo de 50mg cuando se calcula el aporte de DHA proveniente del ácido αlinolénico (LNA) en 1%. La situación mejora muy poco considerando una tasa de conversión del 10%. De modo que para poder suministrar 70 mg/día o más de DHA, sin contar con la conversión de otros ácidos grasos de la serie n-3, tendríamos que tener una concentración de DHA en la leche cerca de 0,4%, valor éste muy por encima de los escasos 0,17% que hemos encontrado como promedio de nuestra muestra. La suma de todos los LC-PUFA n-3 (Tabla 2), sólo alcanza a 0,3%.

TABLE 4  
Consumo estimado de C22:6 n3 por los lactantes con una ingesta de 750mL/día de leche materna. (Calculada según Uauy y col (10))

LM Grasa total (g/ml)	LM % C18:3 n3	LM % C22:6	Cantidad de grasa de LM ingerida por el lactante (g/día)	Consumo de C22:6 n3 por el lactante (mg/día)
0,03 ± 0,01	1,24 ± 0,41	0,17 ± 0,07	22,4 ± 8,2	66,37 ± 30,97

LM= leche materna (n = 20)

Por el contrario, la serie n-6 se encuentra bien representada debido al alto contenido de LN y a una cantidad de AA parecida a las encontradas en poblaciones con una alimentación más adecuada. El alto valor de LN en comparación con los datos de poblaciones de países industrializados de occidente, seguramente deriva del uso muy frecuente de aceites vegetales ricos en este ácido graso (soja, girasol, maíz, ajonjolí, maní) en la preparación de los alimentos (15). En este contexto es importante notar en la Tabla 2, que las relaciones LN/AA > 20 y AA/DHA > 3 difieren bastante de las recomendadas, 0.5-1 y 1 a 2 respectivamente. Todos estos datos nos permiten afirmar que la mayoría de estas madres producen una leche que escasamente puede suministrar la cantidad de DHA necesaria para garantizar el crecimiento de las importantes estructuras que lo necesitan. Este problema es de gran importancia si consideramos que en caso de tener el neonato un bajo peso al nacer, la demanda que debe sostener la leche es mayor y más prolongada y la inmadurez del niño no permite una tasa de conversión alfa linolénico (18:3 n-3, LNL) hacia AA ni siquiera de 1%. Es muy probable que los tejidos del neonato (hígado, piel, músculos) puedan servir de reservorio para sostener el crecimiento más crítico del SNC y la retina. En nuestro laboratorio recientemente hemos mostrado evidencias de que en la rata ese rol puede asumirlo el tejido adiposo marrón ya que el tejido adiposo blanco no contiene DHA en cantidades apreciables (16).

Por todos estos argumentos consideramos de importancia que se defina con más amplitud estas peculiaridades de la composición de la leche materna, sobre todo si se toman en cuenta las diferencias regionales que existen en Venezuela en el consumo de alimentos de origen marino y las debidas al marcado gradiente socioeconómico.

En este trabajo además, mostramos que si bien la mayor parte de los ácidos grasos de la leche materna pueden tolerar varias horas a temperatura de unos 25°C, los ácidos LC-PUFA son muy vulnerables. En La Tabla 3 sólo damos los datos de la variación de AA y DHA en muestras de leche dejadas 8 horas a dos temperaturas (4°C y 15°C). Se ve que el porcentaje de variación con respecto al valor T0, es inaceptablemente

alto. Se propone, en consecuencia, que las muestras, pocos minutos después de tomadas en recipientes estériles, deban ser llevadas bajo hielo seco al laboratorio en pocas horas y luego mantenerlas a -70 °C hasta el momento del análisis.

## REFERENCIAS

- Lauritzen L, Hansen HS, Jorgensen MH and Michaelsen KF. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in Lipid Res* 2001; 40:1-94.
- Willard DE, Harmon SD, Kaduce TL, Preuss M, Moore SA, Robbins MEC and Spector AA. Docosahexaenoic acid Synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocyte. *J Lipid Res* 2001 ; 42: 1368-1376.
- Kaduce TL, Chen Y, Hell JW and Spector AA. Docosahexaenoic acids synthesis from n-3 fatty acids precursors in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2008; 105 (4): 1525-1535.
- Jorgensen MH, Hernell O, Hughes E and Michaelsen KF. Is there a relation between docosahexaenoic acid concentration in mothers' milk and visual development in term infants? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32: 293-296.
- Crawford MA, Doyle W, Drury P, Lenon A, Costeloe K and Leighfield M. N-6 and n-3 fatty acids during early human development. *J Intern Med* 1989; 225 suppl1: S159-169.
- Innis SM. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Adv Exp Med Biol*. 2004; 554: 27-43.
- Folch J, Lees M and Slone-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 1957; 54:497-507.
- Méndez CH, Méndez MC. Sociedad y Estratificación. Método Graffar-Méndez Castellano. Caracas: Fundacredesa; 1994.
- Ghebremeskel K, Leighfield M, Leaf A, Costeloe K and Crawford M. Fatty acid composition of plasma and red cell phospholipids of preterm babies fed on breast milk and formulae. *Eur J Pediatr* 1995; 154:46-52.
- Uauy R, Hoffman DR, Mena P, Llanos A, Birch EE. Term infant studies of DHA and ARA supplementation on neurodevelopment: results of randomized controlled trials. *J Pediatr* 2003; 143 Suppl4: S17-25.
- Golfetto I, McGready R, Ghebremeskel K, Min Y, Dubowitz L, Nosten F, Drury P, Simpson JA, Arunjerja R, Crawford MA. Fatty acid composition of milk of refugee Karen and urban Korean mothers. Is the level of DHA in breast milk of Western women compromised by high intake of saturated fat and linoleic acid? *Nutr Health* 2007; 18(4): 319-332.
- Ruan C, Liu X, Hongsheng M, Xiulan M, Guizheng L, Gianhong D, De Franchesco CA and Connor WE. Milk composition of women from five different regions of China: the great diversity of milk fatty acids. *J Nutr* 1995; 125: 2993-2998.
- Milad M, Mena P, Nieto S and Uauy R. Fatty acid composition of human milk lipids in Chilean women. *Acta Pediatr* 2004; 93(6): 855-860.

14. Cunha J, Macedo da Costa TH, Ito MK. Influences of maternal dietary intake and suckling on breast milk lipid and fatty acid composition in low-income women from Brasilia, Brazil. *Early Hum Dev.* 2005; 81(3): 303-11.
15. Dubnov G, Berry EM. Omega-6/omega-3 fatty acid ratio: the Israeli paradox world. *Rev Nutr Diet* 2003; 92: 81-91.
16. Venezuela A, Cuevas C y Bosch V. ¿Funciona el tejido adiposo marrón como un depósito de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga durante el desarrollo postnatal del cerebro?. *Arch Latinoamer Nutr* 2007; 57(1): 5-9

Recibido: 06-08-2008

Aceptado: 09-02-2009

## Caracterización de cepas de *Listeria monocytogenes* realizados a partir de queso fresco proveniente de diferentes zonas productoras costarricenses

Carolina Chaves y María Laura Arias

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales

**RESUMEN.** En Costa Rica, cerca del 25% de la producción de leche nacional es utilizada en la elaboración de queso tierno no pasteurizado, y el consumo de este producto es aproximadamente de 4 a 5 kg anuales per cápita. Este alimento ha sido involucrado en brotes debidos a *Listeria monocytogenes*. Dado lo anterior, se aisló e identificó esta bacteria a partir de muestras de queso blanco no pasteurizado provenientes de dos zonas tradicionalmente productoras y expendedoras de dicho producto. Se recolectaron 110 muestras de queso a partir de las cuales se aislaron 27 cepas de *L. monocytogenes*. Las cepas fueron caracterizadas mediante pruebas bioquímicas y serológicas, además se les realizaron pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, hemólisis en tubo e invasión en células Hela. El 85% de las cepas evaluadas fueron sensibles a todos los antibióticos analizados, no obstante, cuatro cepas (15%) presentaron patrones de resistencia a diversos agentes, incluyendo estreptomycin, kanamicina, cefalotina y tetraciclina. También, se encontraron patrones de resistencia múltiple. El 88,9% de los aislamientos estudiados fueron positivos para la prueba de hemólisis en tubo, y el 22,2% presentaron porcentajes de invasión iguales o superiores a la cepa de origen clínico usada como control. Cabe destacar que todas las cepas con capacidad de invasión fueron también susceptibles a todos los antibióticos usados. Los resultados encontrados ponen de manifiesto la presencia de *L. monocytogenes* en queso blanco de origen costarricense. También se evidencia un alto porcentaje de susceptibilidad a los antibióticos de uso común para los casos de listeriosis. Por otro lado, pone de manifiesto que el queso blanco puede ser transmisor de cepas con capacidad de invasión y por ende, potencialmente patógenas al hombre.

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*, queso, invasión, resistencia a antibióticos.

### INTRODUCCION

El género *Listeria* está conformado por bacilos Gram positivos, no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos y móviles de 10 a 25°C (1). Está dividido en seis especies, de las cuales, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son consideradas patógenas, siendo *L. monocytogenes* el agente causal de la listeriosis (2).

Este microorganismo presenta una amplia distribución en el ambiente. Se ha aislado a partir de diversas fuentes incluyendo suelo, vegetación, ensilaje, materia fecal, agua y

**SUMMARY.** Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from raw cheese samples acquired from different Costa Rican producer zones. In Costa Rica, almost 25% of the national milk production is used for the elaboration of non pasteurized soft cheese, and the annual intake of this product is around 4-5 kg per capita. This product has been identified as the source of food borne outbreaks due to *Listeria monocytogenes*. Given that, the isolation and identification of this bacterium from non pasteurized soft cheese samples coming from two producer zones of Costa Rica was performed. 110 cheese samples were collected, from which 27 *L. monocytogenes* strains were isolated. These were characterized using biochemical and serological tests, also, susceptibility to common used antibiotics, test tube hemolysis and invasion in Hela cells trials were performed. 85% of the strains evaluated were sensible to all the antibiotics analyzed, nevertheless, four strains presented resistance to different agents, including streptomycin, kanamycin, cephalotin and tetracycline. Also, multiple resistance patterns were found. 88,9% of the studied isolates were positive for the test tube hemolysis trial; 22,2% presented invasion percentages higher than the clinical origin strain used as control. It is important to point out that all the invasive strains were completely susceptible to the antibiotics tested. The results found demonstrate the presence of *L. monocytogenes* in Costa Rican soft cheese samples. Also, demonstrate its high percent of susceptibility to common use antibiotics. Same time, invasion trials show that soft cheese may be a source of invasive and potentially pathogenic strains for human being.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, cheese, invasion, antibiotics resistance.

aguas residuales entre otras. Es una bacteria capaz de resistir y crecer en condiciones ambientales adversas (3) incluyendo las temperaturas de refrigeración (4)

Los cuadros de listeriosis son causados en su mayoría por la ingesta de alimentos contaminados, (5,6,7) destacándose los productos listos para consumir que soportan el crecimiento de esta bacteria, tienen un tiempo de conservación prolongado en condiciones de refrigeración y se consumen sin tratamiento. (2).

Una de las particularidades de esta bacteria, es que presenta diferencias de virulencia entre las mismas cepas (8,9).

Los mecanismos de variabilidad de la virulencia de este microorganismo no se conocen en su totalidad y además, no existe aún un marcador que permita diferenciar los aislamientos virulentos de los avirulentos (10).

Por otro lado, a pesar de que los aislamientos clínicos de esta bacteria usualmente muestran susceptibilidad a un amplio rango de antibióticos y que desde 1988 quedó demostrada la emergencia de un patrón de resistencia (11), existe poca información respecto a los patrones de sensibilidad que presentan las cepas de esta bacteria aisladas a partir de alimentos y que no han sido consideradas como causantes de enfermedad (12,13).

Dentro de la industria láctea, esta bacteria es de especial importancia ya que diversos derivados han sido involucrados en brotes, aparte de que ha sido aislada en varios ambientes dentro de la misma (14-16), dada su capacidad de formar biopelículas (10). El queso fresco es especialmente vulnerable a contaminación con *Listeria*, dado su alto contenido de humedad, alta disponibilidad de nutrientes, concentración de sal de 1-3% y especialmente, el hecho de que se consume sin recibir ningún tratamiento térmico (17).

Dado lo anterior y considerando que en Costa Rica, alrededor del 25% de la producción de leche es utilizada en la elaboración de queso tierno no pasteurizado, y que el consumo de este producto es aproximadamente de 4 a 5 kg anuales per cápita (17), se aislaron, identificaron y caracterizaron cepas de *Listeria monocytogenes* obtenidas de quesos que se expenden en el Área Metropolitana de San José, Costa Rica, tomando en consideración algunas de sus características patognomónicas como son su capacidad de invasión y su resistencia a diversos antibióticos.

## MATERIAL Y METODOS

### Adquisición de las muestras

Las muestras alimenticias seleccionadas fueron adquiridas en lugares asociados a la producción y venta de queso fresco, en la zona norte del país y en Santa Cruz de Turrialba, durante los meses de abril a diciembre, 2007. De cada sitio seleccionado se tomaron por lo menos 10 muestras, para un total de 110 muestras.

### Aislamiento

Se siguió la metodología descrita en el Manual de Bacteriología, Food and Drug Administration, 1995 (18) para determinar la presencia/ausencia de esta bacteria en 25 g. Brevemente, 25 g de cada muestra fueron enriquecidos en 225 ml de caldo de *Listeria* e incubados a 30 °C por 48 horas. Posteriormente, se inocularon placas de agar Oxford a partir del caldo del enriquecimiento, las cuales fueron incubadas por 48 horas a 35 °C. Las colonias típicas fueron confirmadas por la prueba de luz de Henry, morfología, motilidad, hemólisis,

prueba de CAMP (Christie, Atkins and Much-Petersen) y utilización de xilosa y ramnosa. Además, se realizó una caracterización serológica utilizando el antisuero tipo anti-O polivalente (serotipos 1,4), (Bacto®).

### Prueba de la susceptibilidad de los antibióticos

Se utilizó el método de difusión en disco (19), con agar Mueller-Hinton complementado con sangre, se emplearon discos impregnados con antibiótico de la marca Oxoid con los siguientes 9 antibióticos: Ampicilina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Estreptomina (10 µg), Kanamicina (10 µg), Cloranfenicol (30 µg), Cefalotina (30 µg), Eritromicina (15 µg), y Rifampicina (5 µg).

### Análisis de invasión

Los ensayos de invasión con células Caco-2 se realizaron como se ha descrito previamente en la literatura (20) con algunas modificaciones leves, incluyendo el uso de células HeLa en lugar de Caco-2. Se utilizó éstas dada su mayor disponibilidad y facilidad de cultivo y mantenimiento, aparte que está claramente establecido en la literatura la capacidad de *L.monocytogenes* de infectarlas (21)

Brevemente, las cepas de *L. monocytogenes* fueron cultivadas durante una noche a 30°C sin agitación. Monocapas confluentes de células HeLa (cervical cáncer cells, Henrietta Lacks) fueron inoculadas con  $2 \times 10^7$  las células/pozo de *L. monocytogenes* (análisis en placa de seis hoyos). Las monocapas de células HeLa inoculadas fueron incubadas por 30 minutos a 37°C, seguido por tres lavados con PBS (buffer de sal y fosfatos) y luego se añadió medio fresco sin antibióticos. Se agregó medio de cultivo con 150 µg/ml de gentamicina a los 45 minutos post inoculación para eliminar las bacterias extracelulares. A los 90 minutos post inoculación, las monocapas de HeLa fueron lavadas tres veces con PBS, y estas se lisaron luego por la adición de agua destilada estéril fría y pipeteo vigoroso. Las bacterias intracelulares fueron enumeradas por medio de siembra por expansión de la suspensión de células lisadas en las placas de agar infusión cerebro corazón. La eficacia de la invasión fue medida como el porcentaje del inóculo recuperado por la enumeración de bacterias intracelulares. Una cepa de origen clínico (HNN23), aislada a partir de un paciente con meningitis por *L. monocytogenes* fue utilizada como control de invasión, y medio sin inocular se incluyó como control en cada análisis de invasión.

### Prueba de hemólisis en tubo

El ensayo de hemólisis se realizó según la metodología descrita por Ellner y Marth (22). Brevemente, las colonias sospechosas son inoculadas en caldo infusión cerebro corazón, al cual se le incorpora eritrocitos bovinos y se incuban a 35°C por 48 h. Transcurrido este período, se evalúa la presencia de hemólisis en el sobrenadante.

## RESULTADOS

### Aislamiento

Se logró aislar, a partir de diversas muestras de queso tierno, un total de 27 cepas de *L. monocytogenes*, las cuales fueron completamente identificadas como esta especie desde el punto de vista bioquímico y serológico (aglutinaron el suero polivalente). Doce de estas cepas (44,4%) provienen de la zona norte del país y 15 (55,6%) provenientes de la zona de Santa Cruz de Turrialba.

### Prueba de susceptibilidad a los antibióticos

El 85% (n = 27) de las cepas evaluadas fueron sensibles a todos los antibióticos analizados, no obstante, 4 cepas presentaron multi resistencia (Tabla 1). Una de estas era originaria de la zona norte del país y mostró resistencia a estreptomocina, kanamicina y cefalotina. Las otras tres cepas, fueron originarias de Santa Cruz de Turrialba, y presentaron resistencia a tetraciclina, la segunda a tetraciclina y cloranfenicol, y la tercera a cloranfenicol y rifampicina.

TABLA 1

Cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de queso fresco en Costa Rica que presentan resistencia a los antibióticos y/o un porcentaje de invasión superior a la cepa control

# Cepa	Ampicilina	Gentamicina	Tetraciclín	Estreptomocina	Kanamicina	Eritromicina	Cloranfenicol	Cefalotina	Rifampicina	% de invasión*
SC1a	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,0004
Z1a	S	S	S	R	R	S	S	R	S	0,00002
LD/QT1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,0001
3	S	S	R	S	S	S	S	S	S	0,0008
12	S	S	R	S	S	S	R	S	S	0,00003
17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,0004
42	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,0004
49	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,00004
63	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,0001

Porcentaje invasión control HNN23: 0,0001% S= sensible R= resistente

### Análisis de invasión

Al realizar el análisis de invasión de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas a partir de queso fresco se encontró que 6 de éstas (22,2%), provenientes de ambas zonas del estudio, presentaron porcentajes de invasión iguales o superiores a la cepa clínica utilizada como control (>0,0001), destacándose una cepa proveniente de la zona norte del país, con un porcentaje de invasión muy alto (0,004%) comparado con las demás. Cabe destacar que no se observó ninguna asociación con respecto al lugar de origen de las muestras.

Por otro lado, es importante destacar que, todas las muestras con características invasivas, fueron susceptibles a todos los antibióticos evaluados.

### Prueba de hemólisis en tubo

El 88,4% de los aislamientos evaluados presentaron hemólisis en el sobrenadante del tubo, así como destrucción de los eritrocitos.

## DISCUSION

La presencia de *L. monocytogenes* en queso blanco producido en Costa Rica ha sido demostrada por diversos autores, los cuales reportan frecuencias que varían entre 10 y un 45% de positividad (22,23). A nivel mundial, su frecuencia oscila también entre 0% reportado en Italia y Nueva Zelanda, hasta un 43%, reportado en España, con una media del 9% (8).

La gran dispersión de estos datos coincide con el hecho que la mayoría de los casos de listeriosis humana son esporádicos y la fuente generalmente no se conoce. No obstante, se considera que los alimentos contaminados son la principal vía de transmisión y de estos, los asociados con mayor frecuencia son los productos listos para consumir, con prolongados tiempos de conservación en refrigeración. (3).

El tratamiento de primera elección de esta infección se basa en un esquema de beta lactámicos como ampicilina y

aminoglicósidos como gentamicina. Los antibióticos de segunda elección incluyen la ciprofloxacina, eritromicina y rifampicina, y la combinación de trimetoprim y sulfametoxazol (24,25).

Con respecto a la respuesta de esta bacteria ante estos antibióticos, a nivel mundial se considera que su resistencia es baja (24), tal y como se encontró en el presente estudio (85% de sensibilidad). No obstante, es importante destacar que se encontró 2 cepas (7,4%) resistentes a tetraciclina, uno de los antibióticos para los que se encuentran reportados en la literatura algunos de los mayores niveles de resistencia (11). Desde 1988 se detectó la emergencia de cepas de *L. monocytogenes* resistentes a antibióticos (26) y de igual manera, se ha descrito resistencia a uno o más antibióticos, tal y como se reportó en al menos 3 cepas del presente estudio (24,267). Esta resistencia múltiple ha sido asociada a la presencia de plásmidos auto-transferibles, posiblemente originados en cepas de *Enterococcus* y *Streptococcus* (9,24, 28).

La trascendencia de lo anterior estriba en que *L. monocytogenes* demuestra la capacidad de adquirir resistencia a antibióticos y su potencial diseminación, lo cual posee una gran importancia sanitaria, sobre todo tomando en cuenta la ubicuidad de esta bacteria.

En cuanto a la virulencia de esta bacteria, aún se desconoce si es dependiente de la capacidad del microorganismo de invadir los enterocitos o las células M en las placas de Peyer del huésped. Diversos estudios han sugerido que algunas cepas son más virulentas que otras (29,30) y se ha encontrado que aunque la gran mayoría de las cepas tiene los genes de virulencia en sus genomas, no siempre los expresan. Los mecanismos de variabilidad de la virulencia de la *L. monocytogenes* aún no se dilucidan totalmente y además, no existe, hasta la fecha, un marcador que permita diferenciar los aislamientos virulentos de los avirulentos (31).

Dentro de estos marcadores de virulencia, fue la actividad hemolítica de los aislamientos el primer factor estudiado, ya que el grado de hemólisis es una prueba indicativa de la expresión activa del gen *hly* (32). La listeriolisina O (LLO) es la hemolisina responsable de la hemólisis tipo B que caracteriza a las colonias de *L. monocytogenes* en agar sangre y en el presente trabajo, 88,9% de los aislamientos presentaron este tipo de hemólisis.

Diversos trabajos han demostrado que las escasas cepas no hemolíticas de este patógeno suelen ser avirulentas debido a que, aunque llegan a ser invasivas, son incapaces de escapar de la vacuola fagocítica. No obstante, éste es un tema polémico, ya que como lo establecen López *et al.*, un solo factor de virulencia puede estar atenuado y aún así, el aislamiento puede ser patógeno (31).

La invasividad a células de origen humano también ha sido utilizado como marcador de virulencia para *L.*

*monocytogenes*. Varias líneas celulares han sido utilizadas para este tipo de prueba, entre ellas las Caco (20). La invasión de *L. monocytogenes* a estas células es promovida por la proteína internalina A (33), a diferencia de otras líneas celulares como las Hela y Vero donde es promovida por la internalina B (34). El 22,2% de las cepas evaluadas presentaron un porcentaje de invasión superior a la cepa control, poniendo de manifiesto que los alimentos pueden ser transmisores de cepas con capacidad de invasión y por ende potencialmente patogénicas.

Con los datos anteriores, se demuestra la presencia de *L. monocytogenes* potencialmente patógena en derivados lácteos de origen costarricense por lo que es importante hacer un llamado a las autoridades en salud con el fin de monitorear la presencia de esta bacteria en alimentos listos para su consumo, y promover técnicas de procesamiento que ofrezcan alimentos más seguros para los consumidores, con el fin de disminuir la morbilidad y mortalidad asociada a esta bacteria.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la valiosa colaboración de las doctoras Mariela Rojas, Carolina Arguedas y Gabriela Carrillo. Este proyecto recibió financiamiento de la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica, proyecto 803 A6 037.

## REFERENCIAS

1. Ashuchat A, Swaminathan B & Broome C. Epidemiology of human listeriosis. Clin Microb Rev. 2001. 4: 169-183.
2. Dongyou L. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important food-borne pathogen. J Med Microb. 2006. 55: 645-659.
3. FAO/OMS. Consulta Mixta de expertos sobre la evaluación de riesgos asociados a los peligros microbiológicos en alimentos. Italia. 2000.
4. Shen Y, Liu Y, Zhang Y, Cripe J, Conway W, Meng J, Hall G & Bhagwat A. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from ready to eat foods in Florida. Appl Environ Microbiol. 2006. 72: 5073-5074
5. Slutsker, I & Schuchat A. Listeriosis in humans. In ET riser and EH Marth (ed). *Listeria, listeriosis and food safety*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker Inc, New York, 1999.
6. Pinner R, Schuchat A, Swaminathan B, Hayes P, Deaver K, Weaver R, Plikaytis B, Reeves M, Broome C & Wenger J. Role of foods in sporadic listeriosis. JAMA. 1992. 267: 2046-2050.
7. Rocourt J. *Listeria* et listériose humaine. Ann Inst Pasteur. 1990. 1: 25.30.
8. Farber J & Peterkin P. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev. 1991. 55: 476-511.
9. Wiedman M, Bruce J, Keating C, Johnson A, McDonough P & Batt C. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with dif-

- ferences in pathogenic potential. *Infect Immun.* 2006. 65: 2707-2716.
10. Nexmann C, Norrung B, Molggaard H & Jakobsen M. In vitro and in vivo invasiveness of different pulsed-field gel electrophoresis types of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68: 5698-5703.
  11. Gandhi M & Chikindas M. *Listeria*: a food borne pathogen that knows how to survive. *Int J Microbiol.* 2007. 113: 1-15.
  12. Gombas D, Chen Y, Clavero R & Scott V. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. *J Food Prot.* 2003. 66: 559-569
  13. Saunders B, Mangione K, Vincent J, Schermerhorn J, Farchione C, Dumas N, Bopp C, Kornstein L, Fortes E, Windham K & Wiedmann M. Distribution of *Listeria monocytogenes* molecular subtypes among human and food isolates from New York State shows persistence of human disease associated *Listeria monocytogenes* strains in retail environments. *J Food Prot.* 2004. 67: 1417-1428.
  14. Dalton C, Austin C, Sobel J, Hayes P, Bibb W, Graves L, Swaminathan B, Proctor M & Griffin P. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Eng J Med.* 1997. 336: 100-105.
  15. Harvey J & Gilmour A. Characterization of recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk and non-dairy foods by pulsed-field gel electrophoresis, monocin typing, plasmid profiling and cadmium and antibiotic resistance determination. *Appl Environ Microb.* 2001. 62: 840-847.
  16. Waak E, Tham & Danielsson M. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Appl Environ Microbiol.* 2002. 68: 3366-3370.
  17. Oreamuno S. Presencia de *Listeria monocytogenes* y su relación con el nivel de coliformes fecales durante la manufactura de queso blanco en plantas de la zona de Santa Cruz, Turrialba. Tesis. Licenciatura en Tecnología de Alimentos 2001. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.
  18. FDA. Bacteriological and Analytical Manual. AOAC. 18<sup>th</sup>. Ed. New York. 1995.
  19. National Committee of Clinical Laboratory Standard. 1997. Performance Standard for antimicrobial disk susceptibility test. 6<sup>th</sup> ed. Approved Standard Documents M2; National Committee of Clinical Laboratory Standard, USA.
  20. Yamada F, Ueda F, Ochiai Y, Hiroshi M, Ogawa K, Sata T, Mochizuki K, Fujima A & Ogasawara R. Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and CACO-2 cells. *J Microbiol Methods.* 2006. 66: 96-103.
  21. Vazquez-Boland P, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehland J & Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol rev.* 2001. 14: 584-640
  22. Ellner R & Marth E. Aislamiento de *Listeria* sp. de diversos alimentos en Costa Rica. *Rev Cost Cienc Med.* 1991. 12: 82-86.
  23. Arias ML & Antillón F. Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica: una revisión de 10 años. *Rev Biomed.* 2000. 11: 113-122.
  24. Arpin C, Carlier C, Courvalin P & Quentin C. Analysis of an antibiotic resistance plasmid from a clinical isolate of *Listeria monocytogenes*. 1992. 12 th Réunion Interdisc Chimiothér. Anti-Infect, Paris, France.
  25. Charpentier E, Gerbaud G, Jacquet C, Rocourt J & Courvalin P. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* spp. *J Infect Dis.* 1995. 172: 277-281.
  26. Poyart-Salmeron C, Carlier C, Trieu-Cout P, Courtieu A & Courvalin P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet.* 1990. 335: 1422-1426.
  27. Charpentier E, Gerbaud G, Jacquet C, Rocourt J & Courvalin P. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* spp. *J Infect Dis.* 1995. 172: 277-281.
  28. McLaughlin J, Audurier A & Taylor A. Treatment failure and recurrent human listeriosis. *J Antimicrob Chemother.* 1991. 27: 851-857.
  29. Hof H & Rocourt J. Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in food a health risk? *Int J Food Microbiol.* 1992. 16: 173-182.
  30. Shlech W, Chase D & Badley A. A model of food-borne *Listeria monocytogenes* infection in the Sprague-Dawley rat using gastric inoculation—development and effect of gastric acidity on infective dose. *Int J Food Microbiol* 1993. 18: 15-24.
  31. López V, Suárez M, Calero C, Navas J & Martínez Suarez J. *Listeria monocytogenes* en alimentos: son todos los aislamientos igual de virulentos? *Rev Arg Microb.* 2006. 38: 224-234.
  32. Vázquez Boland J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez Bernal G, Goebel W, González Zorn B, Wehland J and Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microb Rev.* 2001. 14: 584-640.
  33. Gaillard J, Berche L, Frehel C, Gouin E & Cossart P. Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram positive cocci. *Cell.* 1991. 65: 1127-1141.
  34. Cossart P, Pizarro-Cerdá J & Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.* 2003. 13: 23-31.

Recibido: 08-10-2008

Aceptado: 27-02-2009

## Desarrollo y transferencia tecnológica de pastas funcionales extendidas con leguminosas

Marisela Granito, Vanesa Ascanio

Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela

**RESUMEN.** La pasta de sémola es un alimento altamente consumido, cuyo valor biológico es bajo porque su proteína es deficiente en lisina. Sin embargo, si se extiende la sémola con leguminosas ricas en este aminoácido esencial, no sólo se produce una complementación aminoacídica, sino que se incrementa el contenido de fibra dietética y de minerales. En este trabajo se produjeron a escala de planta piloto y se analizaron, pastas extendidas con 10% de *Phaseolus vulgaris* y *Cajanus cajan*. Se evaluó la calidad de cocción y las características físicas, químicas y nutricionales de las pastas, así como la aceptabilidad sensorial con ancianos institucionalizados. Posteriormente, se transfirió esta tecnología a una cooperativa productora de pastas artesanales. La extensión de las pastas con harina de leguminosas incrementó el tiempo óptimo de cocción de 15 a 20%, el peso entre 20% y 25% y las pérdidas de sólidos por cocción. El valor funcional de las pastas aumentó al incrementarse el contenido de minerales y de fibra dietética total. La proteína, así como la digestibilidad proteica *in vitro* también se incrementó, no obstante, disminuyeron los parámetros de color L, a y b y el contenido de almidón total. A nivel de consumidores las pastas extendidas tuvieron una buena aceptabilidad, por lo que se concluyó que es tecnológicamente factible la extensión de la sémola con harinas de leguminosas en la elaboración de pastas.

**Palabras clave:** Semolina, pastas funcionales, leguminosas, transferencia de tecnología.

**SUMMARY. Development and technological transfer of functional pastas extended with legumes.** Semolina pasta is a highly consumed foodstuff, the biological value of which is low because its protein is deficient in lysine. However, if the semolina is extended with legumes rich in this essential aminoacid, not only aminoacid supplementation is produced, but also the dietary fibre and minerals are increased. In this work, pastas extended in 10% with a white variety of *Phaseolus vulgaris* and with *Cajanus cajan* were produced on a pilot plant scale, and this technology was transferred to a cooperative producing artisanal pastas. The cooking qualities and the physical, chemical, and nutritional characteristics of the pastas were evaluated, as well as the sensorial acceptability in institutionalized elderly people. The extension of the pastas with legume flours increased the optimum cooking time (15 to 20%), the weight (20% and 25%), and the loss of solids by cooking. Similarly, the functional value of the pastas increased by increasing the contents of minerals and dietary fibre. The protein content, as well as the protein digestibility *in vitro* also increased; however, the parameters of colour L, a and b, and the total starch content of the pastas decreased. At consumer level, the pastas extended with legumes had a good acceptability, for what it was concluded that the extension of the semolina with legume flours in the manufacture of pastas is technologically feasible.

**Key words:** Semolina, functional pastas, legumes, technological transfer.

### INTRODUCCION

La pasta es un alimento con alta aceptabilidad a nivel mundial debido a que forma parte de los hábitos alimenticios de muchas poblaciones y es relativamente económico, versátil, de fácil preparación y almacenamiento (1).

En Venezuela, la pasta forma parte de los alimentos básicos de la población, sirviéndose como plato principal de las más diversas maneras, de dos a tres veces por semana. La oferta de pasta en el mercado venezolano es amplia, siendo su disponibilidad para el año 2002 de 20,1g/persona/día, lo que representaba el 30% de la oferta de los alimentos elaborados en base a trigo (2). En la actualidad, el consumo de pasta en Venezuela es de aproximadamente 13 kg/persona, con lo cual se ubica al país como el segundo consumidor de pasta a nivel mundial, después de Italia (3).

Desde un punto de vista nutricional la pasta de sémola es reconocida como una fuente de carbohidratos complejos, con poca grasa y de baja calidad proteica, debido a que la sémola, su principal constituyente, es pobre en lisina (4).

En países en vías de desarrollo como Venezuela, donde los problemas nutricionales afectan a una proporción considerable de sus habitantes, el mejoramiento nutricional de alimentos altamente consumidos por la población como la pasta, puede representar una alternativa que tienda a mejorar la calidad nutricional y funcional de la dieta.

La extensión de pastas con leguminosas, contribuye a elevar su valor nutricional al producirse una complementación aminoacídica e incrementarse el contenido de minerales y fibra dietética. Adicionalmente, la extensión de pastas con leguminosas como *Phaseolus vulgaris* y *Cajanus cajan*, rubros que se producen en el país y que forman parte de los

hábitos alimenticios de la población venezolana, es una alternativa para disminuir la dependencia de materias primas importadas como el trigo y la soya (2- 7).

La producción de pastas de sémola extendidas con leguminosas podría además contribuir con la diversificación de la oferta de pastas producidas en el país. Si adicionalmente, la producción de este nuevo producto es realizado por una pequeña industria o cooperativa, se estará contribuyendo con el fortalecimiento de pequeñas economías familiares regionales y en última instancia con el logro de la soberanía alimentaria. Por ello, y para poder lograr el objetivo de este trabajo se ubicó una cooperativa consolidada desde hace más de 15 años en la producción de pastas alimenticias y se procedió a la transferencia de la tecnología, entendiéndose por transferencia tecnológica la transmisión de conocimientos sistemáticos para la fabricación de un producto, para la aplicación de un procedimiento o para la prestación de servicios (8).

La transferencia de la tecnología para producir pastas extendidas con leguminosas a la cooperativa, representa la posibilidad de aumentar la diversidad de sus productos alimenticios y la mejora nutricional de las pastas tradicionalmente elaboradas por la cooperativa, las cuales son de amplio consumo en la comunidad. También le permitirá a la Cooperativa ampliar su oferta de productos, a través de la implementación de nuevos procesos sencillos, accesibles y de bajo costo como los propuestos para la obtención de las harinas de leguminosas.

El objetivo de este trabajo fue producir a escala de planta piloto pastas largas de sémola, extendidas con harinas cocidas de *Phaseolus vulgaris* y *Cajanus cajan* L., caracterizarlas física, química, nutricional y sensorialmente a nivel de consumidores, para finalmente transferir esta tecnología a una cooperativa productora de pastas ubicada en el Estado Lara, Venezuela.

## MATERIALES Y METODOS

**Materia prima:** Se usó una variedad blanca de *Phaseolus vulgaris* y una oscura de *Cajanus cajan* L, las cuales fueron adquiridas en el mercado local. La sémola de trigo *durum*, el afrecho en hojuelas y la harina de trigo fueron suministradas por la Unidad de Producción Asociación Civil 8 de Marzo.

Previo a la preparación de las pastas, se dictó un taller didáctico a las integrantes de la Cooperativa cuyo contenido versó sobre la importancia de la pasta como alimento y fuente de nutrientes en la dieta del venezolano. Asimismo, se les explicó cómo la extensión con harinas de leguminosas puede incrementar el contenido nutricional de las pastas y cómo preparar e incorporar las harinas de leguminosas al producto final.

**Harinas de leguminosas:** Para preparar las harinas de leguminosas se remojaron los granos en agua en una proporción 1:4 (leguminosa: agua) por 12 horas a 25°C, se drenaron y se cocinaron a presión atmosférica por 2h en una proporción grano: agua 1:12. Posteriormente, se secaron en un equipo (Zagui Luciano impianti elettrici-automazioni modelo 0zQESSU2G) con convección de aire a temperatura de 40°C durante 48h, se molieron y tamizaron hasta obtener una harina con una granulometría de 10 mesh, similar a la de la sémola utilizada.

**Elaboración de las pastas:** Las pastas fueron elaboradas en la Unidad de Producción Asociación Civil 8 de Marzo, ubicada en Palo Verde, Sanare, Estado Lara, con base en la fórmula utilizada por la Unidad de Producción para la fabricación de sus pastas, la cual incluye afrecho como ingrediente. El afrecho es adicionado por la Unidad de Producción a todas las pastas que producen y comercializan, como una respuesta social a la necesidad de mejorar la alimentación de la población de Sanare, poniendo así a la disposición de los consumidores un alimento funcional, con un mayor contenido de fibra.

Se prepararon 3 tipos de pasta: una control (PC) producida y comercializada habitualmente en la comunidad de Sanare y dos pastas extendidas con 10% de harina de leguminosa; una con harina de *P. vulgaris* cocida (PPC) y otra con harina de *C. cajan* cocido (PCC), cuyas fórmulas se detallan en la Tabla 1.

TABLA 1  
Ingredientes y formulación de las pastas

Ingredientes (%)	PC	PPC	PCC
Sémola <i>durum</i>	90	80	80
Harina integral de trigo	4	4	4
Afrecho en hojuelas	6	6	6
Harina de leguminosa	0	10*	10**

\* Harina de *Phaseolus vulgaris* cocida, \*\* Harina de *Cajanus cajan* cocida. PC: pasta control; PPC: pasta con harina de *Phaseolus vulgaris*; PCC: pasta con *Cajanus cajan*.

Las pastas se elaboraron utilizando un equipo mezclador extrusor Pargiana 43036 Fidenza (PR) Modelo 080 Tipo N, en el que se mezclaron los ingredientes sólidos con 30% de agua a 30°C, utilizando una temperatura en el barril de extrusión de 45°C y una boquilla que daba la forma de cinta de 1cm de ancho a la salida del extrusor. El corte longitudinal de las cintas fue realizado manualmente con un cuchillo, formando pastas de aproximadamente 40 cm de largo. Una vez cortadas las pastas fueron colgadas en carros de acero inoxidable y secadas durante 24 horas en un equipo (Zagui Luciano impianti elettrici-automazioni modelo 0zQESSU2G)

con convección de aire a temperatura de 45°C y 65%HR.

**Calidad de cocción y color de las pastas:** Se midió el tiempo óptimo de cocción, el incremento de peso por cocción y la pérdida de sólidos por cocción, según los métodos 50-66 del AACC (9). El color instrumental se cuantificó a través de los parámetros L, a, b, utilizando un colorímetro triestímulo Hunter Lab.

**Composición química y valor nutricional de las pastas:** Las pastas fueron cocidas por 16 min, escurridas y secadas en una estufa con convección de aire a 40°C durante 48h. Posteriormente se molieron hasta un tamaño de partícula de 80 mesh. Las harinas provenientes de las tres pastas fueron analizadas en sus contenidos de humedad (método 925.10), cenizas (método 923.03), grasas (método 920.39) y proteínas (método 960.52) de la AOAC (10). El contenido de carbohidratos totales fue calculado por diferencia, substrayendo el porcentaje de humedad, proteínas, grasas y cenizas a 100. La fibra dietética total, insoluble y soluble fueron cuantificadas a través del método enzimático gravimétrico propuesto por Prosky et al. (11) y el almidón total y disponible utilizando el método enzimático colorimétrico de Holm et al. (12). Como parámetros nutricionales se midieron los minerales hierro (Fe), calcio (Ca), magnesio (Mg), fósforo (P), zinc (Zn), sodio (Na) y potasio (K) aplicando la técnica de espectroscopia de emisión atómica utilizando un equipo de Plasma Inducido Acoplado (ICP), la digestibilidad *in vitro*, usando el método de Hsu et al (13) y la lisina disponible mediante el método de Kakade y Liener (14). La calidad proteica de cada pasta se cuantificó mediante el cómputo aminoacídico, utilizando como proteína patrón la sugerida por la FAO/WHO/UNU (2002) y corrigiendo con la digestibilidad proteica medida *in vitro*.

**Evaluación sensorial:** Las pastas desarrolladas fueron sensorialmente evaluadas por 50 potenciales consumidores, adultos mayores, sanos, pertenecientes al club del Instituto Nacional de Geriátrica y Gerontología (INAGER), Unidad Geriátrica Dr. Joaquín Quintero, ubicado en Caricuao, Caracas. En esta institución se sirve pasta como plato principal una vez a la semana. Ese día se sirvió a cada panelista una ración de 125g de cada pasta a evaluar acompañada por el resto del menú: sopa, carne, y plátano, ensalada y jugo. Cada pasta se evaluó dos veces, con dos aderezos diferentes: en un caso se sirvió con una salsa de tomate y en el otro con mantequilla y perejil. En total se evaluaron 6 almuerzos, cada uno en una semana diferente.

**Cálculo del aporte nutricional de las pastas:** El valor calórico de las pastas se estimó considerando la composición porcentual de cada uno de ellos y un aporte de 4 kcal/g para carbohidratos y proteínas y 9 kcal/g para las grasas. Se utilizaron los requerimientos de ingesta diaria (RID)

recomendados por el Instituto Nacional de Nutrición (15,16) para la población Venezolana como referencia para indicar el porcentaje que aportan de cada uno de los nutrientes por porción de 125g de pasta. La información nutricional obtenida se utilizó para proponer un etiquetado nutricional para las pastas, con base en los requisitos establecidos en la Norma COVENIN 2952 y la 2952 (17).

**Análisis estadístico:** Todos los resultados, excepto los de la evaluación sensorial, fueron expresados como el promedio de 3 determinaciones  $\pm$  desviación estándar. La comparación de medias se realizó mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con posterior comparación de medias (test de Duncan) usando el programa Excel de Windows. El nivel de probabilidad empleado para todos los análisis estadísticos fue de  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

En la Tabla 2 se presentan los resultados de las pruebas de cocción y del color medido a las pastas. Al comparar las pastas extendidas con leguminosas (PPC y PCC) con la pasta control (PC) se encontró un incremento significativo ( $p \leq 0,05$ ) en el tiempo de cocción de PPC y PCC. Los 14,2 min. cuantificados para PC se incrementaron a 16,3 min. y 17 min. para PPC y PCC, respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre las 2 pastas extendidas. De igual manera, los incrementos de peso por cocción aumentaron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) en 23% y 25% para PPC y PCC, no variando estas significativamente entre sí. Respecto a las pérdidas de sólidos por cocción, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ), entre PC y PPC, sin embargo, PCC presentó un 20% de pérdidas de sólidos.

TABLA 2  
Calidad de cocción y color de las pastas

	PC	PPC	PCC
Tiempo óptimo de cocción (min.)	14,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	16,3 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	17 $\pm$ 0 <sup>b</sup>
Aumento de peso (%)	120,1 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	151,9 $\pm$ 15,9 <sup>b</sup>	147,2 $\pm$ 4,6 <sup>b</sup>
Pérdida de sólidos por cocción (%)	9,8 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	10,8 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	20,1 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>
Color			
L	59,1 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	54,1 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	48,2 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>
a	4,9 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	5,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	3,1 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>
b	9,6 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	9,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	3,8 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>

PC: pasta control; PPC: pasta con harina de *Phaeolus vulgaris*; PCC: pasta con *Cajanus cajan*. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas  $p \leq 0,05$ . Todos los resultados se presentan en base seca.

El color también se vio afectado por la sustitución de la sémola por harinas de leguminosas, observándose una disminución en el índice de blancura (L) de 8,5% y de 18,4% para PPC y PCC. El color rojo, evidenciado a través de resultados de (a) positivos, no varió significativamente ( $p \leq 0,05$ ) entre PC y PPC, pero si disminuyó en 36% para PCC, respecto a PC. Por otra parte el amarillo, representado por un valor de (b) positivo disminuyó con la sustitución en 3% y 60% para PPC y PCC, respectivamente, lo que implica que las pastas extendidas fueron menos amarillas que las de sémola.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la caracterización química de las pastas control y extendidas. El contenido de proteína se incrementó significativamente ( $p \leq 0,05$ ) de 3,2% cuantificado para PC a 3,7% para PPC y 3,7% para PCC, no encontrándose diferencias significativas entre las 2 pastas extendidas. Respecto al contenido de grasa de las pastas evaluadas este fue inferior al 1%, no encontrándose diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre la pasta control y las extendidas con leguminosas.

TABLA 3  
Composición química de las pastas, g/100g

Composición	PC	PPC	PCC
Humedad	8,6 + 0 <sup>a</sup>	8,0 + 0,3 <sup>b</sup>	6,2 + 0,1 <sup>c</sup>
Proteína	3,2 + 0,2 <sup>a</sup>	3,7 + 0,2 <sup>b</sup>	3,7 + 0,1 <sup>b</sup>
Grasa	0,7 + 0,2 <sup>a</sup>	0,8 + 0,5 <sup>a</sup>	0,6 + 2,4 <sup>a</sup>
Ceniza	0,8 + 0,1 <sup>a</sup>	1,1 + 0 <sup>b</sup>	1,2 + 0 <sup>b</sup>
Carbohidratos totales *	86,7	86,3	88,1
Fibra dietética total	4,1 + 0,2 <sup>a</sup>	7,5 + 0,2 <sup>b</sup>	6,9 + 0,4 <sup>b</sup>
Fibra dietética insoluble	3,6 + 0,2 <sup>a</sup>	6,5 + 0,2 <sup>b</sup>	5,9 + 0,4 <sup>b</sup>
Fibra dietética soluble	0,5 + 0,2 <sup>a</sup>	1,02 + 0,2 <sup>ab</sup>	1,0 + 0,4 <sup>b</sup>
Almidón total	74,3 + 1,1 <sup>a</sup>	71,9 + 0,4 <sup>a</sup>	72,9 + 1,8 <sup>a</sup>
Almidón disponible	61,3 + 2,4 <sup>a</sup>	59,1 + 1,2 <sup>a</sup>	60,3 + 2,9 <sup>a</sup>

\* Calculados por diferencia. PC: pasta control; PPC: pasta con harina de *Phaseolus vulgaris*; PCC: pasta con *Cajanus cajan*. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas  $p \leq 0,05$

El contenido de cenizas de PC fue significativamente inferior ( $p \leq 0,05$ ) al de las pastas extendidas con leguminosas, las cuales no variaron entre sí. Se cuantificaron valores de 1,2% para PPC y 1,3% para PCC, lo que representa un incremento de 40% en el contenido de ceniza con respecto a PC, incremento que se atribuye a la presencia de las harinas de las leguminosas. Al calcular por diferencia el contenido de carbohidratos totales se obtuvieron valores de 86,7%, 86,4% y 82,3% para PC, PPC y PCC, respectivamente.

Respecto a la fibra dietética cuantificada, en la Tabla 3 se presentan los resultados correspondientes a la fibra total, insoluble y soluble, observándose diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre PC y las pastas extendidas con leguminosas.

En estas últimas se cuantificaron contenidos de fibra dietética total entre un 71% y un 86% superiores a los de PC, representando la fibra insoluble en todas las pastas entre un 85% y un 88% de la fibra total, mientras la fibra soluble representó entre un 12% y un 15% de la fibra dietética total. En relación a los contenidos de almidón total, disponible y resistente, no se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre las pastas extendidas con leguminosas y PC.

El contenido de minerales y demás parámetros nutricionales se presentan en la Tabla 4. Las pastas extendidas con leguminosas presentaron un incremento significativo ( $p \leq 0,05$ ) de 14%, 16% y 70% en el contenido de magnesio, fósforo y potasio, respectivamente y una disminución ( $p \leq 0,05$ ) en la concentración de sodio respecto a PC. El hierro y el calcio no variaron significativamente ( $p \leq 0,05$ ).

TABLA 4  
Calidad proteica y contenido de minerales

Composición	PC	PPC	PCC
Digestibilidad proteica			
in vitro (%)	75,9 + 2,1 <sup>a</sup>	76,2 + 0,5 <sup>a</sup>	79,8 + 0,5 <sup>b</sup>
Lisina disponible**	2,2 + 0 <sup>a</sup>	2,2 + 0 <sup>a</sup>	2,3 + 0 <sup>a</sup>
Hierro*	4,6 + 0,5 <sup>a</sup>	4,9 + 0,4 <sup>a</sup>	4,7 + 0,1 <sup>a</sup>
Calcio*	35,6 + 0,4 <sup>a</sup>	39,5 + 2,6 <sup>a</sup>	37,5 + 0,3 <sup>a</sup>
Magnesio*	60,6 + 0,3 <sup>a</sup>	69,1 + 1,4 <sup>b</sup>	69,8 + 1,1 <sup>b</sup>
Fósforo*	159,0 + 0,3 <sup>a</sup>	183,9 + 2,2 <sup>b</sup>	184,1 + 0,5 <sup>b</sup>
Zinc*	9,0 + 0,2 <sup>a</sup>	11,1 + 0,1 <sup>b</sup>	7,01 + 0,1 <sup>a</sup>
Potasio*	108,0 + 1,5 <sup>a</sup>	181,5 + 6,8 <sup>b</sup>	191,2 + 0,9 <sup>b</sup>
Sodio*	16,4 + 7,6 <sup>a</sup>	8,7 + 2,4 <sup>a</sup>	7,1 + 7,0 <sup>a</sup>
CA	22,7	26,6	26,7
CACDP	17,3	20,2	21,3
Aminoácido limitante	Lisina	Lisina	Lisina

\*(mg/100g), \*\* (g/100g proteína), PC: pasta control; PPC: pasta con harina de *Phaseolus vulgaris*; PCC: pasta con *Cajanus cajan*. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas  $p \leq 0,05$ , CA: cómputo aminoacídico, CACDP: cómputo aminoacídico corregido con la digestibilidad proteica.

Respecto a la digestibilidad proteica *in vitro*, solo se encontraron diferencias significativas para la pasta extendida con quinchoncho, la cual fue 5% superior respecto a la de PC, no encontrándose diferencias significativas en los contenidos de lisina disponible. Finalmente al calcular el cómputo aminoacídico se encontraron valores de 28,4; 36,4 y 35,9 para PC, PCC y PPC, respectivamente.

En general la aceptabilidad sensorial de las pastas osciló entre 5,4 y 6,8 en una escala de 7 puntos. Para un mismo tipo de pasta los panelistas indicaron una mayor aceptabilidad para la pasta servida con salsa de tomate, sobre la servida con mantequilla y perejil, sin embargo, esta diferencia solo fue significativa ( $p \leq 0,05$ ) para PCC. Numéricamente la pasta mas

aceptada fue la extendida con harinas de *Cajanus cajan*, seguida por la extendida con harinas de *Phaseolus vulgaris*.

En relación al aporte calórico de cada ración de 100g de pasta, éste representa el 20% de los requerimientos diarios de energía para la población venezolana, basado en una dieta de 2000 kcal/persona/día.

## DISCUSION

Cuando se sustituye parcialmente la sémola en la elaboración de pastas, se espera que parámetros de calidad como el tiempo óptimo de cocción y el incremento de peso se vean alterados. Particularmente, el tiempo de cocción es especialmente importante porque influye sobre la textura y sabor de las pastas. Así, si las pastas se cocinan menos de lo indicado, la textura será dura y resaltará el sabor a harina; si por el contrario las pastas están sobre-cocidas, se tornan blanquecinas, se rompen fácilmente en pequeños trozos y presentan una textura suave, elástica y pegajosa, lo cual es considerado por los consumidores como una sensación desagradable en la boca (18-21).

Los tiempos óptimos de cocción de las pastas extendidas con harinas de leguminosas cocidas PCC y PQC fueron superiores en 15% y 20%, respecto al tiempo de cocción cuantificado para PC, el cual también resultó alto, si se compara con los 10 minutos reportados en promedio para pastas de sémola (22-24). Así mismo, la extensión con harina de leguminosas generó un aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) en el peso de estas pastas después de cocidas, similar al reportado por otros autores (6,7).

Para poder justificar los resultados encontrados hay que considerar que todas las pastas elaboradas en la Cooperativa 8 de marzo contienen como parte de los ingredientes harina integral de trigo y afrecho, ambos considerados buenas fuentes de fibra dietética insoluble, la cual presenta una alta capacidad para absorber agua. Si, adicionalmente se incluyen harinas de leguminosas como ingrediente, se están incrementando los componentes que compiten por el agua con el almidón y la proteína presentes en la sémola, dificultando así la gelatinización del almidón y la formación de la matriz de gluten en las pastas extendidas. Sin embargo, en este tipo de pastas una vez que se absorbe el agua, se gelatinizan los almidones y se forman geles proteicos, lo cual origina el incremento en volumen y en peso (23). Por otra parte, las pastas desarrolladas fueron extendidas con porcentajes bajos de harina de leguminosa (10%), lo cual, aunado a la baja temperatura de extrusión (45°C) y a la baja temperatura de secado (45°C) favoreció la absorción de agua, sin afectar la estructura proteica del gluten. De acuerdo a Ferreira et al. (23) altos tiempos de cocción, como los determinados para estas pastas, favorecen aún más la absorción de agua y el consiguiente aumento de peso.

En relación a las pérdidas de sólidos por cocción, se ha reportado que la extensión de pastas con ingredientes dife-

rentes a la sémola genera un aumento en la pérdida de sólidos por cocción proporcional al porcentaje de sustitución, debido a la disrupción en la matriz proteica del gluten (24-27). Sin embargo, estas pérdidas suelen estar alrededor del 10%, incluso cuando se ha sustituido en un 40% la harina de trigo por otros ingredientes como harinas de leguminosas, cereales, tubérculos, huevo entero, concentrados y aislados proteicos o mezclas de ellos (7,22,24, 26). Cuando los extensores utilizados son harinas de leguminosas previamente cocidas, se han reportado pérdidas de sólidos de hasta 16,5%, las cuales fueron atribuidas al aumento de solubilidad de los almidones debido a la pre-gelatinización (7). Asimismo, se ha reportado que el uso de bajas temperaturas para el secado de las pastas incrementa las pérdidas de sólidos por cocción (26). La combinación de estos dos factores estuvo presente en las pastas desarrolladas, de allí la respuesta observada.

En relación a la composición química de las pastas desarrolladas, todos los componentes químicos de las pastas se incrementaron al sustituir parcialmente la sémola por las harinas de leguminosas. El incremento observado se debe al aporte en proteínas, cenizas y fibra dietética, tanto insoluble como soluble, de las harinas de leguminosas. Resultados similares han sido reportados por varios autores, quienes señalan que al aumentar el porcentaje de extensión de las pastas con leguminosas, aumenta el contenido nutritivo de las pastas (6-8,23,27). Particularmente, en lo referente al contenido de polisacáridos, los resultados encontrados además de coincidir con los reportados por otros autores (7,27) ponen en evidencia las características funcionales de las pastas desarrolladas, si se considera el efecto benéfico para la salud de la fibra presente, tanto insoluble como soluble.

La disminución de un 58% en el contenido de sodio y el incremento en el potasio potencia el uso de las pastas extendidas con leguminosas para personas con problemas de hipertensión y retención de líquidos (28). De igual manera, los incrementos en el magnesio y el fósforo contribuyen al valor nutricional y funcional de las pastas desarrolladas.

La digestibilidad proteica *in vitro* fue similar para PC y PPC, observándose solo un 5% de incremento no significativo para PCC. Este podría ser atribuido al menor contenido de almidón resistente de esta pasta, el cual debe originar una menor interferencia en la digestión y por tanto, mayor digestibilidad. De igual manera, al calcular el cómputo aminoacídico se evidenció un pequeño incremento en las pastas extendidas, aunque el aminoácido limitante siguió siendo la lisina. Esto podría deberse a que la proporción de cereal y leguminosa utilizada no fue la adecuada para obtener una buena complementación de aminoácidos. De acuerdo a Bressani et al (29) la mezcla que origina la mejor complementación aminoacídica es la de 70% de cereal y 30% de leguminosa, sin embargo, tecnológicamente esta mezcla no es factible de ser usada para la producción de pastas, sin

afectar negativamente su calidad. En la producción de pastas, niveles de sustitución de la sémola superior a un 10% o 15% originan una disminución en la cantidad de gluten y por ende en la matriz proteica, que posteriormente se refleja en la calidad de cocción de las pastas. En virtud de lo anterior, se podría considerar que las pastas desarrolladas si bien no presentan un balance de aminoácidos ideal, representan buenas fuentes de compuestos funcionales como la fibra dietética y los almidones resistentes.

Una vez evaluada la calidad nutricional se procedió a medir la aceptabilidad, porque de acuerdo a Wittig (30) antes de lanzar un nuevo producto al mercado es conveniente realizar pruebas de aceptabilidad, para así conocer la posible reacción del público consumidor y detectar y corregir a tiempo las deficiencias del producto. Las pastas elaboradas están dirigidas a adultos mayores, población vulnerable que representa el 6,7% de la población venezolana, según el censo del año 2001.

Las pastas desarrolladas fueron bien aceptadas por los panelistas, siendo mayor la aceptabilidad cuando se sirvieron con salsa de tomate. Esto podría deberse a que la salsa de tomate está más asociada a los hábitos alimenticios de la población y enmascara más los olores de las pastas extendidas con harina de leguminosas (20). No obstante, al comparar la aceptabilidad de los tres tipos de pastas servidas con mantequilla y perejil (Tabla 5), la más aceptada fue la extendida con harina de *Cajanus cajan* cocida. Estos resultados son contrarios a lo reportado en la literatura, donde se indica que al extender pastas con harina de leguminosas disminuye la aceptabilidad, haciéndose significativamente mayor esta disminución al incrementar el porcentaje de sustitución (6-8,22).

TABLA 5  
Aceptabilidad sensorial por consumidores

Tipo de pasta	Tipo de Salsa	
	Mantequilla y perejil	Salsa de tomate
PC	5,4 ± 2,3 <sup> a,b</sup>	6,4 ± 1,5 <sup> a,b</sup>
PPC	5,8 ± 1,8 <sup> a,b</sup>	6,0 ± 1,5 <sup> a,b</sup>
PCC	6,2 ± 1,5 <sup> a</sup>	6,8 ± 0,7 <sup> b</sup>

PC: pasta control; PPC: pasta con harina de *Phaseolus vulgaris*; PCC: pasta con *Cajanus cajan*. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias significativas  $p \leq 0,05$ .

Como parte de la transferencia de la tecnología a la Cooperativa, se generó el etiquetado nutricional de las pastas desarrolladas, para que fuese incorporado al empaque del producto. En la Tabla 6 se evidencia que, independientemente de la salsa con la que se sirva, una porción de 125g de las pastas extendidas cocidas aportan el 25% de los requerimientos diarios de energía para la población venezolana, basado en una dieta de 2000 kcal/persona/día. Asimismo, aportan el 45% de

la fibra dietética recomendada diariamente. Para las tres pastas el aporte de proteínas y carbohidratos de una ración representan respectivamente el 6% y 35% del RID para estos nutrientes. Respecto al aporte de grasa es bajo, menor a 3g por ración de 125g.

TABLA 6  
Etiquetado nutricional de las pastas cocidas

Información nutricional			
Pasta alimenticia con caraota ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) cocida			
*Excelente fuente de fibra dietética, baja en grasa			
Tamaño de porción: 125g	Porciones por empaque: 8		
Nutriente	Unidades	Cantidad/Porción	%RID
Valor energético	kcal	460	25
Grasa total	g	1	0
Proteínas	g	5	6
Carbohidratos totales	g	108	35
Fibra dietética total	g	9	45
Hierro	mg	6	50
Calcio	mg	49	5
Magnesio	mg	86	29
Fósforo	mg	230	34
Zinc	mg	14	107
Potasio	mg	227	-
Sodio	mg	11	-

Los porcentajes de requerimientos diarios (%RID) están basados en una dieta de 2000 kcal/persona/día. Valores de referencia de energía y nutrientes para la población venezolana (MSDS, 2000; INN, 1999).

Información nutricional  
Pasta alimenticia con quinchoncho (*Cajanus cajan*) cocida

*Excelente fuente de fibra dietética, baja en grasa.			
Tamaño de porción: 125g	Porciones por empaque: 8		
Nutriente	Unidades	Cantidad/Porción	%RID
Valor energético	kcal	470	25
Grasa total	g	1	0
Proteínas	g	4	6
Carbohidratos totales	g	110	35
Fibra dietética total	g	8	45
Hierro	mg	6	49
Calcio	mg	47	5
Magnesio	mg	87	30
Fósforo	mg	230	34
Zinc	mg	9	67
Potasio	mg	240	-
Sodio	mg	9	-

Los porcentajes de requerimientos diarios (%RID) están basados en una dieta de 2000 kcal/persona/día. Valores de referencia de energía y nutrientes para la población venezolana (MSDS, 2000; INN, 1999).

## CONCLUSIONES

La extensión de pastas con 10% de harinas de leguminosas originó un producto con un mayor contenido de fibra dietética, fósforo y potasio, aceptado por el consumidor y cuya elaboración puede ser transferida a una cooperativa o pequeña empresa para su producción.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las integrantes de la Cooperativa 8 de marzo por la gran colaboración prestada y por la donación de la sémola para el desarrollo de las pastas. Asimismo, agradecemos a la Ing. Maria Elena Morros, del Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (INIA, Lara) por los esfuerzos realizados para contactar a la Cooperativa y coordinar el trabajo allí realizado.

## REFERENCIAS

- Sabanis D, Dokastakis G. New formulations for the production of pasta (lasagna) products enriched with chickpea flour. *J Sci Food Agric*. 2004;63: 66-73.
- Aular A. Estudio comparativo de datos sobre encuestas de consumo alimentario y hojas de balance de alimentos. *Anal Venezol Nutr*. 2000; 13 (2):94-100.
- AVEPASTA. Asociación Venezolana de Fabricantes de Pasta. 2006. Dis <http://www.avepastas.org.ve>
- Antognelli C. The manufacture and applications of pasta as a food and as a food ingredient: A review. *J Food Technol*. 1980; 15: 121-145.
- Torres A, Frias J, Granito M, Vidal-Valverde C. Fermented pigeon pea (*Cajanus Cajan*) ingredients in pastas products. *J Agric. Food Chem*. 2006; 54: 6685-6691.
- Torres A, Frias J, Granito M, Guerra M, Vidal-Valverde C. Pasta supplementation with free  $\alpha$ -galactoside lupine flours: chemical, biological and sensory evaluation. *J Sci Food Agric*. 2006; 86:1-8.
- Granito M, Torres A, Guerra M. Desarrollo y evaluación de una pasta a base de trigo, maíz, yuca y *Vigna sinensis*. *Interciencia*. 2003; 28(7):372-379.
- Modena V, Avarillo C. 2003. Metodología de incubación. Innovación. Praxis. Innovación & Transferencia de tecnología. Boletín sobre innovación de la Dirección General de Empresas de la Comisión Europea.
- American Association of Cereal Chemist (AACC). 2000. Approved methods of the AACC. 10<sup>th</sup> Ed. St Paul. MN. p. 66-41.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> Ed. Washington, DC. p.152-169.
- Prosky L, Asp NG, Scheweiser ET, Devries JW, Furda Y. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food product. Interlaboratory study. *J. Assoc. Off Anal Chem*. 1992;75:1017-1023.
- Holm J, Björck I, Drews A, Asp NG. A rapid method for the analysis of starch. *Starch/Staerke*. 1986;38:224-226.
- Hsu H, Vavak D, Satterlee L, Miller G. Multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J Food Sci*. 1977;42(5):1269-1273.
- Kakade M, Liener I. Determination of available lysine in proteins. *Anal Biochem*. 1969;27: 273-280.
- Ministerio de Salud y Desarrollo Social (MSDS). 2000. Valores de referencia de energía y nutrientes para la población venezolana. Publicación N° 53. Serie de Cuadernos Azules. Instituto Nacional de Nutrición. Caracas, Venezuela.
- Instituto Nacional de Nutrición (INN). 2001. Tabla de Composición de Alimentos para Uso Practico. Serie de Cuadernos Azules. Caracas, Venezuela.
- COVENIN, 2001. Norma Venezolana COVENIN 2952:2001. Norma general para el rotulado de los alimentos envasados. 1<sup>ra</sup> revisión. Venezuela.
- Samaan J, El-Khayat G, Manthey F, Fuller M, Brennan C. Durum wheat quality: II. The relationship of kernel physicochemical composition to semolina quality and end product utilization. *Int J Food Sci and Technol*. 2006; 41(Suppl 2):47-55.
- Soo C, Baik B. Cooking time of white salted noodles and its relationship with protein and amylase contents of wheat. *Cereal Chem*. 2004; 81(2):165-171.
- Casagrandi D, Canniatti-Brazaca S, Salgado J, Pizzinatto A, Novaes N. Análise- tecnológica, nutricional e sensorial de macarrão elaborado com farinha de trigo adicionada de farinha de feijão-guandu. *Rev Nutr*. 1999;12(2):137-143.
- Khouryieh H, Herald T, Aramouni F. Quality and sensory properties of fresh egg noodles formulated with either total or partial replacement of egg substitutes. *J Food Sci*. 2006; 71(6):S433-S437.
- Zhao Y, Manthey F, Chang S, Hou H, Yuan S. Quality characteristics of spaguetti as affected by green and yellow pea, lentil and chickpea flours. *J Food Technol*. 2005; 70(6):371-376.
- Ferreira M, Wang S, Souza P, Ramírez J. Qualidade de cozimento de massas de trigo e soja pré-cozidas por extração. *Pesq Agropec Brás*. 2004; 39(5):501-507.
- Manthey F, Saujanya Y, Dick T, Badaruddin M. Extrusion properties and cooking quality of spaghetti containing buckwheat bran flour. *Cereal Chem*. 2004; 81(2):232-236.
- Nielsen M, Summer K, Whalley L. Fortification of pasta with pea flour and air-classified pea protein concentrate. *Cereal Chem*. 1980;57(3):203-206
- Bergman C, Gualberto D, Weber C. Nutritional evaluation of a high-temperature dried soft wheat pasta supplemented with cowpea (*Vigna unguiculata*) (L) Walp). *Arch Latinoam Nutri*. 1996; 46(2):146-153.
- Wittig E, Serrano L, Bunge A, Soto D, López L, Hernández N. Optimización de una formulación de espaguetis enriquecidos con fibra dietética y micronutrientes. *Arch Latinoam Nutri*. 2002; 52:91-100.
- Karppanen H, Mervaala E. Sodium intake and hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 2006;49(2):59-75.
- Bressani R. Factors influencing nutritive value in food grain legumes: Mucuna compared to other grain legumes. En: Food and feed from Mucuna: Current user and the way forward. Proceedings of an International Workshop. Honduras. 2002. p. 164-188.
- Wittig E. Evaluación Sensorial: una metodología actual para tecnología de alimentos. Talleres Gráficos. USACH, Chile. 1982. p. 73.

Recibido: 27-08-2008

Aceptado: 20-02-2009

## Avaliação de diferentes métodos de extração lipídica sobre a composição de ácidos graxos poliinsaturados em leite de vaca

*Ivane Benedetti Tonial, Makoto Matsushita, Nilson Evelázio de Souza, João Ângelo de Lima Perini, Damila Rodrigues de Moraes, Fernanda Araújo Bani, Jesuí Vergílio Visentainer*

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, Brasil

**RESUMO.** Avaliação de diferentes métodos de extração lipídica sobre a composição de ácidos graxos poliinsaturados em leite de vaca. Estudos comparativos entre 4 (quatro) diferentes métodos de extração de lipídios totais foram avaliados em relação à eficiência de extração lipídica e as implicações sobre a composição de ácidos graxos no leite de vaca. As extrações de lipídios totais foram realizadas de acordo com métodos convencionalmente utilizados no mundo, essas metodologias incluem os métodos de: Bligh e Dyer (BD), Folch et al. (FLS), Roese-Gottlieb (RG) e Gerber (GE). Os resultados mostram que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), no teor de lipídios totais entre os métodos de extração. As menores concentrações de ácidos graxos ômega-6 e ácidos graxos poliinsaturados foram observadas no método GE, possivelmente devido à degradação pelo ácido sulfúrico, o qual foi utilizado na metodologia. As maiores concentrações dos ácidos graxos poliinsaturados da série ômega-3 (n-3) foi observada no método BD, especialmente para a razão ômega-3/ômega-6 e os ácidos alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3), eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3), com diferenças significativas das demais metodologias. Os resultados das diferentes metodologias de extração influenciaram decisivamente nos resultados da composição quantitativa de ácidos graxos e, as avaliações indicaram o método BD como o melhor e a o método de GE como a pior na determinação quantitativa de ácidos graxos poliinsaturados em leite de vaca.

**Palavras chave:** Leite de vaca, lipídios totais, ácidos graxos, métodos de extração.

**SUMMARY.** Different lipid extraction methods on fatty acids composition in cow milk. Comparative studies among 4 (four) different methods of total lipids extraction were carried out to evaluate the lipid extraction efficiency and fatty acids contents in cow milk. Total lipids extraction methods were Bligh e Dyer (BD), Folch et al. (FLS), Roese-Gottlieb (RG) and Gerber (GB). There were non-significant ( $p < 0.05$ ) difference, in total lipids content among the extraction methods. The smallest concentrations of omega-3 (n-3) fatty acids and polyunsaturated fatty acids (PUFA) were observed on method GE, possibly due degradation of PUFA immersed in sulfuric acid used during analysis of total lipids. The highest concentrations of n-3 PUFA were observed by BD method, especially to omega-3/omega-6 ratio and alpha-linolenic acid (LNA, 18:3n-3), eicosapentaenoic (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic (DHA, 22:6n-3), significant differences were observed among the methods. The results demonstrate that the different extractions influenced decisively on quantitative fatty acids composition and evaluations indicated the methods BD as better and GE as the worst to polyunsaturated fatty acids determination.

**Key words:** Cow milk, total lipids, fatty acids, extraction methods.

### INTRODUÇÃO

A gordura do leite de vaca é importante contribuinte na ingestão de ácidos graxos essenciais e vitaminas, especialmente as lipossolúveis (1), apresentando tipicamente ácidos graxos saturados (AGS) os quais são apontados como precursores da lipoproteína de baixa densidade (LDL), responsável por doenças cardiovasculares (2). No entanto, há de considerar a participação dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI) e conjugados (CLA) que apresentam em baixas concentrações (3), mas que são alimentos funcionais, promovendo dentre eles a redução da incidência de doenças coronarianas, aumento de lipoproteína de alta densidade (HDL) (4), redução de gordura corporal (5), proteção contra o câncer (6), efeito antidiabético (7) e antioxidante (8).

Estudos sobre a composição lipídica do leite de vaca, especialmente sobre a composição em ácidos graxos, vêm sendo intensivamente realizados devido ao grande interesse mundial pelos profissionais da saúde, tendo grande importância para estudos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais (9,10). A extração dos lipídios é uma etapa crítica nas análises de lipídios totais especialmente sobre a composição de ácidos graxos, podendo ocorrer erros na análise química, assim como, contaminação ou extração inadequada do componente de interesse e conseqüentemente irá remeter a resultados e interpretações errôneas (11). Durante a extração lipídica, as amostras devem ser preparadas e analisadas cuidadosamente para evitar a oxidação dos lipídios, hidrólises, pois a produção de artefatos pode comprometer a identificação e quantificação dos componentes da fração lipídica (12).

Com objetivo de encontrar método eficiente para obtenção da fração lipídica desejada, nos últimos anos, pesquisadores vem realizando trabalhos comparando diferentes métodos de extração de lipídios.

N extração de lipídios totais do leite de vaca, os métodos mais utilizados no mundo são: Folch et al. (13) e Bligh e Dyer (14), ambos utilizando solventes clorofórmio:metanol, no entanto, os volumes de solventes utilizados no método de Folch *et al.* (13) são muitos elevados em relação aos utilizados no Bligh e Dyer (14). Os solventes usados para extração de lipídios devem solubilizar todos os compostos lipídicos e serem suficientemente polares para promoverem as dissociações das membranas celulares ou com lipoproteínas sem que ocorra reação química (15, 16). Outros métodos utilizados para extração de lipídios do leite são os métodos Roese-Gottlieb (17), que é realizado em meio alcalino (hidróxido de amônio) e de Gerber (18) que envolve processo de separação físico química meio ácido (ácido sulfúrico).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de extração dos lipídios totais em leite de vaca, utilizando quatro diferentes métodos de extração, e avaliar o efeito destas metodologias sobre a composição quantitativa de ácidos graxos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Matéria-prima

As amostras utilizadas para este experimento foram constituídas 27 (vinte e sete) caixas de leite longa vida integral (esterilizado por UHT), pertencentes à mesma marca e lote, comercializados no Brasil. Amostras constituídas de 9 (nove) caixas foram homogeneizadas e, a partir das alíquotas foram realizadas as análises em 6 (replicatas)/método.

### Determinação de umidade

A determinação de umidade foi realizada conforme técnicas da AOAC (17).

### Extração de lipídios totais

As extrações de lipídios totais foram realizadas de acordo com os métodos de Bligh e Dyer - BD (14), com clorofórmio, metanol e água (1:2:0,8); Folch et al. - FLS (13), com clorofórmio, metanol e água (2:1:1); Roese-Gottlieb - RG (17), com  $\text{NH}_3$  a 25% e Gerber - GE (18), com ácido sulfúrico e álcool isoamílico.

### Análises dos ésteres metílicos de ácidos graxos

As transesterificações dos lipídios totais foram realizadas conforme método 5509 da ISO (20). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados utilizando um cromatógrafo gasoso 14-A (Shimadzu, Japão), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida CP Sil-

88, coluna capilar (100 m, 0,25 mm e 0,25  $\mu\text{m}$  de cianopropil polisiloxano). Foi programada temperatura de coluna a 2°C / min de 180°C a 240°C. O ponto de injeção e detector foi mantido a 220°C e 245°C, respectivamente. Os fluxos dos gases (White Martins), foram de 1,4 mL.min<sup>-1</sup> para o gás de arraste ( $\text{H}_2$ ); 30 mL.min<sup>-1</sup> para o make-up ( $\text{N}_2$ ) e 30 mL.min<sup>-1</sup> e 300 mL.min<sup>-1</sup> para o  $\text{H}_2$  e para o ar sintético da chama, respectivamente. A razão de divisão da amostra (split) foi de 1/100. Identificação de ácidos graxos foi feita comparando os tempos de retenção relativo dos picos de (EMAG) de amostras com padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma), por co-eluição (spiking) de padrões junto com a amostra. As áreas de picos foram determinadas pelo Integrador-Processador CG-300 (CG Instrumentos Científicos, Brasil). Dados como porcentagens de área normalizada dos ácidos graxos.

### Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, através do software Estatística, versão 5.0 (21).

## RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta a composição em lipídios totais (gordura), ácidos graxos, somatórios e razão entre os grupos de ácidos graxos de leite de vaca submetido aos diferentes métodos de extração de lipídios.

Nos valores encontrados na Tabela 1 em percentagem de lipídios totais, não houve diferença significativa entre os diferentes métodos de extração. Na composição lipídica do leite foram detectados 24 ácidos graxos, sendo em média 64,44% de ácidos graxos saturados (AGS), 30,54% monoinsaturados (AGMI) e, 4,02% poliinsaturados (AGPI). As elevadas porcentagens de AGS no leite são conseqüências da biohidrogenação microbial do rumem (3). Dentre os ácidos graxos saturados, os predominantes para quatro métodos de extração foram os ácidos graxos 12:0 (láurico), 14:0 (mirístico), 16:0 (palmítico) e 18:0 (esteárico) e com diferenças significativas entre os métodos, exceto para o 16:0.

## DISCUSSÃO

Dentre os ácidos graxos da série ômega-6, a concentração do ácido linoléico (LA, 18:2n-6) e o somatório n-6 apresentou os menores valores no método GE, possivelmente devido a reatividade dos poliinsaturados com o ácido sulfúrico utilizado na metodologia, este resultados refletiram no somatório dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), nestes somatórios houve diferença significativa entre o método GE (menor valor) e os métodos FLS, BD e RG (maiores valores), porém sem

TABELA 1  
Composição de lipídios totais, ácidos graxos, somatários e razão de grupos de ácido graxo em leite de vaca

Composição	Métodos			
	Folch et al. (FLS)	Bligh eDyer (BD)	Roese-Gottlieb (RG)	Gerber (GE)
Lipídios totais (%)	3,51 ± 0,15	3,63 ± 0,43	3,41 ± 0,43	3,70 ± 0,29
<b>Ácidos graxos</b>				
4:0	2,00 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,93 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,23 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,99 ± 0,03 <sup>a</sup>
6:0	1,62 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,69 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,96 ± 0,07 <sup>ac</sup>
8:0	1,23 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,05 <sup>b</sup>	1,33 ± 0,08 <sup>c</sup>	1,21 ± 0,09 <sup>a</sup>
10:0	2,44 ± 0,23 <sup>a</sup>	2,66 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,68 ± 0,07 <sup>a</sup>	3,11 ± 0,09 <sup>b</sup>
11:0	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,20 ± 0,01 <sup>a</sup>
12:0	2,78 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,66 ± 0,06 <sup>a</sup>	2,04 ± 0,10 <sup>b</sup>	3,20 ± 0,20 <sup>a</sup>
14:0	12,36 ± 1,06 <sup>a</sup>	10,20 ± 0,11 <sup>b</sup>	11,21 ± 0,54 <sup>a</sup>	12,18 ± 0,94 <sup>a</sup>
14:1n-9	0,92 ± 0,08	0,71 ± 0,01	0,82 ± 0,04	0,91 ± 0,07
15:0	1,10 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,21 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,04 <sup>b</sup>
15:1n-9	0,28 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>a</sup>
16:0	28,63 ± 1,37	27,80 ± 0,09	28,33 ± 0,61	28,24 ± 1,11
16:1n-9	1,04 ± 0,06	1,02 ± 0,01	1,02 ± 0,01	1,01 ± 0,05
17:0	0,69 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,68 ± 0,01 <sup>a</sup>
17:1n-9	0,25 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,37 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,01 <sup>b</sup>
18:0	13,08 ± 0,75 <sup>a</sup>	13,87 ± 0,14 <sup>b</sup>	13,94 ± 0,20 <sup>b</sup>	12,92 ± 0,86 <sup>a</sup>
18:1n-9	26,63 ± 1,70 <sup>a</sup>	29,36 ± 0,08 <sup>b</sup>	28,48 ± 0,54 <sup>b</sup>	26,29 ± 1,91 <sup>a</sup>
18:1n-7	0,40 ± 0,02	0,45 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,39 ± 0,03
18:2n-6	1,53 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,47 ± 0,13 <sup>ac</sup>	1,67 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,35 ± 0,07 <sup>c</sup>
20:0	0,28 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,16 <sup>b</sup>	0,36 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,25 <sup>a</sup>
18:3n-3	0,56 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,58 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,03 <sup>a</sup>
18:2c9t11	1,29 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,16 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,35 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,22 ± 0,01 <sup>ab</sup>
20:4n-6	0,43 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,42 ± 0,08	0,45 ± 0,02
20:5n-3	0,11 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,10 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>
22:6n-3	0,13 ± 0,32 <sup>a</sup>	0,16 ± 0,34 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,07 <sup>a</sup>
<b>Somatários e razão</b>				
AGS	66,43 ± 2,44 <sup>a</sup>	63,96 ± 0,24 <sup>b</sup>	64,40 ± 1,01 <sup>b</sup>	66,97 ± 2,42 <sup>a</sup>
AGMI	29,52 ± 0,10 <sup>a</sup>	32,10 ± 0,04 <sup>b</sup>	31,32 ± 0,05 <sup>b</sup>	29,21 ± 0,09 <sup>a</sup>
AGPI	4,05 ± 0,75 <sup>a</sup>	3,97 ± 0,14 <sup>a</sup>	4,28 ± 0,21 <sup>a</sup>	3,82 ± 0,86 <sup>b</sup>
n-6	1,96 ± 0,75 <sup>ab</sup>	1,86 ± 0,14 <sup>b</sup>	2,09 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,86 <sup>b</sup>
n-3	0,80 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,84 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,80 ± 0,04 <sup>a</sup>
n-3/n-6	0,44 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,09 <sup>b</sup>	0,40 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,07 <sup>a</sup>

Valores médios ± desvio padrão de 6 replicatas.

<sup>a</sup>Letras sobrescritas diferentes na horizontal representam valores estatisticamente diferentes (P < 0,05).

Abreviaturas: AGS - Ácidos Graxos Saturados; AGMI - Ácidos Graxos Monoinsaturados; AGPI - Ácidos Graxos Poliinsaturados; n-3 - Ácidos Graxos ômega-3; n-6 - Ácidos Graxos Ômega-6.

diferença significativa entre os três métodos. Desta forma, não é recomendado o método GE para a determinação de ácidos graxos poliinsaturados em leite. A escolha entre os métodos FLS e BD, deve-se dar preferência para o método BD, considerando o reduzido volume de solvente utilizado em relação ao método FLS.

Nos ácidos graxos da série ômega-3, o método BD foi o que apresentou os maiores resultados, dentre os ácidos os

teores de LNA (0,64%), EPA 20:5n-3 (0,15%), DHA (0,16%) e o somatório de ômega-3 (0,93%) foram sempre superiores e com diferença significativa em relação aos demais métodos, deve se lembrar que estes ácidos são de importante valor nutricional e sempre estudados nas pesquisas. O elevado valor do somatório de ômega-3, encontrado pelo método de BD, resultou na maior razão ômega-3/ômega-6 (n-6/n-3 = 0,51) e com diferença significativa dos demais métodos, o que indica

que diferentes metodologias de extração podem influenciar decisivamente nos resultados e conseqüentemente nas interpretações.

### CONCLUSÃO

O conteúdo de lipídios totais extraído foi independente do método utilizado na extração. O método Gerber foi o pior método na avaliação do conteúdo lipídico, enquanto que o método de Bligh e Dyer foi o que apresentou melhores resultados em relação à composição de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente os ômega-3. Desta forma, o método Bligh e Dyer é recomendado para as avaliações do conteúdo lipídico, especialmente na determinação de ácidos graxos em leite de vaca.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq e a Fundação Araucária.

### REFERÊNCIAS

- Chen S, Bobe G, Zimmerman S, Hammond EG, Luhman CM, Boylston TD, Freeman AE, Beitz DC. Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acid compositions. *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 342-348.
- Parodi PW. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 1999; 82: 1339-1349.
- Lock AI, Shingfield KJ. Optimising milk composition In: Kebreab E, Mills J, Beaver DE, (Eds). *Dairying-Using Science to Meet Consumers' Needs*, Occ. Brit. Soc. Anim. Sci. Nottingham University Press, Loughborough, UK 2004; 29: 107-188.
- Demeyer D, Doreau M. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proc. Nutr. Soc.* 1999; 58: 593-607.
- Whigham LD, Cook ME, Atkinson RL. Conjugated linoleic acid: implications for human health. *Pharmacological Res.* 2000; 42: 503-510.
- Lin TY, Lin CW, Lee CH. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chem.* 1999; 67: 1-5.
- Tanaka K. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *J. Anim. Sci.* 2005; 76: 291-303.
- Bauman, DE, Corl, LH.; Baugard, LH, Griinari, JM. Trans fatty acids, conjugated linoleic acid and milk fat synthesis. In: *Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers (Proceedings)*. New York: New York State College of Agriculture and Life Sciences / Department of Animal Science and Division of Nutritional Science, 1998. p. 95-103.
- Marangoni F, Agostini C, Lammardo AM, Bonvissuto M, Giovannini M, Galli C, Riva E. Polyunsaturated fatty acids in maternal plasma and in breast milk. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* Elsevier Science Ltda. 2002; 66: 535-540.
- Matsushita, M, Tazinafo, NM, Padre, RG; Oliveira, CC, Souza, NE, Visentainer, JV, Macedo, FAF, Ribas, N P. Fatty acid profile of milk from Saanen goats fed a diet enriched with three vegetable oils. *Small Ruminant Research*, v. 72, p. 127-132.
- Tanamati C, Oliveira CC, Visentainer JV, Matsushita M, Souza NE. Comparative Study of Total Lipids in Beef Using Chlorinated Solvent and Low Toxicity Solvents Methods. *JAOCS* 2005; 82:1-5.
- Milinsk, MC, Matsushita, M, Visentainer, JV, Oliveira, CC, De Souza, N.E. Comparative analysis of eight esterification methods in the quantitative determination of vegetable oil fatty acid methyl esters (FAME). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 19, p. 1475-1483, 2008.
- Folch J, Lees M, Sloaney GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497-509
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Bioch.* 1959; 37: 911-917.
- Christie WW. *Lipid Analysis*. Oxford: Pergamon Press. Chromatographic and spectroscopic analysis of lipids: General principles 1982; 3: 25-49.
- Smedes F, Askland TK. Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin.* 1999; 38: 193-201..
- Roes-Gottlieb method in AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (W. Horwitz, Ed.), 15th ed. Method 989.05. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, U.S.A 1990.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Laboratório Nacional de Referência Animal. *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes*. Brasília, 1981; 2 – Métodos Físicos Químicos.
- Cunniff PA. *Official Methods of Analysis of the association of official analytical chemistry*. In: Association of Official Analytical Chemists International 1998. Arlington..
- ISO- International Organization for Standardization. *Animal and vegetable fats and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids*. ISO. Method ISO 5509. 01-06,1978.
- Statistica. *Statística 5.0 software*. Stasoft Tuckska, 2005.

Recibido : 21-08-2008

Aceptado : 02-02-2009

## Contenido de aceite, ácidos grasos y escualeno en variedades crudas y procesadas de grano de amaranto

Brenda Rodas, Ricardo Bressani

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

**RESUMEN.** Seis variedades de Amaranto fueron procesadas para dar una harina cruda, una nixtamalizada, una cocida en agua, otra expandida, una malteada y una laminada después de un tratamiento térmico. Los valores analíticos en estas muestras se compararon con los valores en una muestra cruda. Los granos crudos contenían de 14.5% a 15.1% de proteína, 5.9 a 6.7 de grasa, y 2.3% a 3.2% de cenizas. Las harinas de las variedades de diferentes procesos dieron un contenido de grasa que varía entre 6.4% - 7.0%. Las harinas de procesos en seco contenían mas aceite que las de procesos en húmedo (cocida en agua). El aceite de tres variedades y de 4 procesos fue analizado por su contenido de ácidos grasos, dando en promedio 17.85% de C16:0, 68.1% de oleico + linoléico, 3.86% C18:3, 5.1% de C20:0 y cantidades menores de C20:1 y C22:0. El contenido de escualeno en el aceite de las harinas de los diferentes procesos fue de 7.0-9.6 g/100 g para la harina cruda, de 8.1-12.6 g/100 g para la de cocción húmeda, 9.0-12.7 g/100 g para la nixtamalizada, 10.1-12.8 g/100 g para la expandida, 9.0-11.2 g/100 g para la malteada y 6.0-9.5 g/100 g para la harina laminada.

**Palabras clave:** Aceite, ácidos grasos, escualeno, amaranto en grano crudo y procesado.

**SUMMARY.** The oil, fatty acid and squalene content of varieties of raw and processed grain amaranth. Six amaranth grain varieties were processed to yield a nixtamalized flour, one cooked in water, one expanded, a malted one and a laminate samples after a thermic treatment. The chemical values of the raw samples contained from 14.5% to 15.1% protein, 5.9 to 6.7% ether extract and from 2.3% to 3.2% ash on a dry weight basis. The flours from the different processes yield products with a fat content which varied from 6.4% to 7.0% for the 6 varieties. The flours coming from dry heat processing contained higher oil levels than those flours coming from wet processes. The oil from only 3 varieties and from 4 processes were analyzed from its fatty acid composition. The oil contained on the average 17.85% of C16:0, 68.1% of stearic, olic and linoleic acids, 3.86% of C18:3, 5.1% of C20:0 and small amounts of C20:1 and C22:0. The squalene content in the oil of the processed flours varied from 7.0 to 9.6 g/100 g for the raw flour, 8.1 - 12.6 g/100 g for the flour from wet cooking in water, 9.0 -12.7g/100 g for the flour from the nixtamalization process, 10.1-12.8g/100 g for the expanded grain flour, 9.0 to 11.2 g/100 g for the malted flour and 6.0 -9.5 g/100 g for the laminated grain flour. The squalene averages per process showed statistical significant differences.

**Key words:** Oil, fatty acids, squalene, amaranth grain, raw and processed.

### INTRODUCCION

Históricamente, el grano de amaranto, es probablemente junto al maíz, el grano que tiene su presencia en América cuatro mil años antes de Cristo. Los primeros en utilizarlo fueron los Mayas y los Aztecas en sus ceremonias religiosas que fueron abolidas por los conquistadores, logrando con eso una caída sustancial de la producción y disponibilidad a pesar de sus grandes bondades nutricionales (1-3).

La familia Amaranthacea comprende más de 60 géneros y 800 especies. El *Amaranthus hypochondriacus* y el *Amaranthus cruentus* cultivados en Mesoamérica (México y Guatemala) y el *Amaranthus caudatus* cultivado en el Perú, se producen en panojas llenas de una pequeña semilla. Además de las especies que producen granos, existen otras especies que ofrecen sus hojas como verdura de alto valor nutritivo tanto por su contenido de proteína como de vitaminas y minerales (4,5).

Por su tolerancia a condiciones ambientales adversas, el grano de amaranto ofrece gran potencial para ser cultivado en varias regiones de Guatemala reportando buenos rendimientos (6,7). La composición química y el valor nutritivo de las variedades de amaranto cultivadas en Guatemala, han sido ampliamente estudiadas (6,8,9) y su contenido proteico (14%-18%) es de alta calidad biológica por su contenido en aminoácidos esenciales en particular lisina. Además es un excelente complemento a la proteína del maíz, sorgo, arroz y trigo y de otro tipo de alimentos como el frijol, leche, soya y avena (9-11).

El aceite procedente del grano de amaranto (5%-8%) presenta un atractivo balance de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados (12-16). No se han publicado muchos estudios que indiquen si las diferencias en el contenido de grasa y de ácidos grasos sea debido a efectos genéticos o a efectos ambientales. Saunders y Becker (4) indican que variables agronómicas son responsables por las

diferencias en el contenido de ácidos grasos. Estos resultados han sido respaldados por Ayorinde y col (15) y Berganza y col (16). El procesamiento al cual se somete la semilla para su consumo también puede afectar el contenido de ácidos grasos. Singhal y Kulkarni (14) informaron de una reducción significativa, entre 75.5% y 62.3% en el porcentaje de insaturación en el aceite, siendo el ácido linoléico el más afectado con una disminución de 27.0% a 40.8%.

El aceite de amaranto es considerado como una fuente rica en escualeno (16-18) que se aproxima a los contenidos informados para el aceite de tiburón (19). Aunque los valores en el amaranto son muy variables, esta variabilidad depende de los genotipos estudiados y de la cantidad de insaponificables aislados del aceite, pues la molécula del escualeno presenta alta estabilidad (16,17). Lyon y Becker (12) informan valores de 7.4% en el aceite de amaranto de especie *Amaranthus Cruentus*, mientras que Ayorinde y col. (15) informan valores de  $3.01\% \pm 0.81\%$  de escualeno en el aceite de 13 variedades, con una variación de 1.88% a 4.66% del aceite.

La aplicación de procesos de cocción al grano de amaranto, hace que se tenga un control en la elaboración de productos de amaranto, particularmente si se utiliza harina de amaranto expandido. Durante el proceso de expansión, el grano de amaranto es expuesto a temperaturas muy elevadas aunque por corto tiempo, y en algunas ocasiones se expone a aire a contracorriente, para obtener un máximo rendimiento en volumen, lo que provoca la aparición de productos de oxidación proveniente de los ácidos grasos. Este proceso según Singhal y Kulkarni (14) indujo un aumento del 15.5% en el contenido de escualeno. Lyon y Becker (12) indicaron que el refinamiento alcalino del aceite de amaranto es responsable del aumento en escualeno observado por esos autores, en donde el escualeno aumento de 6.96% a 8.01% del aceite. El efecto de otros procesos sobre el contenido de escualeno del amaranto no ha sido informado. El escualeno es un compuesto isoprenoide similar en su estructura al beta-caroteno y es un metabolito intermedio en la síntesis de colesterol. El escualeno consumido se distribuye en el tejido animal con una concentración alta en la piel. No es muy susceptible a la peroxidación siendo protector a la exposición de radiación UV y radiación ionizante (20,21). El principal uso terapéutico hoy día del escualeno, es como de terapia adjunta para una variedad de cáncer (24).

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

#### Variedades de Amaranto

La semilla de seis variedades de *Amaranthus Cruentus*, fueron cultivadas en el área subtropical de Guatemala a una altura de 100 m sobre el nivel del mar en parcelas de 3 metros

de ancho y 50 metros de largo. Después de 120 días se cosechó el grano y se trasladó al laboratorio en donde fue limpiado de residuos de cosecha. Muestras de cada variedad fueron tomadas para producir harina de amaranto crudo, harinas de amaranto cocido en agua, cocido por nixtamalización (cocción alcalina), expandido, malteado y laminado. Las harinas se produjeron moliendo el grano procesado ya seco en un Cyclone Sample Mill de la UDI Corporation.

### Métodos

#### Tratamiento de los granos de las variedades de amaranto

Una muestra de 1.5 kg de grano entero de cada variedad fue lavada con una solución al 0.5% de bicarbonato de sodio y luego con agua destilada. Después de eliminar el agua superficial se puso en un horno de convección a 50°C para secar el grano.

#### Cocción en agua

Una muestra de 300 g de grano limpio se cocinó en agua por 35 minutos a ebullición. El agua se descartó y el grano cocido fue secado a 65°C a peso constante y se molió a 80 mesh.

#### Nixtamalización

Una muestra de 300 g fue cocida en agua con 0.6% de cal del peso de grano por 10 minutos. Luego se lavó y se secó a peso constante (22) para finalmente molerlo a 80 mesh.

#### Expansión

El grano limpio (300 g) se expandió poniéndolo sobre una superficie a 180° – 200°C por 20 – 30 segundos. Como en los casos anteriores se molió a 80 mesh.

#### Laminado

El método consistió en moler el amaranto cocido y hacer una masa con la cantidad suficiente de agua para después pasarlo por un laminador y obtener hojas de 0.1 mm de espesor.

#### Malteado

Luego de dejar el grano limpio en remojo por 12 horas se puso a germinar por 24 – 48 horas a 36°C manteniéndolo húmedo. Al aparecer el brote de germinación el grano se maltea poniéndolo a 60°, 75° y 95°C por 1 hora en cada temperatura. Luego se molió a 80 mesh.

#### Extracción de aceite

Una muestra de  $5 \pm 0.001$  g de harina de amaranto crudo o procesado se colocó en una unidad extractora tipo Soxhlet, por un espacio de 8 horas según lo recomendado por el método oficial de la AOAC (23). Se utilizó como disolvente, éter de

petróleo (bp 40 – 60°). El aceite extraído fue almacenado en frío a 4°C hasta su posterior análisis.

### **Extracción y aislamiento de escualeno**

La extracción, aislamiento y cuantificación de escualeno del aceite de amaranto ha sido realizada por los métodos de la AOAC (25) y del método utilizado por He y col (17). Todas las muestras fueron analizadas en duplicado.

### **Obtención de los insaponificables**

5.0 ± 0.001 g de aceite de amaranto crudo y procesado fueron pesados en una balanza analítica para disolverlos en una mezcla de 20 ml de etanol 95% y 3 ml de solución concentrada de KOH, manteniendo la mezcla en ebullición por 30 minutos, agitando constantemente. Después se enfrió rápidamente y se transfirió la mezcla a un separador donde se lavó con 20 ml de etanol 95% y 40 ml de agua. Los insaponificables obtenidos fueron extraídos 5 veces con 50 ml de éter de petróleo cada vez para eliminar la solución jabonosa (17,25). Los resultados de los 5 extractos fueron lavados con fracciones de 25 ml de agua cada vez, agitando vigorosamente, hasta que el agua de lavado quedó libre de álcali, es decir hasta que el agua de lavado no dio coloración rosa al contacto con indicador de fenolftaleína a 1% en etanol.

La solución etérea fue secada por filtración con sulfato de sodio anhidro y el éter de petróleo fue removido completamente de la muestra por evaporación. Finalmente se pesaron los insaponificables.

### **Purificación de los insaponificables en columna cromatográfica de adsorción**

Los insaponificables obtenidos en la etapa anterior, fueron purificados y aislados por adsorción en una columna cromatográfica de 8 mm i.d. y 30 cm de longitud, con tope de teflón y 25 ml de capacidad.

Se adicionó alúmina adsorbente a la columna hasta aproximadamente 10 ml de altura, aplicando suficiente presión para compactarla. En los extremos superior e inferior se ha usado algodón como filtro (17,23).

Se acondicionó la columna lavándola con 15 ml de éter de petróleo y manteniéndola húmeda hasta su utilización.

Para cargar la columna con la muestra, se disuelven los insaponificables en 5 ml de éter de petróleo y se transfieren a la columna de adsorción con una pipeta pasteur. Cuando la solución está dentro de la columna, se adicionan 5 ml de éter de petróleo usados previamente para lavar el recipiente de contención de la muestra. Luego se siguió adicionando éter de petróleo de 5 en 5 ml hasta haber eluido un volumen total de 50 ml. La velocidad de elusión no debe ser mayor de 1 ml/min. Al terminar la elusión, lavar la columna con 40 ml de éter de petróleo y acondicionar nuevamente hasta la siguiente

elusión. Finalmente todo el disolvente de la muestra es removido hasta total sequedad.

### **Cuantificación de escualeno**

El residuo inadsorbido por la columna de adsorción, fue redisolto en 5 ml de diclorometano y se añadió luego una cantidad suficiente de solución de sulfato-bromo-piridina para obtener un exceso del 50% o más del halógeno, o sea aproximadamente 10 ml.

Se mezcló en la oscuridad por 5 minutos y a la reacción resultante se le agregaron 5 ml de KI al 10% juntamente con 40 ml de agua, agitando vigorosamente. Por último se utilizó una solución de tiosulfato de sodio 0.05 N para la titulación del halógeno.

Al mismo tiempo se examinó un blanco de reactivos, y el cálculo del contenido de escualeno se basó en las proporciones sugeridas en el método oficial de la AOAC (23). Los resultados se han reportado como mg de escualeno/100 g de aceite.

### **Análisis de ácidos grasos**

Los ácidos grasos del aceite de amaranto han sido analizados por cromatografía de gases (GC) utilizando el método propuesto por la AOAC (23) para la preparación e identificación de ésteres metílicos (FAMES) de ácidos grasos.

El sistema cromatográfico utilizado fue un HP-5890 II/Chemstation equipado con ionizador de flama FID. Se utilizó una columna cromatográfica SPB-5 (30 m x 0.53 mm i.d. x 0.5 µm).

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: corriente de nitrógeno (47 psi) con split, acarreador 2 psi en cabeza de columna, helio como gas inerte 12 psi, aire 35 psi, temperatura del inyector 250°C, temperatura del detector FID 260°C, temperatura del horno 200°C con una rampa de temperatura de 10°C/min hasta 250°C, 17 min, volumen de inyección 1.0 microlitro. Los picos fueron identificados por comparación de estándares de FAMES (SIGMA, Aldrich).

## **RESULTADOS**

La Tabla 1 resume los datos de composición química de las 6 variedades de amaranto de grano. A pesar del contenido bajo de humedad, el contenido de proteína varió de 14.5% – 15.1%, y el de grasa entre 5.9% – 6.7%. La Tabla 2 resume el porcentaje de aceite encontrado en las 6 variedades de amaranto sometidas a procesamiento. El contenido de aceite promedio por proceso fue mayor en muestras de procesos en seco como el expandido, el malteado y el laminado que de los procesos en húmedo.

**TABLA 1**  
Composición química proximal de variedades de amaranto crudos, g/100g

Variedad	Humedad	Proteína	Grasa	Ceniza	Fibra Cruda	Carbohidratos
K-227	9.4 ± 0.1ab	15.1 ± 0.7	6.2 ± 0.1	2.6 ± 0.1abc	4.0 ± 0.2	62.6 ± 0.4
D-70-1	9.1 ± 0.2ab	14.8 ± 0	6.2 ± 0.1	2.4 ± 0abc	4.2 ± 0	63.2 ± 0.2
A-200-D	9.0 ± 0.1b	14.8 ± 0.1	6.5 ± 0	2.3 ± 0abc	4.1 ± 0	63.4 ± 0.1
Don Armando	9.2 ± 0.6ab	14.5 ± 0.1	6.4 ± 0.2	3.2 ± 0.1abc	3.8 ± 0.3	62.9 ± 0.5
Alegría Disciplinada	9.7 ± 0.3ab	14.5 ± 0.1	5.9 ± 0.4	2.9 ± 0.2ab	4.7 ± 1.3	62.2 ± 2.1
Montana	10.2 ± 0a	14.5 ± 0.4	6.7 ± 0.1	3.3 ± 0.1a	3.8 ± 0.2	61.6 ± 1.6
	s	Ns	ns	s	ns	Ns

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente diferentes.

**TABLA 2**  
Contenido de aceite en variedades de grano de amaranto con respecto al proceso, g/100g

Variedad	Crudo	Cocción Agua	Cocción Alcalina	Expandido	Malteado	Laminado	Promedio
K-227	6.5 ± 0.13	6.6 ± 0.03	6.8 ± 0.22	7.6 ± 0.29	6.9 ± 0.22	6.5 ± 0.13	6.81
D-70-1	6.7 ± 0.19	6.5 ± 0.47	6.2 ± 0.70	7.4 ± 0.70	6.6 ± 0.70	6.5 ± 0.03	6.65
A-200-D	6.8 ± 0.21	6.9 ± 1.38	6.3 ± 1.45	6.7 ± 0.19	7.3 ± 1.45	6.5 ± 0.52	6.75
Don Armando	6.3 ± 0.18	6.08 ± 0.19	6.6 ± 0.12	6.1 ± 0.12	6.1 ± 1.63	7.3 ± 1.37	6.53
Alegría Disciplinada	6.4 ± 0.04	6.6 ± 0.17	6.9 ± 0.22	6.9 ± 0.35	8.6 ± 0	6.6 ± 0.22	7.00
Montana	6.9 ± 0.36	5.2 ± 0.22	6.9 ± 0.16	7.2 ± 0.25	6.1 ± 0.17	8.6 ± 3.06	6.82
Promedio	6.60	6.43	6.61	6.98	6.93	7.00	

Las diferencias entre variedades de grano no fueron significativas estadísticamente como tampoco fueron las diferencias entre procesos. La Tabla 3 presenta datos de ácidos grasos en el aceite de 3 variedades que fueron procesadas por cocción en agua, por nixtamalización y expansión. El ácido palmítico se encontró en un rango de 14.6% a 20.6%. No se obtuvo un fraccionamiento limpio entre el ácido esteárico, oleico y linoleico, representando el mayor contenido en el aceite. Esta cifra esta dada en su mayor cantidad por el linoleico

de acuerdo a la literatura consultada y por el ácido oleico (13-15). Los procesos húmedos en la semilla incrementan el contenido en comparación con el control, o sea no procesado, mientras que el grano procesado en seco reduce la cantidad de estos tres ácidos grasos. La cantidad de ácidos grasos C20:0 (araquidónico) parece aumentar en procesamiento de la semilla en seco. También se detectaron pequeñas cantidades de C20:1 y C22:0.

**TABLA 3**  
Composición de ácidos grasos en aceite de amaranto crudo y procesado (%)

Muestra	C14:0	C16:0	C18:0+18:1+18:2	C18:3	C20:0	C:201	C22:0
Crudo	D-70-1	-	20.65	75.52	3.82	-	-
	A-200-D	0.18	18.47	73.69	4.04	0.35	0.38
	Don Armando	-	18.38	48.17	3.45	-	-
Cocción agua	D-70-1	-	17.01	75.41	3.83	0.49	0.42
	A-200-D	-	18.83	70.53	4.63	1.92	0.41
	Don Armando	-	18.77	71.98	4.16	2.44	0.37
Nixtamalizado	D-70-1	-	15.66	73.40	3.54	0.62	0.44
	A-200-D	-	18.94	71.88	4.57	1.15	0.34
	Don Armando	-	18.21	61.17	3.40	8.91	1.14
Expandido	D-70-1	-	14.59	59.37	3.40	19.53	1.72
	A-200-D	-	15.50	66.21	3.69	11.39	1.23
	Don Armando	-	19.12	70.00	3.73	3.83	1.34

C14:0 ácido mirístico; C16:0 ácido palmítico; C18:0 ácido esteárico; C18:1 n-9 ácido oleico; C18:2 n-6 ácido linoleico; C18:3 n-3 ácido alfa-linolénico; C20:0 ácido araquidónico; C20:1 ácido cis-eicosanoico; C22:0 ácido behénico

TABLA 4  
Contenido de escualeno en harinas crudas y procesadas de amaranto de grano (g/100 g aceite)

Variedad	Crudo	Cocción agua	Cocción alcalina	Expandido	Malteado	Laminado
K-277	9.24 ± 0	10.30 ± 0.09	9.43 ± 0.29	12.47 ± 0.57	11.18 ± 0.45	8.15 ± 0.45
D-70-1	9.29 ± 0.27	12.66 ± 0.87	11.05 ± 0	10.16 ± 0.18	10.88 ± 0	8.04 ± 0
A-200-D	7.99 ± 0.08	12.14 ± 0	8.78 ± 0.01	10.05 ± 0.33	9.64 ± 0.31	5.52 ± 0
Don Armando	9.64 ± 0.21	11.32 ± 0.30	11.69 ± 0	12.34 ± 0	9.46 ± 0	6.95 ± 0.01
Alegría Disciplinada	8.05 ± 0.54	10.81 ± 0.23	12.73 ± 0	12.88 ± 0.63	8.92 ± 0	7.37 ± 0
Montana	6.98 ± 1.05	8.13 ± 0	11.74 ± 0	10.68 ± 0.30	9.59 ± 0.20	9.57 ± 0
Media	8.53e	10.89ab	10.90ab	11.43a	9.94abcd	7.60e

Letras diferentes indican diferencias estadística

Finalmente la Tabla 4 resume el contenido de escualeno en el aceite de los materiales crudos y procesados del presente estudio. Hubo diferencias estadísticamente significativas por variedad, así como también por proceso.

### DISCUSION

La composición química proximal de las 6 variedades de amaranto son comparables a datos publicados anteriormente (6-8). Sin embargo el contenido de proteína se esperaba que fuera un poco más elevado. Las diferencias en el promedio de humedad fue significativo entre muestras, así como también en el contenido de cenizas. El contenido de aceite de las harinas obtenidas del amaranto procesado (Tabla 2) varía con respecto al contenido de aceite del amaranto crudo. Los materiales procesados en seco (expansión, malteado, laminado) contienen más aceite que las muestras crudas y las procesadas en medio líquido. La causa podría ser el rompimiento de la célula, permitiendo una mejor penetración del solvente y extrayendo por consiguiente mayores niveles de grasa.

Los principales ácidos grasos encontrados en el aceite de amaranto (Tabla 3) son el palmítico (16:0) en un porcentaje promedio de 18%, el ácido oleico (18:1 n-9) que juntamente con el ácido linoleico (18:2 n-6) hacen un total de 75% del total de ácidos grasos, y el ácido linoleico (18:3 n-3) presente en un 3% del total de ácidos grasos. Puede advertirse que la diferencia entre genotipos es mínima en cuanto al porcentaje de ácidos grasos, sin embargo, es significativa entre los procesos de cocción húmeda y expandido en los que se observa una diferencia de un 10% menos en el ácido linoleico, no siendo así para el proceso de nixtamalización. Cabe mencionar que la identificación realizada para los ácidos grasos sólo es una aproximación de los valores totales individuales. En experiencias futuras se estudiará la composición cuantitativa de los ácidos presentes en el aceite de amaranto.

El proceso de nixtamalización – expandido, dieron niveles de ácidos grasos insaturados en menor cantidad que el de cocción en agua y el crudo. Los valores de las extinciones a

234 – 268 nm reflejan que la aparición de productos primarios y secundarios de oxidación es mínima tanto para el proceso nixtamalizado (con cocción) – expandido con el proceso de nixtamalizado (sin cocción) – expandido.

El aceite de amaranto extraído contiene cantidades considerablemente altas de escualeno (Tabla 4). Los valores obtenidos están comprendidos en un intervalo de 7 a 9.6 g/100 g en el amaranto crudo y entre 6 y 12.8 g/100 g en el amaranto procesado, mismos que difieren de los citados en la literatura (4% – 8%) (12,15). La mayor variabilidad se observa en el amaranto tratado por expansión en el que los valores son superiores a los obtenidos en los otros procesos (10.1 – 12.8 g/100 g) que puede ser causado por la formación de productos de oxidación durante el proceso y que pueden ser contados como impurezas por lo que es aconsejable verificar la estructura del escualeno mediante análisis cromatográfico o espectrometría de masas.

### CONCLUSIONES

El aceite de amaranto puede ser considerado como una fuente vegetal alternativa en la obtención de escualeno (8 – 12 g/100 g). Este porcentaje varía en proporción a la cantidad de insaponificables aislados durante la extracción. Los datos mostraron diferencias de escualeno entre variedades. Con la excepción del proceso de laminado del grano, los procesos de cocción en agua, la cocción alcalina, el de expansión y malteo dieron valores más altos de escualeno que los valores en la muestra cruda. Puede ser considerado también como fuente importante en la obtención de ácidos grasos esenciales como el linoleico y linolénico.

### AGRADECIMIENTO

La información del presente documento viene principalmente del proyecto FODECYT 23-02 “Estudios Sobre la Industrialización del Grano de Amaranto, Caracterización Química y Nutricional de Productos

Intermedios y Finales del Procesamiento “, financiado parcialmente por FODECYT.

### REFERENCIAS

- National Research Council. Amaranth: Modern prospects for an ancient crop. Washington. National Academy Press. 1984 pp 153.
- National Research Council. Board on science and technology for international development. Lost crops of the Imcas. National Academy Press, DC 1989.
- Sánchez Marroquin, A. Potencialidad agroindustrial del amaranto. Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. México 1980.
- Saunders RM and R Becker. In advances in cereal science and technology Vol. VI Ed. Y. Pomeranz, St. Paul, Mn, American Association of Cereal Chemists, pp. 357-396; 1984.
- Bressani R. World needs for improved nutrition and the role of vegetables and legumes. In: 10<sup>th</sup>. Anniversary Monograph Series. Asian Vegetable and Development Center. Shanhua, Taiwan, Republic of China AV DC Pub. 83 – 185; 1983.
- Bressani R, JM González, J Zuñiga, M Breuner and LG Elias. Yield, selected chemical composition and nutritional value of 14 selections of amaranth grain representing four species. *J Sci Food Agric.* 38:347 – 353;1987.
- Bressani R, LG Elias, JM González and R Gómez-Brenes. The Chemicals composition and protein quality of amaranth grain germoplasm in Guatemala. *Arch Latinoamer Nut.* 37:364-377; 1987.
- Bressani R, JM González, LG. Elias and M Melgar. Effect of fertilizer application on the yield, proteína and fat content, and protein quality of raw and cooked grain of three amaranth species. *Plant Food Human Nutr.* 37: 59 – 67; 1987.
- Bressani R. The proteins of grain amaranth. *Food Rev Intl.* 5: 13 – 38; 1989.
- Bressani R. Composition and nutritional properties of amaranth. Chap. 10 In: Amaranth, biology, chemistry and technology. Ed. O. Paredes-López CRC Press, Inc. 1994.
- Breene WM. Food uses of grain amaranth. *Cereal Foods World* 36:426-430; 1991.
- Lyon CK and R Becker, Estructure and refining of oil from amaranth seed. *J Am Oil Chem. Soc.* 64:233-235; 1987.
- Becker R. Preparation, composition and nutritional implications of amaranth seed oil. *Cereal Foods World* 34:950-953; 1989.
- Singhal DS and PR Kulkarni. Effect of puffing on oil characteristics of amaranth (Rajgeera) seeds. *J Am Oil Chem Soc.* 67:952 – 954; 1990.
- FO Ayorinde, MO Ologunde, EY Nana, BN Bernard, OA Afolabi, OL Oke and RL Shepard. Determination of fatty acid composition of amaranthus species. *J Am Oil Chem Soc.* 66:1812 – 1814;1989.
- Berganza BF, AW Moran, G Rodriguez, NM Coto, M Santa Maria y R Bressani, Effect of variety and location on the total fat, fatty acids and squalene content of amaranth. *Plant Food for Human Nutrition*, 58:1-6, 2003; 2003.
- He Han-Ping, Y Cai, M Sun and H Corke. Extraction and purification of squalene from amaranthus grain. *J Agric Food Chem.* 50:368 – 372; 2002.
- Fitelson J. The occurrence of squalene in natural fats. *J Am Oil Chem Soc.* 26:506-509.
- Heller JH, MS Heller, J Spanfer and E Clark. Squalene content of various shark livers. *Nature* 174:919; 1957.
- Gylling H, Miettinen TA. Post absorptive metabolism of dietary squalene. *Atherosclerosis* 106: 169 – 178; 1994.
- Miettinen TA, Vanhanen H. Serum concentration and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding. *Am J Clin Nutr.* 59:356 – 363; 1994.
- Bressani R and L Estrada, Effect of lime cooking of grain amaranth on selected chemical components and on its protein quality. *J. Agr. Food chem.* 42: 1998-2001; 1994.
- AOAC. Official Methods of Analysis. 14<sup>th</sup> Edition 1984.
- Kelly GS. Squalene and Its Potential Clinical Uses. *Altern. Med. Rev.* 4(1)29-36; 1999.

Recibido: 06-08-2008

Aceptado: 18-02-2009

## Chemical characterization, antioxidant properties, and volatile constituents of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) cultivated in Costa Rica

Óscar Acosta, Ana M. Pérez, Fabrice Vaillant

Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.  
Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD),  
Département Performances des systèmes de production et de transformation tropicaux (PERSYST), France

**SUMMARY.** Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) is a native fruit of the Andes, cultivated and consumed mainly in Ecuador, Colombia, and Central America. Because of its pleasant aroma and attractive color, it has high potential as an ingredient of products such as juices, nectars, and jams. The main characteristics of mature naranjilla fruits cultivated in Costa Rica were assessed, including sugar content, total titratable acidity, total soluble solids, oxygen radical absorbance capacity (H-ORAC), and total polyphenolic and ascorbic acid content. Carotenoid and volatile compound identification was also done. The samples showed sucrose, glucose, and fructose content of  $1.6 \pm 0.3$ ,  $0.68 \pm 0.05$ , and  $0.7 \pm 0.1$  g/100 g, respectively. Total titratable acidity was  $2.63 \pm 0.07$  g citric acid equivalent / 100 g and total soluble solids amounted to  $9.1 \pm 0.5$  °Brix. H-ORAC value was  $17 \pm 1$  µmol Trolox equivalent / g, total polyphenolic content was  $48 \pm 3$  mg gallic acid equivalent / 100 g and ascorbic acid content was  $12.5 \pm 0.0$  mg/100 g. Carotenoid content of the whole fruit and pulp was  $33.3 \pm 0.6$  and  $7.2 \pm 0.3$  µg/g, respectively. The predominant carotenoid among the compounds identified in the whole fruit was β-carotene. Ten volatile compounds were identified in naranjilla pulp, the predominant being methyl butanoate. The chemical composition of naranjilla cultivated in Costa Rica does not seem to differ from that previously reported in studies at different locations.

**Key words:** *Solanum quitoense* Lam., chemical composition, antioxidants, volatile compounds.

**RESUMEN. Caracterización química, propiedades antioxidantes y constituyentes volátiles de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) cultivada en Costa Rica.** La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) es una fruta nativa de los Andes, cultivada y consumida principalmente en Ecuador, Colombia y América Central. Las principales características de frutas de naranjilla maduras cultivadas en Costa Rica fueron evaluadas, incluyendo contenido de azúcares, acidez titulable total, sólidos solubles totales, capacidad de absorbancia de radicales de oxígeno (H-ORAC) y contenido de polifenoles totales y ácido ascórbico. La identificación de carotenoides y compuestos volátiles fue también realizada. Las muestras presentaron contenidos de sacarosa, glucosa y fructosa de  $1.6 \pm 0.3$ ,  $0.68 \pm 0.05$  y  $0.7 \pm 0.1$  g/100 g, respectivamente. La acidez titulable total fue  $2.63 \pm 0.07$  g equivalentes de ácido cítrico / 100 g y los sólidos solubles totales fueron  $9.1 \pm 0.5$  °Brix. El valor de H-ORAC fue  $17 \pm 1$  µmol equivalentes de Trolox / g, el contenido de polifenoles totales fue  $48 \pm 3$  mg equivalentes de ácido gálico / 100 g y el contenido de ácido ascórbico fue  $12.5 \pm 0.0$  mg/100 g. El contenido de carotenoides de la fruta completa y la pulpa fue  $33.3 \pm 0.6$  y  $7.2 \pm 0.3$  µg/g, respectivamente. El carotenoide predominante en los compuestos identificados en las frutas completas fue β-caroteno. Diez compuestos volátiles fueron identificados en la pulpa de naranjilla, siendo el predominante el butanoato de metilo. La composición química de naranjilla cultivada en Costa Rica aparenta no diferir de aquella reportada previamente en estudios realizados en lugares diferentes.

**Palabras clave:** *Solanum quitoense* Lam., composición química, antioxidantes, compuestos volátiles.

### INTRODUCTION

Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) is a native fruit of the Andes, cultivated and consumed mainly in Ecuador, Colombia, and Central America. The tree grows best between 1200 and 2300 m above sea level (m asl); it is neither a tropical nor a temperate plant (1). The fruit is round and its peel is covered with brittle hairs. During ripening, naranjilla turns from green to orange, and the fruit is climacteric, with a relatively low respiration rate even during the climacteric peak (2). Even though the fruit is sometimes consumed and pro-

cessed at earlier stages of maturity (due to the pulp's attractive greenish color), total soluble solids increase with maturity, which results in a sweeter pulp at later stages. The pH does not vary significantly with maturation (3).

The fruit contains four compartments separated by membranous partitions and filled with pulp, which has a somewhat acidic flavor and a pleasant delicate aroma. It has numerous flat and hard seeds. The flavor of naranjilla has been described as sweet, similar to a mixture of banana, pineapple, and strawberry (4).

According to Heiser and Anderson (1), naranjilla trees

were introduced over a half century ago to Costa Rica. Current estimates indicate about 30-50 ha cultivated with the crop. Fruits are usually sold fresh in local markets and supermarkets and are used to produce beverages, with the addition of water and sugar. As for processed products, naranjilla jam may be the only currently produced in commercial quantity in Costa Rica.

Despite the fact that naranjilla pulp is mostly consumed in Latin America, either in fresh form or as a sweetened drink, authors agree that the fruit has high potential as an ingredient for products such as juices, nectars, ice creams, candies, jams, jellies, toppings, sherbets, sauces, and other cooked confections (5, 6). The pulp's green color may be an advantage for the food industry, but it should be protected from oxidation so it does not turn brown that quickly.

Since ripe naranjilla fruits are highly susceptible to mechanical damage and fungal attack, fruits are usually harvested green, but when they reach physical maturity. Therefore, fruits are more easily managed and marketed for a longer time. It should be considered that fruits harvested at later maturity stages show better quality characteristics when ripe than those harvested at earlier stages (3). At ambient temperature, the shelf life of physiologically mature fruits is only 6-8 d long after harvest (2, 5). Arango *et al* (2) recommended several postharvest handling systems for naranjilla and concluded that fruits at physiological maturity can be maintained green for 50 d when packed inside polyethylene bags with an ethylene absorber and refrigerated at 7.5°C. Morton (5) indicated that fruits picked half-colored can be stored for 1 or 2 mo at 7.22-10°C and relative humidity of 70-80%.

As for volatile constituents of naranjilla, Brunke *et al* (4) used gas chromatography / mass spectrometry analysis and sensory evaluation with a gas chromatographic sniffing detector to identify components and determine their influence on the flavor of the fruit. It was determined that the methyl and ethyl esters of lower carboxylic acids contributed much to the typical naranjilla flavor, but it was not possible to find one or more impact compounds, which made researchers suspect that the yet unidentified substances that possess strong odors play an important role in the flavor complex of the fruit. Osorio *et al* (7) concluded that glycosides isolated from *Solanum quitoense* leaves have a role as flavor precursors because they produce several volatile compounds with pleasant sensorial notes by the action of some enzymes present in the fruit. These generated volatile compounds may be important with respect not only to the fruit flavor but also to the flavor of the processed products because they would be released during processing. In a different study, with the aid of multilayer coil countercurrent chromatography, subsequent acetylation, and liquid chromatographic purification of a glycosidic mixture obtained from *S. quitoense* leaves, three C13-norisoprenoid glucoconjugates were isolated by Osorio *et al* (8) in pure form.

There is great similarity between *S. quitoense* L. and *S. vestissimum* D. with regard to both the shape of the plant and the aspect of the fruit. However, aromas are rather different. Authors have extensively studied the volatile constituents of the second fruit (9), glycosidically bound aroma compounds from its pulp and peelings (10), change in volatile compounds during maturation (11), and volatile constituents from its peelings (12).

The characterization of naranjilla cultivated in Costa Rica, in terms of chemical composition, antioxidant properties, and volatile constituents will be critical in increasing this crop's value in local and regional markets, as a fresh fruit and as raw material for processed products.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Fully mature naranjilla fruits were harvested from several trees in a plantation located in Heredia, Costa Rica (Helénica Proverde S.A.). The agroecological characteristics are as follows: geographical position 10° 01' 59" N, 84° 02' 41" E; soil of volcanic origin; altitude, 1360 m asl; annual average precipitation, 2479.7 mm; annual average temperature, 18.7°C; and annual average relative moisture, 87%. Fruits were manually sorted for physical and microbiological damage and then cleaned, washed, and sanitized by immersion for 3 min in a 150-ppm solution of sodium hypochlorite. Only ripe fruits (75-100% orange color in peel) were analyzed.

### Methods of analysis

Analyses were conducted on four separate fruit lots (obtained from the same location but on different dates). Fruits were cut in halves and pulp was extracted by using an industrial finisher with a 1.5-mm sieve. After the pulp was obtained, one part was taken for moisture, total titratable acidity, pH, total soluble solid, and color analyses. The rest of the pulp was immediately frozen by immersion in liquid nitrogen, and a portion was used to determine total polyphenolic content. The remainder was then freeze-dried and stored at -20°C in laminated bags until further analyses. For carotenoid and volatile compound analyses, whole fruits from two of the four lots were frozen until analyses.

Moisture, ash, protein, dietary fiber, total titratable acidity (expressed as citric acid equivalent) and pH were determined using standard AOAC methods (13). Fat content was determined using the Soxhlet method (ether extraction) (14). Available carbohydrate content was determined by difference, from moisture, ash, protein, fat, dietary fiber, and total titratable acidity analyses. Total sugars (sucrose, glucose, and fructose) were determined using a Shimadzu LC-6A high-performance liquid chromatography (HPLC) system, equipped with an Alltech Econosphere NH<sub>2</sub> column with a mixture of

acetonitrile and bidistilled water for the mobile phase. Energy content was calculated using the general factors of 4, 4, and 9 calories per g of protein, carbohydrate, and fat, respectively (15). Color was measured with a HunterLab ColorFlex CX1192 colorimeter.

Antioxidant capacity was measured in terms of hydrophilic oxygen radical absorbance capacity (H-ORAC), following the method described by Ou *et al* (16) and adapted for manual determination by Vaillant *et al* (17), expressing results as  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalent / g. Total polyphenolic compounds were determined by using a modified Folin-Ciocalteu assay described by Georgé *et al* (18) with gallic acid as standard and expressing the results as mg gallic acid equivalent / 100 g, after corrections for interfering substances. By the same methodology, ascorbic acid content was determined (using an ascorbic acid standard) and results were expressed in terms of mg ascorbic acid/100 g (18).

For total carotenoid analyses, frozen fruits were thawed and contents were assessed on the whole fruit (pulp and peel), pulp, and seedless juice. Homogenized samples were mixed with acetone for extraction of carotenoids. The liquid was then filtered and concentrated, and the carotenoids were extracted with ethylic ether/n-hexane (50/50, v/v). The organic phase was dried under a nitrogen flow, and the remnant was dissolved in ethylic ether and saponified by mixing with potassium hydroxide. The organic phase was separated and the aqueous phase was extracted again with ethylic ether/n-hexane (50/50, v/v). The total organic phase was mixed with a sodium chloride solution to eliminate alkali, and then separated and dried under a nitrogen flow. A precise amount of n-hexane was added to a portion of the remnant and absorbance was read at 450 nm with a UV-1700 Shimadzu UV-visible spectrophotometer. Total content of carotenoids was estimated by using the extinction coefficient of  $\beta$ -carotene at a 1% concentration in n-hexane (2500). The same sample was used for identification of carotenoids, using a Hewlett Packard 1050 reverse-phase HPLC system coupled to a diode array detector. The HPLC was equipped with a Spherisorb ODS-2 HP (250 mm  $\times$  4 mm  $\times$  5  $\mu\text{m}$ ) column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile, dichloromethane, and methanol (82:13:5); flow rate was set at 1.5 mL / min; and the determination was performed at 20°C. For identification of carotenoids, only whole fruits were analyzed.

To identify the volatile compounds, frozen whole fruits were thawed and aroma compounds were assessed on the seedless pulp. Extracts were obtained by mixing 2 g of pulp with 30 mL of pentane/ether (50/50, v/v) and then homogenizing using a Potter Elvehjem homogenizer for 5 min at room temperature. The organic phase was recovered, dried with anhydrous sodium sulfate, and concentrated at 37°C to 1 mL with a 25-cm Vigreux distillation column (19). GC-MS analysis was used to identify volatile components using a

Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph coupled to a Hewlett-Packard 5973 quadrupole mass spectrometer. The column was a DB-WAX fused silica capillary column (30 m, 0.32 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness), preceded by a 2 m, 0.32 mm i.d. uncoated pre-column. Oven temperature was set at 40°C for 3 min, then increased to 245°C at 3°C/min, and kept at this temperature for 20 min. The on-column injector was heated from 20°C to 245°C at 180°C/min. The detector and injector temperatures were 250°C. Helium was the carrier gas at 1.1 mL / min. The electron impact energy was 70 eV and the ion source and quadrupole temperatures were 230°C and 150°C respectively. Electron impact (EI) mass spectra were recorded in the 40-600 amu range at 1-s intervals. Injection volume was 2  $\mu\text{L}$  of extract. Volatile compounds were identified by comparing their spectra with those of the Wiley 275 and NIST MS libraries.

## RESULTS

The chemical characterization of Costa Rican naranjilla pulp, as well as results found in literature for ripe fruits from Colombia and Ecuador are summarized in Table 1. When comparing results, factors such as sampling, plotting, sample preparation, extraction, and measurement, besides genetic and environmental factors (maturity, UV light exposure, etc.) should be considered. Total antioxidant capacity of naranjilla pulp was measured in terms of H-ORAC (Table 2). Total polyphenolic and ascorbic acid content are reported as well.

Total carotenoid content was determined in naranjilla whole fruits, pulp, and seedless juice (Table 3). Carotenoid identification in naranjilla whole fruits is presented in Table 4, where  $\beta$ -carotene was the main carotenoid found. No carotenoid identification in naranjilla fruit has been previously reported. Using GC-MS analysis, 10 volatile compounds were identified in naranjilla pulp (Table 5). In this study, the predominant aroma constituent found in the fruit's pulp was methyl butanoate, a volatile compound described as sweet and fruity.

## DISCUSSION

### Main characteristics

When compared with the characteristics of naranjilla fruits from Colombia as reported by Arango *et al* (2), Romero (20), and Guzmán *et al* (21), moisture content in the Costa Rican fruits (Table 1) was lower, ash content higher, protein content similar, fat content lower (no fat detected in Costa Rican samples), sugar content higher (sucrose and glucose content higher and fructose content lower compared with samples analyzed by Guzmán *et al* [21]); and total soluble solids lower. Compared with the Ecuadorian fruit characteristics reported by Dávila (22), total soluble solids of Costa Rican fruits were higher, pH was lower, total sugars were higher, and ash con-

tent was higher. Morton (5) reported results of analyses performed on fresh naranjilla fruits in Colombia and Ecuador. When compared with these results, Costa Rican fruits showed

moisture and fiber contents within the reported range, but they had higher protein and ash, and lower fat content.

TABLE 1  
Chemical characterization and color parameters of Costa Rican naranjilla pulp (data expressed on a fresh weight basis and reported as mean  $\pm$  standard deviation, n = 4 lots), and results reported in literature for ripe naranjilla fruits from different locations

Component	Costa Rica	Colombia (2)	Colombia (20)	Colombia (21)	Ecuador (22)	Colombia and Ecuador (5)
Moisture (g / 100 g)	90.6 $\pm$ 0.3	92.2	92.5	91.95	90.67	85.8 - 92.5
Protein (g / 100 g)	0.7 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	0.6	0.72	NR	0.107 - 0.6
Fat (g / 100 g)	ND *	0.0001	0.1	0.16	NR	0.1 - 0.24
Available carbohydrates (g / 100 g)	3.8 $\pm$ 0.5 †	NR †	5.7	NR	NR	5.7
Dietary fiber (g / 100 g)	1.4 $\pm$ 0.2	NR	0.3	0.53	NR	0.3 - 4.6
Sugars (g / 100 g)	3.0 $\pm$ 0.4	2.91 $\pm$ 0.2	NR	2.4	2.51	NR
Sucrose (g / 100 g)	1.6 $\pm$ 0.3	NR	NR	1.08	NR	NR
Glucose (g / 100 g)	0.68 $\pm$ 0.05	NR	NR	0.52	NR	NR
Fructose (g / 100 g)	0.7 $\pm$ 0.1	NR	NR	0.75	NR	NR
Ash (g / 100 g)	0.92 $\pm$ 0.04	0.7	0.8	0.88	0.54	0.61 - 0.8
Energy value (kcal/100 g)	18 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	24	23	NR	NR	23
Total titratable acidity (g citric acid equivalent /100g)	2.63 $\pm$ 0.07	3.65 $\pm$ 0.1	NR	2.30	1.92	NR
pH	3.20 $\pm$ 0.04	3.1 $\pm$ 0.1	NR	3.3	3.3	NR
Total soluble solids ( <sup>o</sup> Brix)	9.1 $\pm$ 0.5	9.5 $\pm$ 0.5	NR	NR	8	NR
Hunter parameter L*	40 $\pm$ 3	NR	NR	NR	NR	NR
Hunter parameter a*	7.8 $\pm$ 1.0	NR	NR	NR	NR	NR
Hunter parameter b*	40 $\pm$ 3	NR	NR	NR	NR	NR

\* ND = not detected. † Determined by calculation. NR = not reported.

TABLE 2

H-ORAC value, total polyphenolic, and ascorbic acid content in naranjilla pulp (data expressed on a fresh weight basis and reported as mean  $\pm$  standard deviation, n = 4 lots except for ascorbic acid: n = 3)

Component	Result
H-ORAC ( $\mu$ mol Trolox equivalent/g)	17 $\pm$ 1
Total polyphenolics (mg gallic acid equivalent/100 g)	48 $\pm$ 3
Ascorbic acid (mg/100 g)	12.5 $\pm$ 0.0

TABLE 3

Total carotenoid content of naranjilla whole fruits, pulp, and seedless juice (data expressed on a fresh weight basis and reported as mean  $\pm$  standard deviation, n = 2 lots)

Sample	Carotenoid content ( $\mu$ g / g)
Whole fruits	33.3 $\pm$ 0.6
Pulp	7.2 $\pm$ 0.3
Seedless juice	4.60 $\pm$ 0.08

TABLE 4  
Carotenoid identification in naranjilla whole fruits

Carotenoid	Retention time (min)	Proportion of identified carotenoids (%)
$\beta$ -carotene	10.1	58.4
Lutein	3.4	32.2
Cis- $\beta$ -carotene	11.0	6.1
Violaxanthin	2.2	3.2

### Antioxidant properties

The H-ORAC value of naranjilla was higher than those of banana, cantaloupe, honeydew, kiwi fruit, nectarine, pineapple, and watermelon (among others); similar to those of red grapefruit, navel orange, peach, pears, and tangerine; but lower than those of apples, cherry, plums, and all berries (Wu *et al* [23]). Total polyphenolic content was similar to values found in banana, pineapple, and lemon (24). Ascorbic acid content was lower than values reported by other authors, of 25 (20) and in the range of 31.2-83.7 mg / 100 g (5). Authors have reported contents of total vitamin C of 37.5 (21), 47.5 (22), and 95 mg / 100 g (2) for Colombian and Ecuadorian naranjilla samples.

### Carotenoid content and identification

For Colombian and Ecuadorian naranjilla samples, Morton (5) reported carotene contents of 0.71-2.32  $\mu\text{g} / \text{g}$  and Guzmán *et al* (21) indicated  $\beta$ -carotene content among Colombian naranjilla samples of 2.212  $\mu\text{g} / \text{g}$  (in edible portion). Costa Rican naranjilla seemingly had higher contents. However, total carotenoid content in the edible portion of naranjilla from different locations was lower when compared with fruits with high content (more than 20  $\mu\text{g} / \text{g}$ ), such as grapefruit, papaya, and nectarine (25). Carotenoid content found in the whole naranjilla fruit (pulp and peel) was similar or higher than those found in vegetables with high total carotenoid content, such as kale, red paprika, and parsley (25). Carotenoid content in naranjilla peel was higher than in its pulp, which was noticeable when the colors of both parts were compared. Carotenoid identification in naranjilla whole fruits indicate that  $\beta$ -carotene and lutein, two of five carotenoids on which most nutrition research has focused (26), were predominant.  $\beta$ -carotene, the main carotenoid found in naranjilla, has provitamin A activity and can be converted in the body to retinol (26). Epidemiologic reports suggest that the sum of lutein and zeaxanthin, the retinal carotenoids forming the macular pigment, had the strongest protective effect against neovascular age-related macular degeneration, when dietary intakes of different carotenoids were analyzed (27).

TABLE 5  
Volatile compounds identified in naranjilla pulp

Volatile compound	Proportion of identified volatile compounds (%)	Volatile compounds identified by Brunke <i>et al</i> (4) (area percent in gas chromatograms)	Odor description (28)
Methyl butanoate	54.30	12.1	Sweet, fruity
4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone	13.25	Not found	Not reported
Butanoic acid	8.38	0.4	Sour, reminiscent of rancid butter
Methyl benzoate	5.75	0.3	Pungent, heavy sweet, deep-floral
Ethyl butanoate	4.02	26.7	Fruity, suggestive of banana and pineapple
Methyl hexanoate	3.81	0.4	Sweet, of pineapple-apricot type
Methyl (E)-2-butenate	3.40	0.9	Sharp and green-fruity
Methyl 3-hydroxyhexanoate	2.87	<0.1	Fruity-winey
$\gamma$ hexalactone	2.33	8.2	Herbaceous, sweet, tobacco-like, coumarinic type
2-methyl-2-pentalal	1.90	Not found	Grassy green and fruity

### Volatile compounds

In a previous study, Brunke *et al* (4) identified 59 compounds in a solvent extract (80/20, v/v of ether/pentane) of Ecuadorian naranjilla fruit juice after silica gel flash chromatography. Authors also sensorially characterized compounds by sniffing GC. From the list of compounds that Brunke *et al* (4) identified, with concentrations higher than 0.9% (reported as area percent in gas chromatograms), only ethyl acetate, 3-methylbutyl acetate, ethyl (E)-2-butenolate, ethyl 3-hydroxybutanoate, ethyl 3-hydroxyhexanoate, ethyl 3-acetoxyhexanoate, linalool, and acetic acid were not found in the present study. All of the compounds found in Costa Rican samples were also reported by Brunke *et al* (4), except for 2-methyl-2-pentenal and 4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone.

### CONCLUSION

The chemical characteristics of samples of naranjilla (*S. quitoense* Lam.) fruits cultivated in Costa Rica were analyzed. The fruits exhibited a chemical composition similar to those previously reported in different locations. Information on chemical composition, antioxidant properties, and volatile constituents may increase this crop's value in local and regional markets as a fresh fruit and as raw material for processed products.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M. Torres, J. Bustos, Y. Chan, and E. Murillo for their technical assistance. They are likewise grateful to Helénica Proverde S. A., the French agency AIRE *Développement* (grant no. 01-8-CR-27-2), and Ministerio de Ciencia y Tecnología, Comisión de Incentivos para la Ciencia y la Tecnología, Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT), Fondos PROPYME no. FP-009-04 (San José, Costa Rica) for their valuable financial help.

### REFERENCES

1. Heiser CB, Anderson G. "New" solanums. In: Janick J, editor. Perspectives on new crops and new uses. Virginia: ASHS Press; 1999. p. 379-84.
2. Arango H, Vaillant F, Vélez C, Millan P, Reynes M. Evaluation of post-harvest performance of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) fruits packed under modified atmosphere. *Fruits*. 1999; 54: 261-70.
3. Casierra-Posada F, García EJ, Lüdders P. Determinación del punto óptimo de cosecha en el lulo (*Solanum quitoense* Lam. var. *quitoense* y *septentrionale*). *Agron. Colombiana*. 2004; 22: 32-9.
4. Brunke E-J, Mair P, Hammerschmidt F-J. Volatiles from naranjilla fruit (*Solanum quitoense* Lam.). GC/MS analysis and sensory evaluation using sniffing GC. *J. Agric. Food Chem.* 1989; 37: 746-8.
5. Morton J. Naranjilla. In: Morton JF, editor. Fruits of warm climates. Florida: Creative Resource Systems; 1987. p. 425-8.
6. Santamaria L, Mulrooney RP, Kitto SL. Screening for root-knot nematode response in somaclonal variants of *Solanum quitoense* Lam. *Nematropica*. 2004; 34: 73-82.
7. Osorio C, Duque C, Batista-Viera F. Studies on aroma generation in lulo (*Solanum quitoense*): enzymatic hydrolysis of glycosides from leaves. *Food Chem.* 2003; 81: 333-40.
8. Osorio C, Duque C, Fujimoto Y. C-13-norisoprenoid glucoconjugates from lulo (*Solanum quitoense* L.) leaves. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47: 1641-45.
9. Suárez M, Duque C. Volatile constituents of lulo (*Solanum vestissimum* D.) fruit. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 39: 1498-500.
10. Suárez M, Duque C, Wintoch H, Schreier P. Glycosidically bound aroma compounds from the pulp and the peelings of lulo fruit (*Solanum vestissimum* D.). *J. Agric. Food Chem.* 1991; 39: 1643-5.
11. Suárez M, Duque C. Change in volatile compounds during lulo (*Solanum vestissimum* D.) fruit maturation. *J. Agric. Food Chem.* 1992; 40: 647-9.
12. Suárez M, Duque C, Bicchi C, Wintoch H, Full G, Schreier P. Volatile constituents from the peelings of lulo (*Solanum vestissimum* D.) fruit. *Flavour Fragr. J.* 1993; 8: 215-20.
13. AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Maryland: AOAC International; 1999.
14. Carpenter DE, Ngeh-Ngwainbi J, Lee S. Lipid analysis. In: Sullivan D, Carpenter D, editors. Methods of analysis for nutrition labeling. Virginia: AOAC International; 1993. p. 85-104.
15. Ellefson W. Provisions of the nutrition labeling and education act. In: Sullivan D, Carpenter D, editors. Methods of analysis for nutrition labeling. Virginia: AOAC International; 1993. p. 3-26.
16. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 2001; 49: 4619-26.
17. Vaillant F, Pérez A, Dávila I, Dornier M, Reynes M. Colorant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.). *Fruits*. 2005; 60: 3-12.
18. Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53: 1370-3.
19. Brat P, Rega B, Alter P, Reynes M, Brillouet JM. Distribution of volatile compounds in the pulp, cloud, and serum of freshly squeezed orange juice. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 3442-7.
20. Romero Castañeda R. Frutas silvestres de Colombia. Bogotá: Editorial San Juan Eudes; 1961.
21. Guzmán R, De Villaveces MC, De Clavijo E. Estudio de la composición química del lulo (*Solanum quitoense* Lam.) y obtención de un producto comercial a partir de este fruto. *Frutas Trop. Bol. Informativo*. 1977: 59-69.
22. Dávila J. Industrialización de la naranjilla. *Politécnica*. 1982; 7: 137-58.

23. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.* 2004; 52: 4026-37.
24. Brat P, Georgé S, Bellamy A, Du Chaffaut L, Scalbert A, Mennen L, et al. Daily polyphenol intake in France from fruit and vegetables. *J. Nutr.* 2006; 136: 2368-73.
25. Müller H. Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A.* 1997; 204: 88-94.
26. Holden JM, Eldridge AL, Beecher GR, Buzzard IM, Bhagwat S, Davis CS, et al. Carotenoid content of US foods: an update of the database. *J. Food Comp. Anal.* 1999; 12: 169-96.
27. Snodderly DM. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995; 62: 1448S-61S.
28. Arctander S. *Perfume and Flavor Chemicals (Aroma Chemicals), I & II.* New Jersey: Montclair; 1969.

Recibido: 30-09-2008

Aceptado: 15-01-2009

## Contenido de sulforafano (*1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano*) en vegetales crucíferos

*Olga N. Campas-Baypoli, Carolina Bueno-Solano, Diana M. Martínez-Ibarra, Francisco Camacho-Gil, Alma G. Villa-Lerma, Jesús R. Rodríguez-Núñez, Jaime López-Cervantes, Dalia I. Sánchez-Machado*

Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, México

**RESUMEN.** El sulforafano es un isotiocianato con propiedades antimicrobianas y anticarcinogénicas, se encuentra en una amplia variedad de vegetales del género *Brassica oleracea*, considerándose las más importantes el brócoli y repollo. El objetivo de esta investigación fue cuantificar sulforafano en las partes comestibles de brócoli y en hojas de repollo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La preparación de la muestra para la cuantificación del sulforafano incluye la conversión de glucorafanina a sulforafano ( $45 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 2,5 h), extracción con diclorometano, purificación del extracto en columnas de extracción de fase sólida, y detección por HPLC-UV. En brócoli la concentración de sulforafano está en el rango de  $214 \mu\text{g/g}$  bs (tallos) a  $499 \mu\text{g/g}$  bs (inflorescencias). El repollo morado ( $101,99 \mu\text{g/g}$  bs) presentó valores mayores de sulforafano que el repollo verde ( $7,58 \mu\text{g/g}$  bs). Las inflorescencias de brócoli y las hojas de repollo morado son ricas en sulforafano.  
**Palabras clave:** Sulforafano, glucorafanina, brócoli, repollo, HPLC.

**SUMMARY.** Sulforaphane (*1-isothiocyanato-4-(methylsulfinyl)-butane*) content in cruciferous vegetables. Sulforaphane is an isothiocyanate which has antimicrobial and anticarcinogenic properties, this compound is found in a wide variety of plants from genus *Brassica oleracea*, being the most important broccoli and cabbage. The objective of this research was to quantify sulforaphane in the edible parts of broccoli and cabbage leaves by high-performance liquid chromatography (HPLC). Sample preparation for the quantification of sulforaphane include the conversion of glucoraphanin to sulforaphane ( $45 \pm 2^\circ\text{C}$  for 2.5 h), extracted with dichloromethane, purification of the extract in columns of solid phase extraction and detection by HPLC-UV. Sulforaphane concentration in broccoli is in the range of  $214 \mu\text{g/g}$  DW (stems) to  $499 \mu\text{g/g}$  DW (inflorescences). The purple cabbage ( $101.99 \mu\text{g/g}$  DW) has values greater than the green cabbage ( $7.58 \mu\text{g/g}$  DW). The inflorescences of broccoli and red cabbage leaves are rich in sulforaphane.  
**Key words:** Sulforaphane, glucoraphanin, broccoli, cabbage, HPLC.

### INTRODUCCION

Las plantas del orden *Brassicales* y de la familia *Cruciferae* o *Brassicaceae* comprenden alrededor de 350 géneros y más de 2000 especies, entre ellas se incluyen algunas plantas de interés comercial como la col (repollo), coliflor, coles de Bruselas y brócoli (1). Otros cultivos de esta familia son los rábanos, mostaza silvestre y numerosas hierbas de jardín (2), los cuales se utilizan para preparar condimentos o guarniciones, pero su aportación de nutrientes a la dieta es mínima. En cambio las crucíferas que se consumen como verduras son una fuente concentrada de nutrientes como vitaminas, minerales, fibra dietética, además de sustancias quimioprotectoras como los glucosinolatos y flavonoides (3,4).

Una característica de las plantas crucíferas es la síntesis de compuestos ricos en azufre, como los glucosinolatos (5).

Estos vegetales y algunas plantas comestibles del orden *Caparrales* son la fuente de todos los glucosinolatos de la dieta humana. Se han identificado más de 100 compuestos diferentes, los cuales se encuentran distribuidos en toda la planta, aunque su concentración depende del tipo de tejido (6). Los glucosinolatos se clasifican como S-glucósidos, ya que son el resultado del enlace de un azúcar reductor y el azufre de una molécula que no tiene carácter de hidrato de carbono (conocida como aglucona), estos compuestos son no volátiles y carecen de fragancia (7). Los glucosinolatos se sintetizan y almacenan en las plantas como precursores relativamente estables de los isotiocianatos. Los glucosinolatos son solubles en agua debido a que la molécula de glucosa imparte características hidrofílicas a diferencia de los isotiocianatos que presentan propiedades hidrofóbicas (8).

Los glucosinolatos se hidrolizan cuando el tejido del vegetal se rompe a consecuencia de un daño mecánico, entonces la enzima tioglucosidasa (E.C. 3.2.3.1.) o mirosinasa se pone en contacto con el sustrato y libera moléculas de glucosa, de bisulfato y de la correspondiente aglucona; posteriormente, esta última experimenta un acomodo

---

Esta investigación forma parte del proyecto no. 66073 financiado con Fondos Mixtos del Gobierno del Estado de Sonora y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (FOMIX-CONACYT) en colaboración con el Sr. Antonio Gándara Astiazarán.

intramolecular que genera isotiocianatos, nitrilos, metilisotiocianatos, metilnitrilos y tiocianatos (todos de bajo peso molecular), los cuales son responsables del aroma y olor típico de estos productos (9,10). Los glucosinolatos intactos tienen actividad biológica limitada, pero aumentan su actividad cuando son hidrolizados a isotiocianatos (5).

El brócoli es la principal fuente natural del isotiocianato sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano), su precursor glucorafanina constituye más del 80 % de los glucosinolatos totales presentes en este vegetal (11). Las prácticas de cultivo, condiciones de almacenamiento y la preparación del alimento tienen un impacto potencial en el contenido de glucosinolatos. Por ello, estos factores pueden cambiar la proporción de formación del sulforafano en brócoli. También se ha reportado que el pH durante la hidrólisis tiene influencia en la actividad de la mirosinasa y en la cantidad de sulforafano nitrilo formado durante el rompimiento del tejido del brócoli (12). El sulforafano se considera un potente inductor de la detoxificación de sustancias potencialmente carcinogénicas (13,14), debido a que aumentan su solubilidad lo cual facilita su excreción (15). Este compuesto ha comprobado ser una poderosa estrategia en contra del proceso de carcinogénesis, mutagénesis y otras formas reactivas del oxígeno (16).

Actualmente los métodos cromatográficos son utilizados para la cuantificación de sulforafano, entre los cuales destacan la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La utilización de HPLC presenta ventajas en cuanto a su sensibilidad, su fácil adaptación, su capacidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles (17,18). El sulforafano se ha cuantificado por HPLC en germinados de semillas de brócoli (19), en extractos de semillas de brócoli (20), en brócoli y repollo frescos (21), los métodos publicados presentan variaciones importantes en la conversión de glucorafanina a sulforafano, además utilizan altos volúmenes de solventes para la extracción del analito. En el presente trabajo se realizó la cuantificación de sulforafano por HPLC en brócoli y repollo frescos recolectados en el comercio local. También se comparó el contenido de sulforafano en las diversas partes del brócoli, y en repollos verdes y morados.

## MATERIALES Y METODOS

### Estándar y reactivos

El estándar de sulforafano y acetonitrilo grado HPLC fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y metanol grado HPLC fueron de EMD Chemicals Inc. (Darmstadt, Germany). El acetato de etilo y las columnas de 3 ml Bakerbond SPE silica gel (SiOH) se adquirieron en J.T. Baker S.A. (Xalostoc, México). El ácido clorhídrico fue de Productos Químicos Monterrey (Monterrey, Nuevo León México). El pH del agua ácida se ajustó utilizando

una solución de ácido clorhídrico 0.1 N

### Material vegetal

Se utilizaron muestras frescas de brócoli (*Brassica oleracea L. var. italica*) y repollos verdes y morados (*Brassica oleracea L. var. capitata*) procedentes del mercado de abasto de Cd. Obregón, Sonora, México. Todas las muestras se lavaron con agua corriente para eliminar las partículas de tierra, se eliminó el exceso de humedad y se procedió a su preparación. De las cabezas de brócoli se separaron las inflorescencias, hojas y tallos, y de los repollos fueron separadas hojas externas e internas. Todas las muestras se trituraron y homogenizaron utilizando una batidora de inmersión (Oster, modelo 2616, Sunbeam Mexicana) y después se maceraron en un mortero, finalmente se realizó la extracción del sulforafano.

### Determinación de humedad

El contenido de humedad se determinó por secado en estufa de convección a 70 °C hasta peso constante (22). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado en las muestras trituradas.

### Preparación de las muestras

**Conversión de glucorafanina a sulforafano.** Se pesaron las muestras (1 g de brócoli ó 4 g de hojas de repollo) en vasos de precipitados de 50 ml, se adicionaron 4 ml de agua ácida, y se incubaron a  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  en baño de agua durante 2,5 horas. Al final de la incubación debe asegurarse la eliminación del agua (se evaporó hasta aproximadamente el 70% del peso inicial de la muestra-agua ácida).

**Extracción de sulforafano con diclorometano.** El sulforafano fue extraído del residuo utilizando 20 ml de diclorometano por sonicación durante 1 minuto; después se reposó 1 hora a 25 °C. El extracto se filtró en papel Whatman No.41, realizando 2 lavados con 3 ml de diclorometano.

**Purificación en columna SPE.** El extracto orgánico obtenido en la etapa anterior se purificó en un cartucho de 3 ml SPE (SiOH) de acuerdo al método de Bertelli et al (23). El cartucho se activó pasando 3 ml de diclorometano, luego se pasó todo el extracto orgánico. A continuación se enjuagó el cartucho con 3 ml de acetato de etilo para eliminar las impurezas. Para eluir el sulforafano se pasaron 3 ml de metanol. La solución colectada se secó en estufa de vacío a 45 °C (se requirieron en aproximadamente 2 horas). El residuo se disolvió con 2 ml de acetonitrilo por sonicación durante 30 segundos, y el extracto se filtró a través de una membrana de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$ . Finalmente, se inyectaron 20  $\mu\text{l}$  en la columna del HPLC.

### Equipo y condiciones cromatográficas

Se utilizó un sistema HPLC (GBC, Dandenog, Australia) equipado con autoinyector LC1650, desgasificador de solventes en línea LC1460, software para el análisis de los datos WinChrom, bomba LC1150, termostato para columna LC1150, detector de arreglo de diodos LC5100 y una columna analítica (250 mm X4,6 mm d.i.) SS-Exil ODS C18 con un tamaño de partícula de 5  $\mu$ m (SGE, Dandenong, Victoria, Australia). Las condiciones HPLC fueron las siguientes: fase móvil acetoneitrilo:agua en proporción 30:70 (v/v). La velocidad del flujo fue constante a 0.6 ml/min y la temperatura de la columna fue de 36°C. La detección se realizó por ultravioleta a 202 nm. Se utilizó un gradiente isocrático, el tiempo total entre inyecciones fue de 20 min.

### Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  DS (desviación estándar). Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 11.0 para Windows (SPSS Inc. Chicago, IL).

## RESULTADOS

### Identificación y cuantificación de sulforafano

La identificación del sulforafano se realizó comparando los tiempos de retención del pico del estándar de sulforafano y con el de la muestra, así como a su espectro UV obtenido de un barrido de longitudes de onda ( $\lambda$ ) de 190 a 300 nm, considerándose la  $\lambda$  de 202 nm como la óptima para registrar las áreas de los picos. La curva de calibración se generó a partir de seis concentraciones diferentes del estándar de sulforafano en el rango de 4 a 64  $\mu$ g/ml. La ecuación obtenida al graficar la concentración y el área de los picos ( $y = 72443,2x - 9072,6$ ) presenta una adecuada relación entre las variables de la curva expresada como coeficiente de determinación ( $r^2 = 1$ ). Durante el análisis de las muestras simultáneamente se analizó un estándar de sulforafano.

### Contenido de humedad

En la Tabla 1 se presenta el contenido de humedad para las muestras de brócoli y repollo crudos. Estos vegetales presentaron elevado contenido de agua, con un rango de 85,42 a 91,44 g/100 g. En general, las inflorescencias presentaron los niveles más bajos de humedad.

### Contenido de sulforafano en brócoli

En la Tabla 2 se presenta el contenido de sulforafano en las muestras de inflorescencias, tallos, hojas y cabeza entera de brócoli, la cabeza entera fue una mezcla de las tres fracciones anteriores. Los valores promedio varían de 499 (inflorescencias) a 214  $\mu$ g/g bs (tallos). La cabeza entera presentó un contenido promedio de 246,21  $\mu$ g/g bs de sulforafano. En general el contenido de sulforafano es muy

variable entre las fracciones de brócoli analizadas aun cuando todas las muestras fueron compradas el mismo día en un sitio de venta seleccionado con la finalidad de asegurar, en lo posible, condiciones semejantes de manipulación y anaquel. Solo una cabeza de brócoli presentó contenido bajo de sulforafano en todas las fracciones con un rango entre 108,82  $\mu$ g/g bs a 239,04  $\mu$ g/g bs, lo cual se podría atribuir a que esta muestra mostró mayor madurez y ligeros signos de flacidez.

TABLA 1  
Contenido de humedad de brócoli y repollo

Muestra	Humedad (g /100 g)
Brócoli:	
Inflorescencia	85,42 $\pm$ 0,87
Tallo	91,44 $\pm$ 0,48
Hoja	88,35 $\pm$ 0,44
Integral	90,10 $\pm$ 1,00
Repollo:	
Morado	91,37 $\pm$ 0,62
Verde	91,40 $\pm$ 1,85

TABLA 2  
Contenido de sulforafano ( $\mu$ g/g peso seco) en brócoli

Cabeza	Inflorescencia	Tallo	Hoja	Cabeza entera
1	448,35	250,58	313,91	195,30
2	513,69	202,33	495,86	267,28
3	218,93	154,43	239,04	108,82
4	634,02	234,62	430,71	297,68
5	683,27	231,82	437,50	359,02
Promedio	499,65 $\pm$ 183	214,75 $\pm$ 38	383,40 $\pm$ 104	246,21 $\pm$ 97

### Contenido de sulforafano en repollo morado y verde

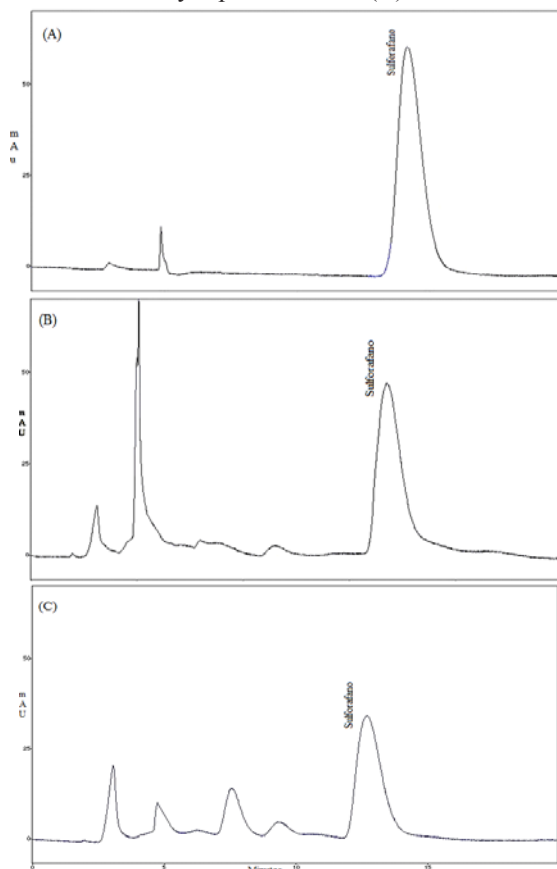
Para cuantificar sulforafano en estos vegetales se realizaron ensayos preliminares para optimizar el tamaño de muestra, además previamente al análisis las cabezas de repollo fueron clasificadas por su tamaño (muestra 1, diámetro menor y muestra 5, diámetro mayor). En la Tabla 3 se muestra el contenido de sulforafano en repollo verde y morado. Se puede observar que el repollo morado contiene en promedio aproximadamente 13 veces más sulforafano que el repollo verde. Además, la concentración varía entre las hojas internas y externas, para ambos tipos de repollo. En la muestra de mayor diámetro del repollo verde no se detectó sulforafano, lo cual podría estar relacionado con el grado de madurez del vegetal.

TABLA 3  
Contenido de sulforafano ( $\mu\text{g/g}$  peso seco) en repollo

Cabeza	Repollo morado		Repollo verde	
	Hojas Internas	Hojas externas	Hojas Internas	Hojas externas
1	65,17	71,17	9,90	18,45
2	99,30	139,28	7,11	2,57
3	170,51	97,67	8,27	5,92
4	60,39	97,08	5,82	2,94
5	114,62	119,62	No detectado	No detectado
Promedio	101,99 $\pm$ 44	104,96 $\pm$ 26	7,78 $\pm$ 1,7	7,47 $\pm$ 7,5

En la Figura 1 se presentan los cromatogramas obtenidos de la solución estándar de sulforafano, una muestra de inflorescencias de brócoli y una de repollo. Además, es importante mencionar que en el presente trabajo se realizaron ensayos para cuantificar sulforafano en coliflor (*Brassica oleracea L. var. botrytis*), sin embargo en las muestras analizadas no se logró detectar el compuesto.

FIGURA 1  
Cromatogramas HPLC de la solución estándar de sulforafano (A), inflorescencias de brócoli (B) y repollo morado (C)



## DISCUSION

Los resultados de humedad obtenidos para todas las fracciones analizadas (brócoli y repollo) son similares a los reportados en la base de datos de la USDA (24). Por su alto contenido de humedad el brócoli y repollo son alimentos perecederos, característica que favorece el desarrollo de microorganismos, las reacciones de oxidación (enzimáticas y no enzimáticas) afectando la calidad nutricional y organoléptica en periodos cortos (3).

El brócoli es la principal fuente natural de sulforafano, su precursor glucorafanina constituye entre el 81-88 % de los glucosinolatos totales de este vegetal (11). Se ha reportado que entre las diferentes partes de la planta existen variaciones en el contenido de glucosinolatos (precursores de los isotiocianatos) dependiendo del tejido analizado (6,21), esto se observó en las fracciones de brócoli analizadas. Chiang et al (25) cuantificaron sulforafano por cromatografía de gases en diferentes variedades de brócoli encontrando un rango de 1885 a 3703  $\mu\text{g/g}$  base seca, estos resultados son de 4 a 7 veces más altos que los obtenidos en el presente estudio, lo cual puede atribuirse a variaciones intrínsecas de la muestra (brócoli recolectado en el campo) y del método utilizado para la determinación. Respecto a la cuantificación de sulforafano en brócoli fresco por HPLC los resultados obtenidos en el presente estudio son mayores (comparación en peso fresco) a los reportados por Bertelli et al (23) y Liang et al (21). Asimismo, Nakawaga et al (19) reportaron resultados similares a los obtenidos en el presente estudio en brócoli maduro (inflorescencias, 691  $\mu\text{g/g}$  base seca). En general, las diferencias obtenidas en la concentración de sulforafano en este estudio respecto a los valores reportados por otros autores, se pueden deber principalmente a factores como la variedad, condiciones de cultivo, clima, prácticas agronómicas, condiciones de manejo y almacenamiento postcosecha los cuales son determinantes en la concentración de glucosinolatos/isotiocianatos en los vegetales (11,26,27).

Es importante mencionar que existen diferencias en el perfil de glucosinolatos entre las plantas de la familia de las crucíferas, incluso entre las que pertenecen a la misma variedad. Oerlemans et al (28) reportaron en repollo morado al precursor de sulforafano (glucorafanina) como el glucosinolato predominante en este vegetal, a esto se pueden atribuir las concentraciones más altas encontradas en repollo morado en este estudio. En el caso del repollo blanco Fuller et al (29) encontró que la sinigrina (precursor del alilisotiocianato) es el glucosinolato más abundante y en el menor nivel la glucorafanina (precursor del sulforafano). Además Liang et al (21) estudiaron el contenido de sulforafano en diferentes variedades de repollo encontrando valores de 0.7 a 5.3  $\mu\text{g/g}$  base húmeda, estos valores son mayores que los obtenidos en este estudio en repollo verde y menores a los

valores de repollo morado. Las variaciones encontradas en el contenido de sulforafano en repollo respecto a los reportados en otras investigaciones pueden deberse a variabilidad en las muestras, así como del método experimental utilizado.

### CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio demuestran que el contenido de sulforafano en los vegetales de la familia de las crucíferas, tales como el brócoli y repollo frescos, es variable con relación a la parte de la planta analizada, la madurez y las características intrínsecas del vegetal. Las inflorescencias son la principal fuente de sulforafano en brócoli, mientras que el repollo morado presentó niveles significativos de sulforafano considerando que este vegetal generalmente se consume sin cocción. Por lo anterior, se recomienda el consumo de las partes comestibles del brócoli y repollo morado en su forma fresca, con la finalidad de aprovechar las propiedades quimioprotectoras del fitoquímico sulforafano.

### AGRADECIMIENTOS

Esta investigación forma parte del proyecto no. 66073 financiado con Fondos Mixtos del Gobierno del Estado de Sonora y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (FOMIX-CONACYT) en colaboración con el Sr. Antonio Gándara Astiazarán.

### REFERENCIAS

- Ornoz M, Roaro D, Rodríguez I. Tratado elemental de Botánica. 15ta ed. México DF: Ed. ECLALSA; 1983. p. 663-664.
- Rost T, Barbour M, Thornton R, Weier T, Stocking C. Botánica, introducción a la biología vegetal. 2da ed. México DF: LIMUSA; 1985. p. 385.
- Delaquis P, Mazza G. Productos funcionales en las verduras. En: Mazza, G. Alimentos funcionales aspectos bioquímicos y de procesado. 2nd ed. Zaragoza, España: Acirbia SA; 2000. p. 200-204
- Arala LH, Clavijo RC, Herrera C. Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. ALAN 2006; 56(4): 361-365
- Nafisi M, Sonderby IE, Hansen BG, Geu-Flores F, Nour-Eldin HH, Norholm MHH, Jensen NB, Li J, Halkier BA. Cytochromes P450 in the biosynthesis of glucosinolates and indole alkaloids. Phytochem Rev 2006; 5(2-3): 331-346.
- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. Antioxidantes de los alimentos, aplicaciones prácticas. 1ra ed. Zaragoza España: Acirbia SA; 2001. p. 111-112.
- Lampe JW. Spicing up a vegetarian diet: chemopreventive effects of phytochemicals. Am J Clin Nutr 2003; 78 (Suppl): 579S-583S.
- Fahey JW, Zhang Y, Talalay P. Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94 (19): 10367-10372.
- Valdés MSE. Hidratos de Carbono. En: Badui SD. Química de los Alimentos. 4ta ed. México D.F: Pearson Educación; 2006. p. 41-46.
- Liang H, Yuan QP, Xiao Q. Purification of sulforaphane from Brassica oleracea seed meal using low-pressure column chromatography. J Chromatogr B 2005; 828 (1-2), 91-96.
- Van Eylen D, Bellostas N, Strobel BW, Oey I, Hendrickx M, Van Loey A, Sørensen H, Sørensen JC. Influence of pressure/temperature treatments on glucosinolate conversion in broccoli (Brassica oleracea L. cv Italica) heads. Food Chem 2009; 112(3): 646-653.
- Matusheski NV, Jeffery HE. Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane Nitrile. J Agric Food Chem 2001; 49(12):5743-5749
- Zhang Y, Talalay P, Cho Ch, Posner, GH. A major inducer of carcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. Med Sci 1992; 89(6): 2399-2403.
- Zhang Y, Callaway EC. High cellular accumulation of sulphoraphane, a dietary anticarcinogen is followed by rapid transporter-mediated export as a glutathione conjugate. Biochem J 2002; 364(Pt 1): 301-307.
- Mckee T, Mckee JR. Biochemistry: the molecular basis of life. 3rd. ed. Boston: Mc Graw-Hill companies; 2003. p. 559-566.
- Talalay P, Fahey JW. Phytochemicals from cruciferous plants protect against Cancer by modulating carcinogen metabolism. American Institute for Cancer Research 11th Annual Research Conference on Diet, Nutrition and Cancer. American Society for Nutritional Sciences. 2001.
- Skoog D, Holler FJ, Nieman TA. Principios de análisis instrumental. 5ta ed. España: Mc Graw-Hill; 2001.p. 731-786.
- Miller D. Química de alimentos, manual de laboratorio. México, D.F: Limusa Wiley; 2006. p. 157-164
- Nakagawa K, Umeda T, Higuchi O, Tsuzuki T, Suzuki T, Miyazawa T. 2006. Evaporative Light-Scattering analysis of sulforaphane in broccoli samples: quality of broccoli products regarding sulforaphane contents. J Agric Food Chem 2006; 54(7):2479-2483.
- Liang H, Li C, Yuan Q, Vriesekoop F. Separation and purification of sulforaphane from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high-performance liquid chromatography. J Agric Food Chem 2007; 55(20): 8047-8053.
- Liang H, Yuan QP, Dong HR, Liu YM. Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography. J Food Compos Anal 2006; 19(5): 473-476.
- AOAC. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists 16th ed. Arlington Virginia, USA; 1995.
- Bertelli D, Plessi M, Braghiroli D, Monzani A. Separation by solid phase extraction and quantification by phase reverse HPLC of sulforaphane in broccoli. Food chem 1998; 63(3): 417- 421.
- USDA. United States Department of Agriculture. National Nutrient Database for Standard Reference. Agricultural research Service. 2008.

25. Chiang WCK, Pusateri DJ, Leitz REA. Gas Chromatography/Mass Spectrometry method for the determination of sulforaphane and sulforaphane Nitrile in broccoli. *J Agric Food Chem* 1998; 46(3):1018-1021.
26. Rangkadilok N, Tomkins B, Nicolas ME, Premier RR, Bennett RN, Eagling DR, Taylor P.W. The effect of post-harvest and packaging treatments on glucoraphanin concentration in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). *J Agric Food Chem* 2002; 50(25): 7383-7391.
27. Vallejo F, Tomás-Barberán F, García-Viguera C. Health-promoting compounds in broccoli as influenced by refrigerated transport and retail sale period. *J Agric Food Chem* 2003; 51(10): 3029-3034.
28. Oerlemans K, Barrett MD, Suades CB, Verkerk R, Dekker M. Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage. *Food Chem* 2006; 95(1):19-29.
29. Fuller Z, Louis P, Mihajlovski A, Rungapamestry V, Ratcliffe B, Duncan AJ. Influence of cabbage processing methods and prebiotic manipulation of colonic microflora on glucosinolate breakdown in man. *Brit J Nutr* 2007; 98(2): 364-372.

Recibido: 04-11-2008

Aceptado: 03-12-2008

## Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three apple cultivars

Francilene Gracieli Kunradi Vieira, Graciele da Silva Campelo Borges, Cristiane Copetti, Luciano Valdemiro Gonzaga, Eduardo da Costa Nunes, Roseane Fett

Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina. Florianópolis, SC, Brazil,  
Company of Farming Research and Agricultural Extension of Santa Catarina, São Joaquim, Brazil

**SUMMARY.** The concentration of polyphenolic compounds, such as flavanols and anthocyanins, and the antioxidant activity in apples (*Malus domestica* Borkh) seem to differ with cultivar, maturity stage, environmental conditions and the part of the fruit. In this work, the total phenolic, flavanol and anthocyanin content and antioxidant activity were measured in the flesh, whole fruit and peel from apple cultivars Fuji, Epagri COOP24 and Epagri F5P283 cultivated in Southern Brazil. Total phenolic content assayed by Folin-Ciocalteu method, flavanol by modified p-dimethylaminocinnamaldehyde method, anthocyanin content by pH differential method and antioxidant activity measured using ABTS assay. One-way analysis of variance, Tukey's test and correlation analysis were performed. Within each cultivar, the total phenolic, flavanol and anthocyanin contents and antioxidant activity were highest in the peels, followed by the whole fruit and the flesh. In the peel, whole fruit and flesh the Epagri F5P283 apple had the highest total phenolic contents and the highest total antioxidant activity, while that Epagri COOP24 was highest in flavanols and anthocyanins. Total phenolic content was positively associated with total antioxidant activity in flesh, whole fruit and peel. These results demonstrate that phenolic compounds have a significant contribution to the total antioxidant activity which varies considerably depending of the part of the fruit and of the apple cultivar analyzed.

**Key words:** Antioxidant activity, phenolics, flavanols, anthocyanins, apple.

### INTRODUCTION

Apple (*Malus domestica* Borkh) consumption has been associated with reduced risk of degenerative diseases, such as cancer and cardiovascular diseases (1,2). This association is often attributed to the polyphenolics antioxidants contained in apples, which can protect the human body against oxidative stress by scavenging oxygen free radicals (3). Apples also contain ascorbic acid but explain less than 0.4% of the antioxidant activity, indicating that other factors, such as phenolics, are the main contributors (4). Many studies show that the concentration of phenolic compounds, such as flavanols and anthocyanins in apple differ with cultivar,

**RESUMEN.** Actividad y contenido de polifenoles antioxidantes en fruta entera, pulpa y cáscara de tres cultivares de manzana.

La concentración de compuestos polifenoles, como flavanoles y antocianinas, y la actividad antioxidante en manzanas (*Malus domestica* Borkh) parecen diferir con la cultivar, etapa de madurez, condiciones ambientales y la parte de la fruta. En este trabajo, el contenido de fenoles, flavanoles y antocianinas totales y la actividad antioxidante fueron medidos en fruta entera, pulpa y cáscara de las cultivares de manzana Fuji, Epagri COOP24 y Epagri F5P283 cultivadas en el sur de Brasil. El contenido de fenoles totales se midió con el método Folin-Ciocalteu, flavanoles con el método modificado p-dimetilaminocinnamaldehído, antocianinas con el método de diferencia de pH y actividad antioxidante fue medida aplicando el método ABTS. Se realizó análisis de varianza de un factor, prueba de Tukey y análisis de correlación. Dentro de cada cultivar, el contenido de fenoles, flavanoles y antocianinas totales y la actividad antioxidante fueron más alto en las cáscaras, seguidas por la fruta entera y pulpa. En la cáscara, en la fruta entera y pulpa, manzana Epagri F5P283 presentó el contenido de fenoles totales y actividad antioxidante total más alto, mientras que la Epagri COOP24 presentó valores más alto de flavanoles y antocianinas. El contenido de fenoles totales fue asociado positivamente a actividad antioxidante total en la pulpa, fruta entera y cáscara. Estos resultados demuestran que los compuestos polifenoles tienen una contribución significativa a la actividad antioxidante total, los cuales varían considerablemente de acuerdo al de la fruta y cultivar de manzana analizada.

**Palabras clave:** Actividad antioxidante, fenoles, flavanoles, antocianinas, manzana.

maturity stage, environmental conditions and the part of the fruit (4-6). According to many authors, the content of total phenolic compounds and the antioxidant activity is particularly high in the peel of apples than whole fruit and in the flesh (4-6). These facts suggested that apple peels may possess more bioactivity than the flesh. Interestingly is the real proportion of peel of the apple fruit (based on its weight) to the whole apple quantity, especially as this part of fruit is frequently discarded as a waste product during apple manufacturing or before eating (7).

Several characterization studies of different parts of apple in cultivars grown in the United States (5), Italy (6), Poland (7) and New Zealand (8) have been carried out on the basis

of their phenolic profiles. However, little attention has been given at apple cultivars grown in the Brazil, which constitutes the third largest producer of the South America, participating with about 1.5% of the worldwide production. Therefore, the objective of this study was to compare the total phenolic content, flavanol content, anthocyanin content and antioxidant activity in the whole fruit, flesh and peel from three apple cultivars grown in the Brazil, of which one is commercially important worldwide and two are new selections harvested by Experimental Station of the Agriculture and Animal Husbandry Research Company of the Santa Catarina (known by its Portuguese acronym of EPAGRI). Correlations between the antioxidant activity and total phenolic content were also examined.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, (+)-catechin, 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) diammonium salt (ABTS), *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) and Trolox<sup>®</sup> were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Gallic acid, potassium peroxydisulfate, potassium chloride and sodium acetate trihydrate were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). All other chemicals were of analytical grade.

### Sample preparation and extraction procedure

Fifteen fruits of Fuji and two new selections (Epagri COOP24 and Epagri F5P283) were purchased from orchards of Experimental Station of the EPAGRI (São Joaquim, Santa Catarina State, Brazil). All fruits were harvested under standard ripening conditions. Immediately after harvest the fruits were washed with deionized water, towel dried and frozen at -20°C until preparation of the samples. They were peeled, when necessary, with a legume knife. The flesh, whole fruit (flesh + peel), or peels were obtained from five randomly selected apples in each trial to minimize variation. The flesh was the edible portion of the apple without the peel. The whole fruit was the edible portion of the fruit with the amount of flesh and peel maintained in the same proportions as in the whole apple. The peels were the parts of the apple removed by the legume knife, as a thin layer of apple flesh remained adhered to the peel, the peel can be considered as the epidermic zone of the apples.

Five grams (5 g) of apple-frozen peel, apple flesh or whole apple were extracted at room temperature using a Unique 1400A ultrasonic bath (Unique, São Paulo, Brazil). The extraction was performed with 100 mL 80% acetone solution for 15 min. The samples were centrifuged at 1000 x g for 10 min at 5°C and immediately assays were performed in the supernatant recovered. All extracts were made in triplicate.

### Total phenolic content

The total phenolic contents of the apple samples were measured using a modified colorimetric Folin-Ciocalteu method (9). A volume of 2.5 mL of deionized water and 0.100 mL of a known dilution of the extract were added to a volumetric balloon of 10 mL. Folin-Ciocalteu reagent (0.5 mL) was added to the solution and allowed to react for 5 min. Then, 1.5 mL of 20% sodium carbonate solution was aliquoted into the volumetric balloons, and the mixture was completed at 10 mL with deionized water. The color developed for 120 min, and the absorbance was read at 760 nm using a Hewlett-Packard spectrophotometer model HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK). The measurement was compared to a standard curve of prepared gallic acid solutions (50; 100; 150; 250; 500mg/L) and expressed as milligrams of gallic acid equivalents per 100 g ± Standard Deviation (SD) fresh apple component for the triplicate extracts.

### Total flavanol content

The total flavanol content of the apple samples was estimated using a modified *p*-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA) method (10) with a standard curve prepared with catechin solutions (2; 4; 8; 10; 12mg/L). Apple extracts (1 mL) was introduced into test tube and added 5 mL DMACA solution (0.1% in 1 N HCl in MeOH). The mixture was vortexed and allowed to react at room temperature for 10 min. Following this, the absorbance at 640 nm was read using a Hewlett-Packard spectrophotometer model HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK). The results were expressed as milligrams of catechin equivalents per 100 g ± SD fresh apple component for the triplicate extracts.

### Total anthocyanin content

Monomeric anthocyanin content of the apple peels was measured using a spectrophotometric pH differential protocol (11). The anthocyanin content of the flesh and whole apple were not analyzed, as apple flesh of these cultivars does not contain anthocyanins. The apple peel extracts were mixed thoroughly with 0.025 M potassium chloride pH 1 buffer in 1:10 ratio of extract to buffer. The absorbance of the mixture was then measured at 510 and 700 nm using a Hewlett-Packard spectrophotometer model HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK). The apple peel extracts were then combined similarly with sodium acetate buffer pH 4.5, and the absorbance of these solutions was measured at the same wavelengths. The anthocyanin content was calculated as follows:

$$\text{Total monomeric anthocyanins (mg/100 g of fresh peel)} = A \times MW \times 1000 / (e \times C)$$

where  $A$  is absorbance =  $(A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{515} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$ ; MW is molecular weight for cyanidin 3-glucoside = 449.2;  $e$

is the molar absorptivity of cyanidin 3-glucoside = 26900; and  $C$  is the concentration of the buffer in milligrams per milliliter. Anthocyanin content was expressed as milligrams of cyanidin 3-glucoside equivalents per 100 g of fresh apple peel for the triplicate extracts.

### Total antioxidant activity

The total antioxidant activity of the apple components was evaluated according with the decolorization of the ABTS radical cation (ABTS<sup>+</sup>) as percentage inhibition (12). ABTS was dissolved in water to a 7 mM concentration. ABTS radical cation (ABTS<sup>+</sup>) was produced by reacting ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulfate and allowing the mixture (1:1) to stand in the dark at room temperature for 16 h before use. The ABTS<sup>+</sup> working solution was prepared by dissolving ABTS<sup>+</sup> radicalized solution in ethanol (1:50) to an absorbance of  $0.700 \pm 0.20$  at 734 nm. After addition of 1.0 mL of diluted ABTS<sup>+</sup> solution ( $A_{734nm} = 0.700 \pm 0.020$ ) to 0.01 mL of sample the absorbance reading was taken after of 7 min of reaction using a Hewlett-Packard spectrophotometer model HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK). A standard curve of Trolox (0, 75, 150, 300, 450, 750, 1050  $\mu$ M) was prepared and the percentage inhibition of decolorization calculated as:  $(1 - \text{Absorbance after 7 min of reaction} / \text{Absorbance initial without sample}) \times 100$ . The antioxidant activity of samples were expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity

(TEAC) calculated and expressed using micromoles of Trolox equivalents per 100 g of fresh apple.

### Statistical analysis

All data were reported as mean  $\pm$  standard deviation of three replicates. The results were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were carried out to test any significant differences among the means using STATISTICA 7.0 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Differences among means at 5% level ( $P < 0.05$ ) were considered statistically significant. Correlations between the antioxidant activity and total phenolic content were examined using Pearson correlation.

## RESULTS

The Table 1 shows that the total phenolic contents were higher in the peels within all three apple cultivars, followed by whole fruit and flesh values. The Epagri F5P283 apple had the highest total phenolic contents in all the parts of the fruit.

The total flavanol contents of the peels were also higher than the whole fruit and flesh values for each cultivar and whole fruits contents were significantly higher than that of the flesh except for Epagri F5P283 apple (Table 2). The Epagri COOP24 apple had the highest total flavanol contents in all the parts of the fruit.

TABLE 1  
Total phenolic content (mg gallic acid equivalents/100g) of the flesh, whole fruit and peel of three apple cultivars

Cultivar	Flesh	Whole fruit	Peel
Fuji	140.91 $\pm$ 1.98 <sup>c, C</sup>	167.11 $\pm$ 4.79 <sup>b, C</sup>	577.99 $\pm$ 8.99 <sup>a, B</sup>
Epagri COOP24	172.81 $\pm$ 1.86 <sup>c, B</sup>	180.39 $\pm$ 1.79 <sup>b, B</sup>	569.57 $\pm$ 3.12 <sup>a, B</sup>
Epagri F5P283	215.20 $\pm$ 1.59 <sup>c, A</sup>	233.57 $\pm$ 0.95 <sup>b, A</sup>	640.85 $\pm$ 7.41 <sup>a, A</sup>

Values represent mean  $\pm$  SD, n = 3.

<sup>a-c</sup>: Different superscript small letters within a row denote significant differences ( $p < 0.05$ ) in each apple cultivar.

<sup>A-C</sup>: Different superscript capital letters within a column denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between cultivars.

TABLE 2  
Total flavanol content (mg catechin equivalents/100g) of the flesh, whole fruit and peel of three apple cultivars

Cultivar	Flesh	Whole fruit	Peel
Fuji	18.71 $\pm$ 0.10 <sup>c, B</sup>	24.59 $\pm$ 0.15 <sup>b, B</sup>	62.75 $\pm$ 1.18 <sup>a, B</sup>
Epagri COOP24	19.13 $\pm$ 0.01 <sup>c, A</sup>	27.39 $\pm$ 1.28 <sup>b, A</sup>	81.93 $\pm$ 4.40 <sup>a, A</sup>
Epagri F5P283	18.84 $\pm$ 0.15 <sup>b, B</sup>	24.89 $\pm$ 0.24 <sup>b, B</sup>	69.54 $\pm$ 6.07 <sup>a, B</sup>

Values represent mean  $\pm$  SD, n = 3.

<sup>a-c</sup>: Different superscript small letters within a row denote significant differences ( $p < 0.05$ ) in each apple cultivar.

<sup>A-C</sup>: Different superscript capital letters within a column denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between cultivars.

The anthocyanin contents in all apple peels were significantly different (Figure 1). The

anthocyanin content of flesh and whole fruit were not analyzed, as apple flesh does not contain anthocyanins.

Table 3 describes the total antioxidant activity of three cultivars. In all cultivars, the apple peels had the highest antioxidant activity followed by the whole fruit and the flesh. The Epagri F5P283 apple had the highest total antioxidant activity in flesh, whole fruit and peel.

Total phenolic content was positively associated with total antioxidant activity in flesh ( $r = 0.9704$ ,  $P = 0.0001$ ), whole fruit ( $r = 0.9685$ ,  $P = 0.0003$ ) and peel ( $r = 0.8417$ ,  $P = 0.036$ ), suggesting that phenols have a significant contribution to the total antioxidant capacity of all parts of the apples.

FIGURE 1  
Anthocyanin content of apple peels. Values represent mean  $\pm$  SD. Different letters denote significant differences ( $p < 0.05$ )

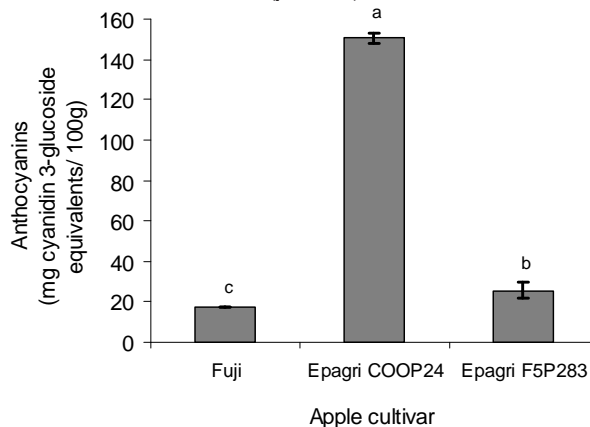


TABLE 3  
Total antioxidant activity ( $\mu\text{mol}$  of Trolox equivalents/100g) of the flesh, whole fruit and peel of three apple cultivars

Cultivar	Flesh	Whole fruit	Peel
Fuji	537.38 $\pm$ 6.86 <sup>c, C</sup>	750.45 $\pm$ 27.69 <sup>b, B</sup>	2062.86 $\pm$ 3.22 <sup>a, A</sup>
Epagri COOP24	654.62 $\pm$ 33.87 <sup>c, B</sup>	788.87 $\pm$ 36.93 <sup>b, B</sup>	2085.94 $\pm$ 2.99 <sup>a, A</sup>
Epagri F5P283	972.92 $\pm$ 31.10 <sup>c, A</sup>	1071.54 $\pm$ 37.96 <sup>b, A</sup>	2099.13 $\pm$ 28.22 <sup>a, A</sup>

Values represent mean  $\pm$  SD, n = 3.

<sup>a-c</sup>: Different superscript small letters within a row denote significant differences ( $p < 0.05$ ) in each apple cultivar.

<sup>A-C</sup>: Different superscript capital letters within a column denote significant differences ( $p < 0.05$ ) between cultivars.

## DISCUSSION

The total phenolic content, flavanol content, anthocyanin content and antioxidant activity vary considerably depending of the part of the fruit and of the apple cultivar analyzed. Comparison of the values obtained in this study with those of other studies suggests similar results although differences in the units reported and spectrophotometric standards employed make a direct comparison difficult.

Apple peels possess higher contents of phenolic compounds compared to flesh and whole fruit. A similar trend in the total phenolic content of apple parts was found among studied cultivars in different countries (4-8). The nature and distribution of these phenolics between the flesh and the peel of the apple is also different. Among others, the flesh contains catechins, procyanidins, phloridzin, phloretin glycosides, caffeic acid and chlorogenic acid, the peels possess all of these compounds and has additional phenolics not found in the flesh, such as anthocyanins and quercetin glycosides (13-15). Catechin, epicatechin, procyanidins B1 and B2 are main flavanols present in appreciable amounts in both the peels and the flesh (14, 15).

The total flavanols contents of the peel, flesh and whole apple under investigation were comparable to those previously reported (16,17).

The measured anthocyanin content of the apple peels was related to their appearance. The red color of apple peels is due to the presence of cyanidin 3-galactoside the major anthocyanin present in red or partially red genotypes apples (14,15). The new selection studied Epagri COOP24 and Epagri F5P283 apples were deep red in color and had the most anthocyanins whereas the Fuji apple a bicolored cultivar (bright red with green patches) had significantly less anthocyanins. Similar results were found by other researchers (5,15).

The results of this study were consistent with a number of previous studies which state that apples possessed strong antioxidant capacity and that the value varied between apples cultivars (4,15,18). The Epagri COOP24 and Epagri F5P283 apples, which are resistant cultivars to apple scab compared with the Fuji apple, contain higher content of phenolic compounds and antioxidant activity, despite some results of these two cultivars have similar levels compared to Fuji apple.

Petkovsek et al (18) observed also that some scab resistant apples cultivars, which have a higher natural resistance, possess higher content of total phenolic compounds in comparison with scab susceptible cultivars. The reason why resistant apple cultivars exhibit higher phenolic content and higher antioxidant activity is probably beside genotype also because the trees are exposed to different stress factors in orchard, such as diseases, pests, lack of mineral nutrients, which induce accumulation of phenolic compounds (18,19).

In addition, whole apple tended contain significantly greater total antioxidant activity and total phenolic compared with flesh, suggesting that peel removal may induce a more significant nutrient losses in some cultivars than others. Higher concentration of phenolic compounds and antioxidant activity in peel and whole fruit than flesh was also reported for other apple cultivars (4-6,18,20).

There was a significant positive correlation between total phenolic content and antioxidant activity and in flesh, whole fruit and peel; however, a little weaker in the peel compared to the flesh and whole apple. This is probably because of polyphenolic compounds found in the peel and not in the flesh, as well as the variation in relative proportions measured (15). Moreover, the proportions of compounds within of these parts of the fruit and differences between these might subsequently result in complex changes in activity antioxidant or others bioactivities (15).

The higher total phenolic content in apple fruits resulted in higher total antioxidant activity (4,6,15,18). In contrast, Wolfe et al (5) did not found any correlation between the high antioxidant capacity and level of phenol constituents in apple. Different methods of extraction and analysis, as well as different apple cultivars may contribute to variance in the reported levels of phenolic compounds and antioxidant activity and, as a result, there can be no correlation between these test observed.

In conclusion, the peel and whole apple possess from 1.1 to 4.1 times greater total phenolic content, from 1.2 to 4.9 times greater total flavanol content and from 1.1 to 3.9 times greater total antioxidant activity compared with flesh. Apple peels are often discarded in the production of processed apples products, but clearly they possess high levels of antioxidant and bioactive compounds, which can be used for various purposes in the food, pharmaceutical and cosmetic industry (21). From the nutritional point of view, the results of this study suggest that regular consumption of apple with peel must be recommended to maximize the dietary intake of antioxidant compounds that may have health benefits for consumers such as reduced risk of cardiovascular diseases and cancer.

## ACKNOWLEDGMENT

Authors are grateful to the National Counsel of Technological and Scientific Development for financial support and the Company of Farming Research and Agricultural Extension of Santa Catarina for their collaboration in sample collection.

## REFERENCES

1. Di Pietro, PF, Medeiros NI, Vieira FGK, Fausto MA, Belló-Klein A. Breast cancer in southern Brazil: association with past dietary intake. *Nutr Hosp*. 2007; 22(5):565-72.
2. Auclair S, Silberberg M, Gueux E, Morand C, Mazur A, Milenkovic D, et al. Apple polyphenols and fibers attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Agric Food Chem*. 2008; 56(14):5558-63.
3. Ko SH, Choi SW, Ye SK, Cho BL, Kim HS, Chung MH. Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. *J Med Food*. 2005; 8(1):41-6.
4. Drogoudi PD, Michailidis Z, Pantelidis G. Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. *Scientia Horticulturae*. 2008; 115:149-53.
5. Wolfe K, Wu X, Liu RH. Antioxidant activity of apple peels. *J Agric Food Chem*. 2003; 51:609-14.
6. D'Abrosca B, Pacifico S, Cefarelli G, Mastellone C, Fiorentino A. 'Limoncella' apple, an Italian apple cultivar: phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chem* 2007; 104:1333-7.
7. Lata B, Tomala K. Apple peel as a contributor to whole fruit quantity of potentially healthful bioactive compounds: cultivar and year implication. *J Agric Food Chem*. 2007; 55:10795-802.
8. McGhie TK, Hunt M, Barnet LE. Cultivar and growing region determine the antioxidant polyphenolic concentration and composition of apples grown in New Zealand. *J Agric Food Chem*. 2005; 53:3065-70.
9. Budini R, Tonelli D, Girotti S. Analysis of total phenols using the prussian blue method. *J Agric Food Chem*. 1980; 28(6):1236-38.
10. Arnous A, Markis D, Kefalas P. Correlation of pigment and flavonol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J Food Compos Analysis*. 2002; 15:655-65.
11. Giusti MM, Wrolstad RE. Anthocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. In: Wrolstad RE, editor. *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. 1-13.
12. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26:1231-37.
13. Chinnici F, Bendini A, Gaiani A, Riponi C. Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. golden delicious apples as related to their phenolic composition. *J Agric Food Chem*. 2004; 52:4684-89.

14. Tsao R, Yang R, Xie S, Sockovie E, Khanizadeh S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *J Agric Food Chem*. 2005; 53:4989-95.
15. Khanizadeh S, Tsao R, Rekika D, Yang R, Charles MT, Rupasinghe HPV. Polyphenol composition and total antioxidant capacity of selected apple genotypes for processing. *J Food Compos Analysis*. 2008; 21:396-401.
16. Liu RH, Eberhardt MV, Lee CY. Antioxidant and antiproliferative activities of selected New York apple cultivars. *New York Fruit Quarterly*. 2001; 9:15-17.
17. Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H. polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *J Agric Food Chem*. 2003; 51:6347-53.
18. Petkovsek MM, Stampar F, Veberic R. Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh). *Scientia Horticulturae*. 2007; 114:37-44.
19. Scalzo J, Politi A, Pellegrini N, Mezzetti B, Battino M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*. 2005; 21:207-13.
20. Araya HL, Clavijo CR, Herrera C. Capacidad antioxidante de frutas y verduras cultivados en Chile. *Arch Latinoam Nutr*. 2006; 56(4):361-65.
21. Cetkovic G, Canadamovic-Brunet J, Djilas S, Savatovic S, Mandic A, Tumbas V. Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chem*. 2008; 109:340-7.

Recibido: 06-11-2008

Aceptado: 30-01-2009