

ALAN

Volumen 54. N° 3. Septiembre 2004

A R C H I V O S

Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición

L A T I N O A M E R I C A N O S

Continuación de Archivos Venezolanos de Nutrición

D E N U T R I C I O N



Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN) es editado como órgano oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), para la divulgación de conocimientos en el campo de la alimentación y de la nutrición principalmente en el Hemisferio Americano. En sus páginas se acogen manuscritos en español, inglés, portugués y francés, tanto de miembros como de aquellos que no sean miembros de la Sociedad, y de cualquiera de las siguientes categorías: 1. Trabajos generales (revisiones científicas críticas); 2. Trabajos de investigación (originales); 3. Trabajos de nutrición aplicada (resultados analíticos de programas de intervención y discusión de recomendaciones de aplicación práctica), y 4. Cartas al Editor (comentarios cortos de interés general o relacionados con resultados o conceptos científicos publicados previamente en *Archivos*).

Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN) is the official publication of the Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), for the dissemination of knowledge in the fields of food and nutrition, principally throughout the American Hemisphere. Articles in Spanish, English, Portuguese and French are accepted, both from the Society members and from nonmembers, in the following categories: 1. General articles (critical scientific reviews); 2. Research articles (originals); 3. Papers in applied nutrition (analytical results from intervention programs and discussion of recommendations of practical application), and 4. Letters to the Editor (short comments of general interest or about scientific facts and concepts previously published in *Archivos*).




Dirección: Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Apartado 62.778. Chacao.
Caracas 1060. Venezuela, S.A.
Fax (58.212) 286.00.61

Ubicación en formato digital: <http://www.scielo.org.ve>
Correo electrónico: alanven04@hotmail.com

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION está registrado en ASEREME e indizado en las siguientes Bases de Datos: LILACS/CD ROM; Food Science & Technology Abstracts; MEDLINE, Life Science Collection; Science Citation Index

ENTIDADES PATROCINANTES

- **FONACIT.** Venezuela
- **Fundación para la Alimentación y Nutrición “José María Bengoa”**
Caracas, Venezuela
- **Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)**
Guatemala, Guatemala C.A.
- **INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION.** Venezuela
-  América Latina
-  **PRODUCTOS ROCHE,** América Latina
- **Fundación POLAR**
- **Centro de Atención Nutricional Infantil Antímamo. CANIA**
- **PARMALAT de Venezuela**
- **ADM Protein Specialties**
- **Coca-Cola de Venezuela**
-  **Kraft Foods**
Kraft Foods Venezuela, C.A.

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION se complace en destacar y agradecer el apoyo económico recibido del FONACIT para la edición sostenida de la revista.

Bajo la responsabilidad del Capítulo Venezolano de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Organo Oficial de la
Sociedad Latinoamericana de Nutrición

VOL 54

SEPTIEMBRE 2004

Nº 3

Contenido

	Páginas
ARTICULOS GENERALES	
Efeitos terapêuticos dos fitosteróis e fitostanoís na colesterolemia Silvia L. C. Martins, Heliênia F. Silva, Maria Rita Carvalho Garbi Novaes, Marina Kiyomi Ito	257
TRABAJOS DE INVESTIGACION	
Bioquímica Nutricional	
Lipemia postprandial en adultos jóvenes de diferentes etnias en Colombia Cecilia Aguilar de Plata, Maria Teresa Velasco de Echeverri, Beatriz Gracia de Ramírez, Alberto Pradilla Ferreira, Martha Liliana Cruz Naranjo, Mildrey Mosquera Escudero	264
Efecto de un desayuno con alto contenido en grasa o en carbohidratos sobre el perfil de lípidos posprandial en individuos sanos con y sin antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2 Manuel González-Ortiz, Blanca R. Balcázar-Muñoz, José M. Mora-Martínez, Esperanza Martínez-Abundis	274
Nutrición Experimental	
Exactitud del índice de masa corporal en la predicción de la adiposidad medida por impedanciometría bioeléctrica Fernando Carrasco N., Eliana Reyes S., Olga Rimler S., Francisca Rios C.	280

Nutrición Infantil

Influencia del estado nutricional sobre la efectividad de un suplemento dietario de bacterias lácticas. Prevención y cura de diarreas infantiles

María Esther Río, Liliana Beatriz Zago, Hugo García y Luis Winter 287

Microbiología de Alimentos

Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7

Xinia Barrantes, Dylana Railey, María Laura Arias y Carolina Chaves 293

Evaluación del efecto de cultivos probióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa

Marlon Salvatierra, Andrea Molina, María del Mar Gamboa y María Laura Arias 298

Evaluación de la presencia de bacterias en alimentos y en el ambiente de una sección de oncología de un hospital nacional, San José, Costa Rica

Fabiola Jiménez, Laura Garro, Evelyn Rodríguez, Zenén Zeledón 303

Ciencia de Alimentos

Evaluación microbiológica y fisicoquímica de bebidas pasteurizadas fortificadas con extractos de desechos desodorizados de naranja

Mario José Moreno Alvarez, Alexandra Machado, Arelis Padrón, David García y Douglas Rafael Belén Camacho 308

Tecnología de Alimentos

Desarrollo de un producto de panificación apto para el adulto mayor a base de harina de trigo y harina de arroz

María José Reyes Aguilar, Patricia de Palomo, Ricardo Bressani 314

LatinFoods. Composición de Alimentos

Caracterización nutricional de los carbohidratos y composición centesimal de raíces y tubérculos tropicales cocidos, cultivados en Costa Rica

Adriana Blanco-Metzler, Juscelino Tovar, Mireya Fernández-Piedra 322

Perfil lipídico de 25 pescados marinos mexicanos con especial énfasis en sus ácidos grasos n-3 como componentes nutracéuticos

María Isabel Castro-González, Anayté Ojeda, José Luis Silencio, Lorena Cassis, Héctor Ledesma, Fernando Pérez-Gil 328

Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible *Monostroma undulatum*, Wittrock

Adriana Alicia Gallardo, Susana Risso, María Angélica Fajardo, Silvia Esteveo Belchior 337

Mineral content of the honey produced in Zulia state. Venezuela

Betzabé Sulbarán de Ferrer, Graciela Ojeda de Rodríguez, Jorge Peña, Janeth Martínez y María Morán 346

Caracterização química parcial e bioquímica de sementes de *Bauhinia forficata* link

Rozilaine A.P.G. Faria, Manoel Andrade-Neto, Luciano Silva Pinto, Rolando Rivas Castellón, Juan J. Calvete & Benildo Sousa Cavada 349

NOTAS NECROLOGICAS 354

INFORMACION PARA LOS AUTORES 356

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the
Latin American Society of Nutrition

VOL 54

SEPTEMBER 2004

Nº 3

Contents

	Pages
GENERAL ARTICLES	
Therapeutic effects of phytosterols and phytostanols in cholesterolemia Silvia L. C. Martins, Heliênia F. Silva, Maria Rita Carvalho Garbi Novaes, Marina Kiyomi Ito	257
RESEARCH PAPERS	
Nutritional Biochemistry	
Postprandial lipemia in Colombian young adults from different ethnias Cecilia Aguilar de Plata, Maria Teresa Velasco de Echeverri, Beatriz Gracia de Ramírez, Alberto Pradilla Ferreira, Martha Liliana Cruz Naranjo, Mildrey Mosquera Escudero	264
Effect of a high fat or high carbohydrate breakfast on postprandial lipid profile in healthy subjects with or without family history of type 2 diabetes mellitus Manuel González-Ortiz, Blanca R. Balcázar-Muñoz, José M. Mora-Martínez, Esperanza Martínez-Abundis	274
Experimental Nutrition	
Predictive accuracy of body mass index in estimating body fatness measured by bioelectrical impedance Fernando Carrasco N., Eliana Reyes S., Olga Rimler S., Francisca Rios C.	280
Infant Nutrition	
Influence of nutritional status on the effectiveness of a dietary supplement of live lactobacillus to prevent and cure diarrhoea in children María Esther Río, Liliana Beatriz Zago, Hugo Garcia y Luis Winter	287

Food Microbiology

- Evaluation of the effect of probiotic cultures added to commercial yogurt over a known population of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7**
Xinia Barrantes, Dylana Railey, María Laura Arias y Carolina Chaves 293
- Evaluation of the effect of probiotic cultures on two different yogurt brands over a known population of *Staphylococcus aureus* and the production of thermonuclease**
Marlon Salvatierra, Andrea Molina, María del Mar Gamboa y María Laura Arias 298
- Evaluation of the presence of bacteria in food and environment of an Oncological Service of a National Hospital, San José, Costa Rica**
Fabiola Jiménez, Laura Garro, Evelyn Rodríguez, Zenén Zeledón 303

Food Science

- Microbiological and physicochemical evaluation of pasteurized beverages fortified with orange deodorized residues extracts**
Mario José Moreno Alvarez, Alexandra Machado, Arelis Padrón, David García y Douglas Rafael Belén Camacho 308

Food Technology

- Development of bakery products for greater adult consumption based on wheat and rice flour**
María José Reyes Aguilar, Patricia de Palomo, Ricardo Bressani 314

LatinFoods. Food Composition

- Nutritional characterization of carbohydrates and proximal composition of cooked tropical roots and tubers produced in Costa Rica**
Adriana Blanco-Metzler, Juscelino Tovar, Mireya Fernández-Piedra 322
- Lipidic pattern of 25 Mexican marine fishes with special emphasis in their n-3 fatty acids as nutraceuticals components**
María Isabel Castro-González, Anayté Ojeda, José Luis Silencio, Lorena Cassis, Héctor Ledesma, Fernando Pérez-Gil 328
- Characterization of microbial population present in the edible seaweed, *Monostroma undulatum*, Wittrock**
Adriana Alicia Gallardo, Susana Rizzo, María Angélica Fajardo, Silvia Estevao Belchior 337
- Mineral content of the honey produced in Zulia state. Venezuela**
Betzabé Sulbarán de Ferrer, Graciela Ojeda de Rodríguez, Jorge Peña, Janeth Martínez y María Morán 346
- Biochemical and chemical partial characterization of *Bauhinia forficata* Link seeds**
Rozilaine A.P.G. Faria, Manoel Andrade-Neto, Luciano Silva Pinto, Rolando Rivas Castellón, Juan J. Calvete & Benildo Sousa Cavada 349
- IN MEMORIAM** 354
- INFORMATION FOR AUTHORS** 356

Efeitos terapêuticos dos fitosteróis e fitostanóis na colesterolemia

Silvia L. C. Martins¹, Heliênia F. Silva¹, Maria Rita Carvalho Garbi Novaes², Marina Kiyomi Ito¹

Departamento de Nutrição. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília¹. Faculdade de Medicina. Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde. Brasília-DF, Brasil²

RESUMO. Os ésteres de esterois e estanois vegetais são reconhecidos como componentes “funcionais” dos alimentos por apresentarem propriedades hipocolesterolemicas. Os fitosteróis são compostos esteróis obtidos de óleos vegetais. Neste estudo foi realizada uma análise crítica/revisão de estudos experimentais e clínicos recentes, publicados em base de dados Medline e Lilacs, abordando a ação farmacológica dos fitoesteróis e fitostanóis na colesterolemia. Os efeitos hipocolesterolemiantes são observados pela ingestão de doses maciças, em dose única ou múltipla, de até 2,5 g/dia destes compostos. O consumo diário por durante quatro semanas tem evidenciado a redução dos níveis sanguíneos de colesterol total (CT) e LDL-colesterol (LDL-c) em cerca de 10%. O mecanismo de ação na diminuição da colesterolemia se deve, possivelmente, à sua semelhança estrutural com o colesterol, o que favorece uma competição na absorção intestinal, entre ésteres de esterois e/ou estanol e o colesterol. Efeitos adversos da suplementação de fitosteróis e fitostanóis ocasionaram a diminuição da absorção de algumas vitaminas e antioxidantes lipossolúveis.

Palavras-chaves: Fitosteróis, fitostanóis, colesterolemia.

SUMMARY. Therapeutic effects of phytosterols and phytostanols in cholesterolemia. Plant sterol and stanol esters are called “functional” compounds due to their hypocholesterolemic properties. The objective of this review is to update recent findings concerning the effect of phytosterols in the blood cholesterol, emphasizing the results from experimental and human studies. The hypocholesterolemic effect is observed with the intake of 2.5g/day of phytosterols or phytostanols. Daily intake, usually of stanols, for 4 weeks has shown to be effective in lowering blood total- as well as LDL-cholesterol by about 10%. The mechanism of action in lowering blood cholesterol comes from their structural similarity to cholesterol, hence they act by competing with cholesterol at the luminal absorption site. The adverse effects of a high intake of phytosterols and phytostanols are the lower absorption of some liposoluble vitamins and antioxidants.

Key words: Pphytosterols, phytostanols, blood cholesterol.

INTRODUÇÃO

Os efeitos dos fitosteróis na redução da colesterolemia tem sido amplamente estudados desde a década de 50 e, atualmente, são reconhecidos como componentes “funcionais” por apresentarem propriedades hipocolesterolemicas (1,2).

Os esteróis são componentes essenciais às membranas das células, e podem ser produzidos por animais e plantas. Os fitosteróis são compostos esteróis oriundos dos óleos vegetais e apresentam grande similaridade estrutural com o colesterol (1). São compostos com 28 ou 29 carbonos, diferindo do colesterol (27 carbonos) pela presença de um radical metila ou etila adicional na cadeia carbônica (3). Os fitosteróis mais estudados: β -sitosterol e campesterol apresentam uma insaturação em sua estrutura, similar ao colesterol. Quando essa dupla ligação não está presente ou é desfeita artificialmente, temos os análogos β -sitostanol e campestanol (Figura 1) (3). Os estanois são os esteróis saturados e podem ser extraídos dos alimentos ou produzidos artificialmente por meio de hidrogenação, sendo menos abundantes nos alimentos *in natura* do que os esteróis (1).

Embora na literatura sejam relatados outros efeitos dos fitosteróis, como sua ação estrogênica no sistema reprodutivo e inibição do crescimento de certos tipos de cancer (4), o objetivo desta revisão é analisar os estudos mais recentes sobre os efeitos dose fitosteróis e fitostanóis especificamente sobre a colesterolemia.

METODOLOGIA

Foram selecionados artigos experimentais e clínicos, randomizados, duplo-cegos e placebo-controlados, publicados nos últimos dez anos, em bases de dados Medline e Lilacs, cujos objetivos eram avaliar o efeito de fitosteróis e fitostanóis na redução de hipercolesterolemia leve ou moderada.

Fontes alimentares

Existe uma grande variedade de fitosteróis presentes nos alimentos, sendo identificadas mais de 40 substâncias (1). Os mais abundantes nos produtos *in natura* são o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol, que podem ocorrer tanto na

forma cristalina quanto esterificada a ácidos graxos livres, ácidos fenólicos ou açúcares (5). Estes fitosteróis são os que mais se assemelham ao colesterol, pois são do tipo 4-desmetilesteróis, ou seja, não contêm grupo metila no carbono 4 (1). Dentre os alimentos ricos em fitosteróis e fitostanóis, destacam-se a soja, os frutos oleaginosos e os óleos vegetais em geral, principalmente de canola, arroz e girassol (6). A dieta ocidental provê cerca de 100-300 mg de fitosteróis por dia, sendo seu consumo no norte europeu estimado em 200-300 mg/dia, enquanto japoneses e vegetarianos consomem em torno de 300-450 mg/dia (7-9). Com relação aos fitostanóis, a dieta ocidental fornece entre 20 e 50 mg por dia (7).

Desde 1980, reconhece-se que os fitoesteróis poderiam ser adicionados aos alimentos. No entanto, a adição de fitostéreis e fitostanóis cristalinos a alimentos industrializados não é a melhor opção, pois as alterações organolépticas inerentes ao uso destas substâncias isoladas limitam seu uso. Estes compostos cristalinos, além de deixarem um sabor “rançoso”, são também pouco solúveis quando adicionados aos alimentos, ao contrário dos esterificados (fitosterol-ester). Por isso, os estudos mais recentes têm avaliado a aplicação de fitosteróis e fitostanóis esterificados a ácidos graxos. Alguns trabalhos utilizam óleo de girassol como veículo, por promover boa solubilidade junto à fase oleosa de margarinas e cremes vegetais (5,10), mas alguns autores também relatam o uso de emulsões lipídicas mistas, contendo óleos de milho, soja e canola, ou algum destes isoladamente (11,12). Como consequência, a indústria alimentícia têm investido na adição de fitosteróis e fitostanóis em margarinas, cream-cheeses, cremes vegetais e molhos para salada, incorporando-os em maior quantidade na dieta humana (1).

Dessa forma, os estudos descritos a seguir avaliam os efeitos de fitosteróis e fitostanóis adicionados industrialmente a margarinas e cremes vegetais.

Efeitos sobre a colesterolemia

O relatório de estratégias para redução de colesterol sanguíneo do Programa Nacional Americano de Educação em Colesterol (NCEP – National Cholesterol Education Program) estima que para cada 1% de redução na concentração de colesterol sanguíneo, o risco de doenças cardiovasculares diminuiria em 2% (13). Segundo essas diretrizes, a terapia dietética é primeiro passo para a diminuição do colesterol sanguíneo, que pode favorecer uma diminuição de 10 a 13% do LDL-colesterol (LDL-c) de forma lenta. Logo, um suplemento à dieta que seja seguro e bem tolerado pode ser útil no manejo não farmacológico da hipercolesterolemia visando redução mais rápida do LDL-c (13,14).

A margarina contendo ésteres de fitostanol foi lançada na Finlândia em 1995. Naquele mesmo ano, resultados de um ensaio clínico realizado naquele país mostraram que a margarina com ésteres de estanol vegetal pode efetuar uma

redução significativa no colesterol total e no LDL-c de 10 a 14%, respectivamente, em pacientes com hipercolesterolemia leve (15).

A revisão de estudos (1), avaliando a eficácia de margarinas com adição de fitosteróis e fitostanóis, identificou uma diminuição média de 14% no LDL-c com uma dose diária igual ou maior que 2 g/dia, para indivíduos com idade entre 50 e 59 anos. Em pessoas com idade entre 40 e 49 anos, a diminuição do LDL-c foi de 9%. Dados observacionais de ensaios randomizados mostraram que, em pessoas de 50 a 59 anos, a diminuição do LDL-c em 0,5 mmol/L diminuiu o risco cardiovascular em 25% depois de dois anos de suplementação. Em pessoas mais jovens, a diminuição do colesterol foi menor, mas houve a associação entre níveis de colesterol e doenças cardiovasculares mais forte. Dos estudos descritos, um não apresentou redução significativa de colesterol, apesar do consumo diário de 3g de fitostanol. Este ensaio (16) diferiu dos outros trabalhos em dois aspectos metodológicos: Primeiro, os indivíduos estudados não consumiram uma dieta com composição fixa, o que prejudicou a comparação dos resultados. Segundo, o sitostanol utilizado foi administrado em cápsulas, ao invés de adicionado à gordura das refeições. Isto pode ter dificultado a sua dispersão e solubilização no lúmen intestinal e, conseqüentemente, limitando os efeitos da redução do colesterol.

Recentemente, outros mais ensaios clínicos, randomizados, duplo-cegos e placebo-controlados, foram publicados, possibilitando maior conhecimento quanto à ação hipocolesteremiante dos fitostanóis. A Tabela 1 resume alguns dos trabalhos que testaram a capacidade de esteróis e estanóis vegetais em reduzir a absorção do colesterol.

FIGURA 1

Estrutura química de fitosteróis e fitostanóis. Os fitosteróis são compostos semelhantes ao colesterol, porém apresentam um grupamento metila ou etila extra na cadeia carbônica linear. Os fitostanóis são moléculas similares aos fitosteróis, porém não apresentam a insaturação do anel carbônico

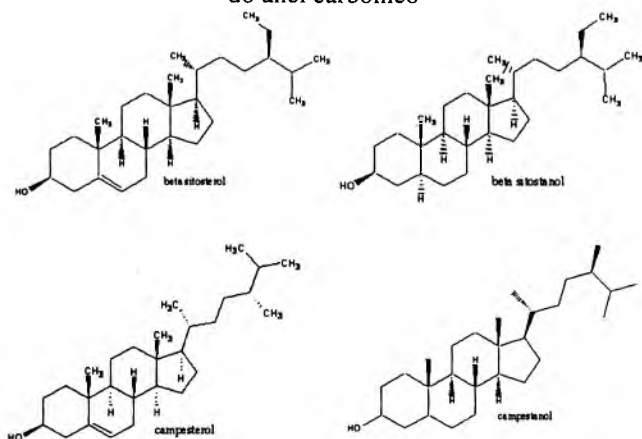


TABELA 1
Efeitos da suplementação fitosteróis e/ou fitostanóis na redução do LDL-colesterol- Estudos clínicos

Autores	Estudo	n	Idade média	Tempo	Composto	Dose (g/dia)	Redução LDL
Jones PJH et al., (12)	Randomizado duplo-cego	32	25 a 60 anos	50 dias	Estanol	± 1,5 (22 mg/kg/dia)	23 a 31%
Hallikainen MA et al., (17)	Randomizado duplo-cego	42	30 a 65 anos	12 semanas	Esterol e estanol	2,02 esterol (com 0,10 estanol) 2,06 esterol (com 0,09 estanol) e placebo (com 0,09 g total estanol)	Estanol= 12,7% Esterol= 10,4 %
Lottenberg AMP et al., (19)	Randomizado duplo-cego cruzado	60	> 30 anos	8 semanas	Esterol	3	10 a 12%
Plat J. (21)	Randomizado duplo-cego cruzado	43	16 a 65 anos	12 semanas	Estanol	2,5 (dose única eu ou fracionada em 3 vezes)	9 a 10%
Nestel P, 2000	Randomizado imples-cego	37	60 anos (de 34 a 70 anos)	12 semanas	Esterol e estanol	2,4 esterol e 2,4 estanol	13,6 %
Maki CK, (14)	Randomizado duplo-cego	40	21 a 75 anos	5 semanas	Esterol	2 doses diferentes: High Sterol (2,2) Low Sterol (1,1)	High =10,2% Low = 7,1%
Neil HAW, Meijer GW, Roe LS, (10)	Randomizado duplo-cego cruzado	63	18 a 69 anos	4 meses	Esterol	2,5	15%
Gylling H & Miettinen TA, (11)	Randomizado duplo-cego	30	66 anos	1 ano	Estanol + Sinvastatina	2	27%
Judd JT., (18)	Randomizado duplo-cego	53	25 a 65 anos	8 semanas	Esterol	2,2	10%

Obs : Em nenhum dos trabalhos encontrou-se diferença estatisticamente significativa entre os gêneros masculino e feminino.

Hallikainen et al. (17) avaliaram a ingestão de margarina com ésteres de fitostanóis ou fitosteróis., em pacientes hipercolesterolêmicos. Os pacientes consumiram durante 4 semanas fitostanóis ou fitosteróis, na dose de 2,01 a 2,04 g/dia. Houve redução significativa ($p < 0,001$) do colesterol total (CT) em 9,2 e 7,3 % e de LDL-c em 12,7 e 10,4%, respectivamente, para estanois e esteróis. Não houve diferença na eficiência de redução entre estanois e esteróis.

Resultados semelhantes foram obtidos por Judd et al. (18) que utilizaram em molhos para salada 3,6 gramas de fitosteróis e obtiveram diminuição no (CT) de 7% e no LDL-

c de 10%, enquanto o HDL permaneceu inalterado. A diminuição de CT e LDL-c com manutenção dos níveis de HDL têm intensa ligação com a diminuição de risco cardiovascular. Segundo Lottenberg et al. (19), a utilização de 3g/dia de fitosteróis na dieta de margarina por 60 adultos brasileiros, portadores de hipercolesterolemia moderada, promoveu redução de 10% do CT e de 12% do LDL-c em um mês de intervenção. Resultados similares foram obtidos por Neil et al (10), com 32 pacientes a uma dose de 2,5g/dia de fitosteróis, durante quatro meses.

O efeito dose depende foi testado em ésteres de estanol

(20), tendo sido observada redução significativa do LDL-c a partir do consumo de 1,6 g/dia de estanol. O aumento da dose diária de 2,4 para 3,2 g não resultou em efeito adicional clinicamente importante, indicando a existência de saturação do efeito do estanol sobre o colesterol sanguíneo a partir de 2,4 g/dia.

A influência da forma de administração e posologia sobre os efeitos terapêuticos destes compostos, também foram avaliados estudados. No estudo de Plat et al. (21), indivíduos normocolesterolêmicos ou levemente hipercolesterolêmicos consumiram, em ordem aleatória: placebo, 2,5 g de fitosterol no almoço ou 2,5 g de fitosterol divididos em três doses, administradas junto às três principais refeições (0,42g no desjejum; 0,84g no almoço e 1,25g no jantar). Cada período de administração das doses durou 4 semanas. Observou-se uma diminuição similar de LDL-c (9,4%) tanto na população que ingeriu 3 porções de fitosterol fitostanol por dia quanto na que ingeriu apenas 1 porção. Este estudo mostra que não é necessário ingerir o fitostanol junto com colesterol dos alimentos. Os autores especulam quanto à existência de outras ações do fitosterol, além da solubilidade micelar do colesterol, no lumen intestinal ou na interação com os enterócitos.

Um fator que otimizou a ação dos fitostanóis foi sua ligação com a lecitina de soja. Ostlund et al. (22) demonstraram que, para promover redução do colesterol sérico, a administração de cápsulas de lecitina de soja enriquecidas com 700, 300 ou 100 mg/dia de sitostanol foi mais eficiente do que o sitostanol isolado (1000 mg/dia), promovendo redução de 36,7%, 34,4%, 5,6% e 11,3%, respectivamente. Este estudo sugere que a lecitina de soja pode promover maior solubilização do fitostanol na fase micelar da digestão, indicando um efeito sinérgico, potencializando a ação hipocolesterolêmica.

Os fitosteróis também podem colaborar com a ação das estatinas, drogas inibidoras da hidroximetilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, acelerando a redução no colesterol sérico e do LDL-c (10,11).

Relativamente poucos estudos foram publicados quanto ao efeito dos fitosteróis naturalmente presentes nos alimentos. Considerando que, além dos triacilgliceróis, os fitosteróis constituem o principal componente de óleos vegetais refinados, Ostlund et al. (23) utilizando técnica inédita de remoção do fitosterol contido no óleo, avaliou o efeito do óleo de milho com e sem fitosteróis na absorção de colesterol hexadeuterado ([^{26,26,26,27,27,27}-2H₆], colesterol) em humanos. A adição de 150 mg/ refeição teste de fitosterol diminuiu em 12,1% a absorção de colesterol. Estes resultados indicam a existência do efeito hipocolesterolemizante dos fitosteróis presentes nos óleos de milhos comerciais, atribuído anteriormente somente aos ácidos graxos destes óleos.

Uma maior produção hepática de colesterol pode ocorrer quando há maior consumo de fitosteróis e fitostanóis, como uma adaptação do organismo na sentido de recuperar os níveis

séricos anteriores. No entanto, tal resposta depende da predisposição genética, uma vez que existe uma variabilidade grande entre os indivíduos no que se refere à absorção do colesterol. Vanhanen et al. (24) mostraram que a maior redução do LDL-c, quando suplementados com sitostanol-éster, ocorreu no grupo homocigoto para apoproteína (apo) E-4, ao contrário do grupo apo E-3, pois é em indivíduos portadores do alelo E-4 que há maior absorção de colesterol. Isso sugere que, mesmo havendo um feedback hepático, a redução do LDL-c se sobressai.

Recentemente, Tammi et al. (25) avaliaram, durante sete meses, o efeito da suplementação randomizada de fitosteróis na dieta de desmame de crianças saudáveis em relação ao controle da colesterolemia. As crianças eram participantes do projeto finlandês: *Special Turku Coronary Risk Factor Intervention Project for Children (STRIP)*. Os autores compararam o desmame tradicional, que incluía leite de vaca integral, com o desmame experimental, cujo leite de vaca era desnatado e adicionado de óleo vegetal para manter o mesmo teor lipídico. A oferta média de fitosteróis era duas vezes maior na dieta experimental do que na dieta controle (132 e 65 mg/dia, respectivamente). Os resultados demonstraram que o grupo controle, exposto a um maior consumo de gordura saturada, apresentou valores séricos maiores de substâncias precursoras do colesterol (Δ -8-colestenol, desmosterol e latosterol) do que o grupo exposto aos fitosteróis e óleo vegetal, cujos valores permaneceram inalterados. Isto sugere que a exposição destes indivíduos à maior ingestão de fitosteróis não induziu a um aumento na produção hepática de colesterol, como postulado anteriormente. Portanto, essa possível compensação endógena, secundária à privação de colesterol exógeno, precisa ser elucidada à luz de mais estudos controlados, esclarecendo os fatores determinantes desse processo.

Mecanismos de ação dos fitosteróis

Apesar das semelhanças estruturais em relação ao colesterol, os fitosteróis e estanois são diferentes quanto à sua utilização pelo organismo. Heinemann et al. (26) observouaram uma redução de 50% na absorção do colesterol com o uso de fitosterol, assim como de 85% com fitostanol. Além disso, Becker et al. (27) verificaram que houve aumento na excreção fecal de colesterol após a utilização destas substâncias, onde 1,5 g/dia de sitostanol aumentou a excreção fecal de esteróis totais em 88%, enquanto que sitosterol, a 6g/dia, aumentou em 45%.

A diferença nas taxas de absorção entre esteróis e estanois varia de acordo com o tamanho da cadeia carbônica e com o grau de saturação. Com relação ao tamanho da cadeia, as maiores estruturas apresentam menor absorção, devido à maior hidrofobicidade destes compostos.

Comparando estas diferenças, verifica-se que, enquanto

a absorção de colesterol (C-27) varia entre 20 e 80% do ingerido, os fitosteróis campesterol (C-28) e sitosterol (C-29) são absorvidos em torno de 15% e 1,5-5%, respectivamente (1,3). Com relação ao grau de saturação, a absorção é menor em compostos saturados. Os fitostanóis, portanto, são os compostos que apresentam as menores taxas de absorção, pois além de serem saturados, assumem estruturas com 28 ou 29 carbonos. O sitostanol é absorvido na ordem de 0 a 3%, e o campestanol apresenta níveis igualmente baixos de absorção (28-31).

Os fitosteróis são potencialmente tão aterogênicos quanto o colesterol, mas a aterogênese dificilmente ocorre devido à menor absorção dos fitosteróis, mantendo os níveis séricos entre 0,3 e 1,7 mg/dL (32). A aterogênese secundária à absorção maciça destes compostos só ocorre na presença de fitosterolemia, uma desordem autossômica recessiva rara cujos valores séricos de fitosteróis excedem os níveis de normalidade. O acúmulo sanguíneo de fitosteróis, principalmente β -sitosterol, campesterol, estigmasterol e avenosterol, favorece o aparecimento de aterosclerose coronariana e aórtica, assim como de xantomas, artrite, hemólise e infarto (25,33).

O defeito nas proteínas transportadoras ABCG5 e ABCG8 foi recentemente identificado como a causa desta hiper-absorção de fitosteróis (34). O estudo destas proteínas tem permitido avanços importantes na compreensão dos mecanismos de transporte intestinal dos esteróis. A absorção do colesterol, fitosteróis e fitostanóis pelos enterócitos é um processo rápido (35). Entende-se atualmente que as proteínas transportadoras ABC são capazes de discriminar entre colesterol e outros esteróis, sendo as responsáveis pelo transporte reverso das moléculas de fitosteróis para o lumen intestinal (36). Investigações utilizando animais transgênicos dão suporte à hipótese de que a discriminação ocorre no efluxo destes compostos para o lumen intestinal e para a bile. Animais geneticamente alterados para as proteínas ABCG5 e/ou ABCG8 hiper-absorvem não apenas o colesterol mas também os fitosteróis. Pesquisa recente, em camundongos, de avaliação das taxas de captação intestinal, absorção, discriminação e excreção biliar de esteróis marcados reforça a hipótese de efluxo seletivo de esteróis como o principal componente que favorece maior absorção para a corrente sanguínea de colesterol em relação aos fitosteróis (35). Segundo os autores, a identificação dos receptores nucleares hormonais órfãos, tais como o RXR e receptor X farnesóide, sugere a possibilidade de outras proteínas ABC transportadoras estarem envolvidas no transporte intestinal dos esteróis, sendo atualmente área de intensa investigação.

Reações adversas e toxicidade do fitosteróis

As principais reações adversas de ingestão de altas doses de fitosteróis estão associadas à diminuição plasmática das

vitaminas e antioxidantes lipossolúveis (1,37). Ensaios randomizados é maior em relação aos carotenóides mais lipofílicos, tais como os α e β carotenóides e o licopeno. A diminuição pode variar de 12 a 26% para β -caroteno, 10 a 12% para α e até 20% para o licopeno sérico após suplementação de fitosteróis e fitostanóis (1,28). Esta diminuição é minimizada, porém se mantém mesmo quando controlada em relação às mudanças nos níveis sanguíneos de LDL-colesterol (1,18). Por outro lado, os níveis séricos de retinol, vitaminas D e K parecem não ser afetados (1,17,18). A ingestão de fontes dietéticas de carotenóides, na proporção de uma porção a mais de frutas e hortaliças ricas em carotenóides por dia, foi suficiente para manter as concentrações plasmáticas destes carotenóides (38). Em relação à toxicidades dos fitosteróis e fitostanóis, em ratos, a administração de 6,6 g/kg/dia durante 90 dias não foi suficiente para gerar alterações toxicológicas significativas (39). Além disso, outros estudos realizados a curto e médio prazo, entre 50 dias e 12 meses, não evidenciaram efeitos colaterais no trato gastrointestinal durante a fase experimental, e nenhum efeito tardio foi relatado.

Métodos experimentais, in vivo e in vitro utilizando, em ratos, foram utilizados para avaliar o efeito estrogênico dos fitosteróis (5). Foi, tendo sido verificado que estes compostos não apresentam propriedades de ligação aos receptores de estrógeno, ação transcricional dos genes responsivos a estes receptores ou atividade uterotrófica.

Regulamentação da adição de fitosteróis e fitostanóis a alimentos industrializados

No ano de 2000, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso terapêutico dos ésteres de esterol ou estanol vegetal na redução do risco de doenças cardiovasculares (40). Esta decisão permitiu que alimentos adicionados com estas substâncias, como margarinas, cremes vegetais, molhos cremosos para salada, apresentassem a explicação de que ajudam a prevenir a doença cardiovascular (40). Segundo a FDA, esses alimentos devem conter no mínimo 1,7g de fitostanol-éster em cada porção, devendo ser administrados duas vezes ao dia, somando 3,4g/dia. O fitosterol-éster deve estar presente na quantidade de 0,65g por porção, totalizando 1,3g/dia. Portanto, a rotulagem dos alimentos que contêm ésteres de fitosterol ou fitostanol deverá incluir a seguinte informação: "uma porção de (nome do alimento) fornece XX gramas de fitosteróis/fitostanóis" (40). O rótulo poderá, também, ser acompanhado da seguinte frase, exemplificada com fitostanóis: "Alimentos que contêm pelo menos 1,7 gramas por porção de ésteres de estanol vegetal, ingeridos duas vezes por dia nas refeições, resultando em uma ingestão diária total de pelo menos 3,4 gramas, como parte de uma alimentação com baixos teores de gordura saturada e colesterol, podem reduzir o risco de doenças cardíacas" (40).

Embora nos Estados Unidos (41) e Europa (42) existam produtos sendo comercializados com aditivos contendo fitosteróis, no Brasil, ainda não existe regulamentação específica à de rotulagem de alimentos adicionados de fitosteróis ou fitostanóis. O único produto existente no mercado brasileiro foi registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aos moldes da regulamentação do da FDA.

CONCLUSÃO

Os fitosteróis e fitostanóis são compostos eficientes na redução da colesterolemia, podendo ser utilizados de forma isolada ou combinados a outros agentes hipocolesterolemiantes. Estes efeitos são observados pela ingestão de doses maciças, de até 2,5 g/ dia destes compostos, não encontrados em alimentos naturais. As evidências existentes são principalmente de produtos alimentícios nos quais estes compostos que foram aditivados. Poucos estudos de informação têm sido publicados enfatizando os efeitos dos fitosteróis e fitostanóis quanto, naturalmente presentes nos alimentos, no controle do colesterol sanguíneo.

O efeito adverso atribuído à suplementação de fitosteróis e fitostanóis, refere-se à discreta diminuição da absorção de vitaminas lipossolúveis, especialmente vitaminas A e E, o que poderia ser compensado com o aumento no consumo de frutas e hortaliças.

O resultados benéficos obtidos observado nas pesquisas clínicas realizadas, associados à elucidação dos mecanismos de absorção destes compostos pelo organismo humano, sugerem um papel importante dos fitosteróis e estanois na alimentação contemporânea, além de apresentarem-se como adjuvantes importantes no tratamento da hipercolesterolemia e, conseqüentemente, na prevenção da doença arterial coronariana.

REFERÊNCIAS

1. Law MR. Plant sterol and stanol margarines and health. *Br Med J* 2000; 320:861-864.
2. Pollak OJ. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* 1953;7:702-6.
3. Nguyen TT. The cholesterol-lowering action of plant stanol esters. *J Nutr* 1999;129:2109-12.
4. Awad AB, Fink C. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J Nutr* 2000;130:2127-30.
5. Baker VA, Hepburn PA, Kennedy SJ, Jones PA, Lea LJ, Sumpter JP, Ashby J. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of in vivo and in vitro assays. *Food Chem Toxicol* 1999;37:13-22.
6. Wheihrauch JL, Gardner JMC. Sterol content of foods of plant origin. *J. Am. Diet. Assoc.* 1978;73:39-47.
7. Morton GM, Lee SM, Buss DH, Lawrence P. Intakes and major dietary sources of cholesterol and phytosterols in the British diet. *J Hum Nutr Diet* 1995;8:429-40.
8. Nair PP, Turjman N, Kissie G. Diet, nutrition intake and metabolism in populations at high and low risk for colon cancer. Dietary cholesterol, β -sitosterol and stigmasterol. *Am J Clin Nutr* 1984;40:927-30.
9. Nakashima K, Ikeda I, Fuchigami K, Shiroishi Y, Sugano M. The composition of regular meals in university refectory – with special reference to the content of sterols and dietary fiber. *J Clin Nutr* 1981;58:261-8.
10. Neil HAW, Meijer GW, Roe LS. Randomised controlled trial of use by hypercholesterolaemic patients of vegetable oil sterol-enriched fat spread. *Atherosclerosis* 2001;156:329-37.
11. Gylling H, Miettinen TA. Baseline intestinal absorption and synthesis of cholesterol regulate its response to hypolipidaemic treatments in coronary patients. *Atherosclerosis* 2002;160:477-81.
12. Jones PJH, Ntanos FY, Raeini-Sarjaz M, Vanstone CA. Cholesterol-lowering efficacy of a sitostanol-containing phytosterol mixture with a prudent diet in hyperlipidemic men. *Am J Clin Nutr* 1999;69:1144-50.
13. National Cholesterol Education Program. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Cholesterol in Adults. *JAMA* 1993;269:3015-23.
14. Maki KC, Davidson MH, Umporowicz DM, Schaefer EJ, Dicklin MR, Ingram KA, Chen S, McNamara JR, Gebhart BW, Ribaya-Mercado JD, Perrone G, Robins SJ, Franke WC. Lipid responses to plant-sterol-enriched reduced-fat spreads incorporated into a National Cholesterol Education Program Step I diet. *Am J Clin Nutr* 2001;74:33-43.
15. Miettinen TA, Puska P, Gylling H, Vanhanen H, Vartiainen E. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *N Engl J Med* 1995;333:1308-12.
16. Denke MA. Lack of efficacy of low-dose sitostanol therapy as an adjunct to a cholesterol-lowering diet in men with moderate hypercholesterolemia. *Am J Clin Nutr* 1995;61:392-6.
17. Hallikainen MA, Sarkkinen ES, Gylling H, Erkkilä AT, Uusitupa MU. Comparison of the effects of plant sterol ester and plant stanol ester-enriched margarine in lowering serum cholesterol concentrations in hypercholesterolaemic subjects on a low-fat diet. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:715-725.
18. Judd JT, Baer DJ, Chen SC, Clevidence BA, Muesing RA, Kramer M, Meijer GW. Plant sterol esters lower plasma lipids and most carotenoids in mildly hypercholesterolemic adults. *Lipids* 2002;37:33-4.
19. Lottenberg AMP, Nunes VS, Nakandakare ER, Neves M, Bernik M, Santos JE, Quintão ECR. Eficiência dos ésteres de fitoesteróis alimentares na redução dos lípides plasmáticos em hipercolesterolemicos moderados. *Arq Bras Cardiol* 2002;79:139-42.
20. Hallikainen MA, Sarkkinen ES, Uusitupa MIJ. Plant stanol esters affect serum cholesterol concentrations of hypercholesterolemic men and women in a dose-dependent manner. *J Nutr* 2000;130: 767-76.

21. Plat J, van Onselen ENM, van Heugten MMA, Mensink RP. Effects on serum lipids, lipoproteins and fat soluble antioxidant concentrations of consumption frequency of margarines and shortenings enriched with plant stanol esters. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:671-7.
22. Ostlund Jr RE, Spilburg CA, Stenson WF. Sitostanol administered in lecithin micelles potently reduces cholesterol absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 1999;70:826-31.
23. Ostlund Jr RE, Racette SB, Okeke A, Stenson WF. Phytosterols that are naturally present in commercial corn oil significantly reduce cholesterol absorption in humans. *Am. J Clin Nutr* 2002;75:1000-4.
24. Vanhanen HT, Blomqvist S, Ehnholm C, Hyvonen M, Jauhainen M, Torstila I, Miettinen TA. Sitostanol ester in dietary oil reduces serum cholesterol. Effect on serum plant sterols and cholesterol precursors. *J Lipid Res* 1993;34:1535-44.
25. Tammi A, Rönnemaa T, Valsta L, Seppänen R, Rask-Nissilä L, Miettinen TA, Gylling H, Viikari J, Anttolainen M, Simell O. Dietary plant sterols alter the serum plant sterol concentration but not the cholesterol precursor sterol concentrations in young children (the STRIP study). *J Nutr* 2001;131:1942-5.
26. Heinemann T, Kullak-Ublick GA, Pietruck B, von Bergmann K. Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol. *Eur J Clin Pharmacol* 1991;40(Suppl 1):S59-S63.
27. Becker M, Staab D, von Bergmann K. Treatment of severe familial hypercholesterolemia in childhood with sitosterol and sitostanol. *J Pediatr* 1993;122:292-6.
28. Gylling H, Puska P, Vartiainen E, Miettinen TA. Serum sterols during stanol ester feeding in a mildly hypercholesterolemic population. *J Lipid Res* 1999;40:593-600.
29. Sanders DJ, Minter HJ, Howes D, Hepburn PA. The safety evaluation of phytosterol esters. Part 6. The comparative absorption and tissue distribution of phytosterols in the rat. *Food Chem Toxicol* 2000;38:485-91.
30. Westrate JA, Meijer GW. Plant-sterol enriched margarines and reduction of plasma total and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:334-43.
31. Xu G, Salen G, Tint GS, Batta AK, Shefer S. Campestanol (24-methyl-5 α -cholestan-3 β -ol) absorption and distribution in New Zealand White rabbits: effect of dietary sitostanol. *Metabolism* 1999;48:363-8.
32. Salen G, Ahrens EHJ, Grundy SM. Metabolism of β -sitosterol in man. *J Clin Investig* 1970;49:952-67.
33. Lu, K, Lee M-H, Patel SB. Dietary cholesterol absorption; more than just bile. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12(7):314-20.
34. Allayee, H, Laffitte, BA, Lusis AJ. Biochemistry. Na absorbing study of cholesterol. *Science* 2000;290, 1709-11.
35. Igel M, Giesa U, Lütjohann D, von Bergmann K. Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *J. Lip. Res.* 2003;44:533-8.
36. Chen, HC. Molecular mechanisms of sterol absorption. *J. Nutr.* 2001;131: 2603-5.
37. Jones PJ, Raeni-Sarjaz M. Plant sterols and their derivatives: the current spread of results. *Nutr Rev* 2001;59:21-4.
38. Noakes M, Clifton P, Ntanos F, Shrapnel W, Record I, McInerney J. An increase in dietary carotenoids when consuming plant sterols or stanols is effective in maintaining plasma carotenoid concentrations. *Am J Clin Nutr* 2002;75:79-86.
39. Hepburn PA, Horner AS, Smith M. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 2. Subchronic 90-day oral toxicity study on phytosterol esters – a novel functional food. *Food Chem Toxicol* 1999;37:521-32.
40. Department of Health and Human Services, Food And Drug Administration. 21 CFR Part 101: food labeling health claims; plant sterol/stanol esters and coronary heart disease, interim final rule. *Fed Reg* 2000;65:54686-739.
41. Hasler CM, Kundrat S, Wool D. Functional foods and cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 2000;2:467-75.
42. Condo Jr AM, Baker DC, Moreau RA, Hicks KB. Improved method for the synthesis of trans-feruloyl- β -sitostanol. *J Agric Food Chem* 2001;49:4961-4.

Recibido: 20-10-2003

Aceptado: 11-06-2004

Lipemia postprandial en adultos jóvenes de diferentes etnias en Colombia

Cecilia Aguilar de Plata¹, Maria Teresa Velasco de Echeverri², Beatriz Gracia de Ramírez³, Alberto Pradilla Ferreira⁴, Martha Liliana Cruz Naranjo⁵, Mildrey Mosquera Escudero⁶

Departamento de Ciencias Fisiológicas. Universidad del Valle. Colombia^{1,2,6}, Departamento de Pediatría. Universidad del Valle. Colombia³, Escuela de Salud Pública. Universidad del Valle. Colombia⁴, Departamento de Medicina Preventiva. Universidad de California del Sur. Estados Unidos de América⁵

RESUMEN. La lipemia postprandial como factor asociado a aterogénesis está correlacionada con el desarrollo de Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT). Con el objetivo de determinar factores que modifican lipemia postprandial en respuesta a ingesta mixta de carbohidratos-lípidos en adultos jóvenes de diferentes etnias, se realizó estudio descriptivo no aleatorio con 51 sujetos (23.8±4 años) sanos, con registro de datos personales, clasificación étnica; Test Corto Insulina, prueba de lipemia postprandial, cálculo de índice masa corporal (IMC) y Área Bajo la Curva(ABC) para evaluación postprandial. Alta porcentaje (80%) con antecedentes familiares de ECNT y sedentarismo. Los resultados mostraron promedios altos de ABC de glucosa, triglicéridos y Ácidos Grasos No Esterificados(AGNE); El ABC de glucosa con diferencias por edad(p<0.05), sin diferencias por etnia, género, IMC o sensibilidad a insulina. La curva de trigliceridemia mostró dos picos en mestizos (40%) y tres en negros (27%). Sujetos con patrón de cuatro picos tenían IMC elevado; igualmente fue mayor en blancos y mestizos que en negros (p<0.05); mayor en grupo mayores de 29 años y en hombres(p<0.05). El cambio en trigliceridemia sin diferencias por etnia, mayor en hombres(p<0.05) y en sujetos mayores (p<0.05). Correlación (r²=0.70) entre IMC y trigliceridemia, entre IMC y cambio en trigliceridemia en etnias blanca y negra. Los AGNE descendieron hasta las 2 horas y a las 6-7h alcanzaron concentración mayor que la basal. ABC de Triglicéridos y AGNE mayores que lo reportado. Por alta correlación en casi todas las etnias IMC sería un posible indicador de magnitud de trigliceridemia postprandial. Existe respuesta anormal a dieta de grasa, con liberación temprana de AGNE.

Palabras clave: Lipemia postprandial, etnia, factores de riesgo, enfermedades crónicas no trasmisibles, glicemia postprandial.

SUMMARY. Postprandial lipemia in Colombian young adults from different ethnias. Postprandial lipemia has been associated with atherogenesis an other non infectious chronic diseases. A descriptive, non aleatory study of 51 healthy young adults (23.8 ± 4 years) of different ethnic background was carried out to identify possible personal or life style factors associated with the response of plasma lipids after a mixed carbohydrate and lipid load. Personal, family, life styles including use of drugs and activity and ethnic background were recorded. Anthropometrical measurements, a short insulin and postprandial lipemia tests were done. From these observations body mass index (BMI) and area under the curve (AUC) for lipids and glucose were calculated. High mean values were observed in AUC for glucose, triacylglycerol and nonesterified fatty acids (NEFA). Postprandial glucose with differences by age (p=0.05 Bonferroni) but no ethnic, gender, BMI or insulin sensitivity related significant differences were found. Mestizos (40%) showed two, and Negroes three (27%) postprandial triglyceridemia peaks. Noteworthy, subjects presenting four peaks had elevated BMI. Higher triglyceridemia values were found in white and mestizos (p<0.05), in subjects older than 29 and in males(p<0.05). Statistical correlation (r²=0.70) between BMI and triglyceridemia and change in postprandial triglyceridemia was found in white and black subjects. NEFA declined up to the second hour, but at 6-7 hours they reached levels higher than base values. Higher than reported values for UCA and BMI and an abnormal response to fat intake with an early release of NEFA was found. The high correlation between BMI and postprandial triglyceridemia suggests that body mass index could be a good predictor of postprandial triglyceridemia.

Key words: Postprandial lipemia, ethnic, risk factors, chronic non transmitted diseases, postprandial glicemia.

Procedencia de apoyo:Trabajo financiado por: El Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas" - COLCIENCIAS y La Universidad del Valle.

Abreviaturas: IMC: Índice de Masa Corporal, AGNE: Ácidos Grasos No Esterificados, ECNT: Enfermedades Crónicas No Transmisibles, ABC: Área Bajo la Curva, ECV: Enfermedad Cardiovascular, TCFI: Test Corto de Tolerancia a la Insulina, TG: Triglicéridos, LDL-C: Colesterol en lipoproteína de baja densidad. HDL-C: Colesterol en lipoproteína de alta densidad, VLDL-C: Colesterol en lipoproteína de muy baja densidad. C/C: Relación cintura / cadera.

INTRODUCCION

Estudios realizados en población hispánica y caucásica muestran que tanto niños como adultos de origen hispano son más obesos, tienen mayor relación cintura/cadera (C/C), mayor resistencia a la insulina, niveles similares de adiposidad y mayor distribución central de grasa (1). En general estos grupos en países de altos ingresos son los de menor ingreso y no

representan una etnia en particular.

Más recientemente se ha demostrado la importancia de las alteraciones en la lipemia postprandial como factor de riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular (ECV) en población aparentemente sana. Los estudios sugieren que en adultos las alteraciones en el metabolismo postprandial pueden contribuir o ser ellas mismas factores determinantes en el desarrollo y progresión de lesiones de aterosclerosis (2) y también que las alteraciones del perfil lipídico como hipertrigliceridemia, bajas concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y la presencia de partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) pequeñas y densas están relacionadas con la duración prolongada de la lipemia postprandial (3).

En niños se ha observado que existe asociación entre una prolongada respuesta postprandial de triglicéridos (TG) a una ingesta de grasa y concentración alta de triglicéridos con concentraciones bajas de HDL-C en ayunas. En adultos, esto mismo se atribuye a interacciones metabólicas entre HDL-C y lipoproteínas ricas en triglicéridos. De acuerdo con lo anterior se podría pensar en predictores comunes de concentraciones postprandiales para adultos y niños (4).

Debido a la escasez de estudios epidemiológicos y a la observación de que la concentración de ácidos grasos no esterificados (AGNE) es muy variable entre individuos dependiendo de su estado nutricional, de su actividad física, de situaciones de stress y del hábito de fumar, no se han considerado las concentraciones elevadas de AGNE en plasma como factores de riesgo para enfermedad coronaria, pero se piensa que las alteraciones en los mecanismos de regulación de estos niveles como por ejemplo resistencia a insulina, e hipertrigliceridemia entre otros, particularmente en el período postprandial si podrían estar relacionadas con el desarrollo de factores de riesgo (5).

Actualmente en Colombia, el 35% de las causas de muerte lo constituyen las Enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) como diabetes, infarto agudo del miocardio, accidente cerebrovascular no hemorrágico, cáncer de colon y cáncer de seno (6-9) con el consecuente alto costo social reflejado en la disminución de años de vida productiva y tratamientos médicos de costos elevados.

En estudios realizados en varios países se ha reportado que algunos grupos étnicos tienen un mayor riesgo de desarrollar estas enfermedades, cuando son sometidos a cambios en el estilo de vida caracterizado por dietas de alta densidad calórica y poca práctica de actividad física. Lo anterior sugiere que estas poblaciones posiblemente presentan alteraciones en el metabolismo de lípidos, tales como una mayor permanencia de estos en el plasma y una disminución en la concentración de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), lo cual influye en el desarrollo de ECV. Se ha encontrado por ejemplo que la

alteración en el metabolismo postprandial de TG en respuesta a la ingestión de grasa puede estar asociada a resistencia a insulina y al riesgo de padecer ECV (10). Igualmente se ha observado en estas poblaciones una mayor prevalencia de resistencia a insulina asociada al desarrollo de ECNT (11,12).

Como es poco el conocimiento que se tiene sobre el manejo postprandial de lípidos y sobre la existencia en la población latinoamericana en este caso de nacionalidad colombiana, de posible asociación entre alteraciones en el estado postprandial y el pertenecer a un grupo étnico, el objetivo del presente estudio fue determinar la probable influencia del origen étnico sobre: la lipemia postprandial, el comportamiento del proceso postprandial en respuesta a una comida rica en grasa, y la relación con factores de riesgo de ECNT como son el Índice de Masa Corporal (IMC), la edad, el género y la resistencia a insulina.

MÉTODOS

Estudio descriptivo no aleatorio efectuado en adultos jóvenes aparentemente sanos seleccionados de un grupo de 115 sujetos a quienes previamente se les había aplicado el test corto de tolerancia a insulina (TCTI) (13) y los siguientes criterios de exclusión: nacionalidad diferente a la colombiana, el padecer algún tipo de ECNT, consumir una dieta especial y haber presentado un cambio reciente de peso. Se les solicitó su participación voluntaria con la intención de contar con un número similar de sujetos en cada uno de los grupos étnicos. Aceptaron 15 blancos, 14 negros, 20 mestizos y 8 indígenas. El protocolo fue sometido al Comité de ética de la Universidad del Valle - Facultad de Salud y todos los participantes firmaron previamente un consentimiento informado.

A todos los participantes se les aplicó una encuesta para recolección de datos personales, antecedentes familiares y personales de ECNT, hábito de tabaquismo, consumo de medicamentos y sedentarismo, catalogando a un sujeto como sedentario cuando realiza una actividad física constante durante 30 min. y menos de 3 veces a la semana. Se tomaron las siguientes medidas antropométricas: peso en kilogramos y un decimal con una balanza marca Health o meter talla en metros y dos decimales con un tallímetro marca TANITA y se calculó el IMC mediante la fórmula: peso en kg/talla en metros al cuadrado.

Para la clasificación por grupo étnico, se utilizó el método de auto clasificación, datos del lugar de nacimiento, apellidos, procedencia geográfica de los padres y observación directa del sujeto por los investigadores para determinar características del fenotipo. Los grupos étnicos definidos fueron: blanco, negro, mestizo e indígena.

Después de 12 a 14 h de ayuno se canalizó la vena antecubital derecha y se recolectó una muestra basal de san-

gre de 7 ml en tubo seco. Enseguida se proporcionó un desayuno que suministró el 25% de los requerimientos calóricos diarios totales (calculados de acuerdo al género, edad, peso, talla, IMC y actividad física) con 64% de kcal totales derivadas de grasa, 26% de carbohidratos y 8% de proteína para un total promedio de 632 ± 140 kcal. (14). Después del desayuno se recolectaron muestras de sangre a los 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 270, 300, 360 y 420 minutos durante los cuales los sujetos solamente tomaron agua (15,16).

Las muestras de sangre fueron conservadas a 4° C (por un período menor a 1 hora) hasta separación del plasma por centrifugación a 3000 rpm por 15 min., y almacenadas a -20° C.

A la muestra en ayunas se le determinó colesterol total (CT), triglicéridos (TG), colesterol HDL (HDL-C), glucosa y AGNE y en las muestras del período postprandial se cuantificaron triglicéridos, AGNE y glucosa en el autoanalizador BTS-370 de Biosystems®, todas las muestras se cuantificaron por métodos enzimáticos, el HDL-C previa precipitación con reactivos de Biosystems® (17,18). Para el cálculo de colesterol VLDL y Colesterol LDL, se utilizaron las ecuaciones de Friedewald (19): $VLDL = TG/5$ y $C-LDL = CT - C-HDL - VLDL$. En cada una de las técnicas los coeficientes de variación no excedían de 2%.

Los AGNE se determinaron por el método de Acil-CoA Sintetasa / Acil CoA Oxidasa / Peroxidasa, mediante química húmeda marca Randox® (20) y se cuantificaron en el autoanalizador BTS-370 de Biosystems.

Como guía para la evaluación de los datos de concentración obtenidos se tuvieron en cuenta las consideraciones del Panel de Expertos en el Tercer Reporte Nacional del Programa de Educación en Colesterol de Septiembre de 2002 (21).

La lipemia postprandial, se evaluó según la línea de Dawson (22). Para glucosa, TG y AGNE ($mmol \times L^{-1} \times min$) se analizó el ABC, llamada *lipemia postprandial total o magnitud de lipemia postprandial o trigliceridemia postprandial*. Para los TG se analizó además el área entre la curva y una línea imaginaria trazada a partir de la concentración en ayunas, este valor corresponde al llamado cambio en *trigliceridemia*. También se tuvo en cuenta el comportamiento de las curvas promedio para cada uno de los metabolitos analizados, número de picos de aumento de triglicéridos durante la lipemia postprandial y la capacidad de retornar al valor en ayunas.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico SPSS 10.01. Las variables se analizaron en forma estratificada por grupo étnico, y cuando se consideró necesario se evaluaron con respecto a la edad, género, sensibilidad a insulina e IMC. Se identificaron los casos y la proporción de ellos con valores de mayor riesgo. Se tomaron también los cuartiles extremos de la distribu-

ción para el análisis y un valor de significancia $p < 0.05$

Las diferencias en la lipemia postprandial se evaluaron mediante ANOVA y se utilizaron pruebas (*post hoc*) de Bonferroni y Dunnett T3. Se determinó la correlación de Pearson entre las variables de lipemia postprandial y el IMC y se calculó el valor predictivo positivo (VPP) para los valores que mostraron correlaciones significantes.

RESULTADOS

Al iniciar el estudio se contaba con la participación de 8 sujetos de la etnia indígena pero en el momento de la prueba 6 de ellos se habían retirado por razones personales y familiares; se reportan entonces los resultados obtenidos con los dos sujetos restantes de este grupo étnico, pero no se utilizan para sacar conclusiones con respecto a las características metabólicas.

Todos los participantes eran individuos clínicamente sanos con edad promedio de 24 años y bajo consumo de tabaco. Todos se habían sometido previamente a un test corto de insulina. El 51% realiza actividad física pero de modo poco frecuente. Se observa una distribución homogénea de los grados de sensibilidad a insulina en los grupos étnicos (Tabla 1). La mitad de los casos en los grupos blanco y mestizo tenían antecedentes familiares de obesidad y diabetes y el 50% de los grupos mestizo y negro tenían antecedentes de hipertensión; 33% de los blancos y 29% de los negros con la proporción más elevada de familiares muertos por enfermedad cardiovascular.

La mayoría de los valores correspondientes al IMC, al perfil lipídico y a las ABC de glucosa, triglicéridos y AGNE, tiene medias dentro de límites considerados de bajo riesgo pero con gran dispersión excepto para HDL-C que presentó un promedio bajo. No se encontraron diferencias significativas entre estas variables (Tabla 2 y 3).

La curva de glucosa postprandial tuvo un pico de aumento seguido de disminución hasta el valor basal en un tiempo máximo de 3 h. (Figura 1). Los dos indígenas presentaron un segundo aumento a los 120 min. No se encontraron diferencias significativas en los promedios de glucosa postprandial por grupo étnico, IMC o género, como tampoco se encontraron diferencias entre el valor de glucosa en ayunas y los valores postprandiales para ninguno de los grupos analizados. Hubo diferencias en el valor de ABC ($p \leq 0.05$ Bonferroni) por edad entre el grupo de ≥ 30 años y el grupo de 24 a 26 años (Figura 2).

TABLA 1
Características generales de los sujetos según grupo étnico (n = 51)

Característica		Grupo étnico				Total
		Blanco	Negro	Mestizo	Indígena	
Genero ¹	Masculino	6(40)	8(58)	11(55)	1(50)	26(51)
	Femenino	9(60)	6(42)	9(45)	1(50)	25(49)
Edad ²	(años cumplidos)	23±2,3	24±3,8	23±3,7	34±5,6	24±4,0
Intervalos de edades*	<21	3(19)	4(29)	4(20)	11(22)	
	21-23	7(47)	2(14)	9(45)		18(35)
	24-26	4(27)	4(29)	2(10)		10(20)
	27-29		3(21)	4(20)		7(14)
	>29	1(7)	1(7)	1(5)	2(100)	5(9)
Grado de sensibilidad a la insulina *	< cuartil 25	3(20)	4(29)	6(30)		13(25)
	Cuartil 25 – cuartil 50	5(33)	2(14)	6(30)		13(25)
	Cuartil 50 – cuartil 75	3(20)	5(36)	4(20)	1(50)	13(25)
	> cuartil 75	4(27)	3(21)	4(20)	1(50)	12(25)
Practica de deporte*		6(40)	5(36)	13(65)	2(100)	26(51)
Consumo de medicamentos*		4(27)	2(14)	3(15)	2(100)	11(22)
Fuma*		2(13)		5(25)		7(14)
Total		15	14	20	2	51

³ Número (Porcentaje)

⁴ Promedio ± Desviación estándar

TABLA 2
Niveles promedio ($X \pm DS$) de los parámetros bioquímicos del perfil lipídico e IMC de los sujetos de acuerdo al grupo étnico

Variables	Grupo étnico				Total
	Blanco	Negro	Mestizo	Indígena	
Perfil lipídico E IMC					
C-total (mmol/L)	41,1 ±9,9	43,2 ±7,8	40,8 ±7,5		42,1 ±8,3
	26,8 – 55,9	34,8 – 67,3	26,3- 58,2	48,4 – 55,9	26,3 – 67,3
LDL-C (mmol/L)	25,5 ±6,8	28,6 ±7,0	27,3 ±8,1		27,6 ±7,5
	15,3-39,0	22,4 – 50,2	14,8 – 50,4	32,8 – 40,8	14,8 – 50,4
HDL-C (mmol/L)	9,4 ±2,1	10,4 ±2,3	9,4 ±2,9		9,6 ±2,6
	6,5-13,8	7,8-16,1	5,5-17,7	6,0-10,9	5,5 – 17,7
TG (mmol/L)	1,3 ±0,8	0,9 ±0,4	1,0 ±0,5		1,1 ±0,6
	0,5-3,1	0,6-1,8	0,4-2,0	1,0-1,9	0,4-3,1
IMC (kg/m ²)	21.6 ±2.3	22.6 ±2.7	22.9 ±2.7		22.4 ±2.6
	18.6 - 26	19.5 - 30.8	18.4 - 27.0	20.3 - 24.2	18.4 - 30.8

TG: Triglicéridos, LDL-C: Colesterol en lipoproteína de baja densidad. HDL-C: Colesterol en lipoproteína de alta densidad. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$)

TABLA 3

Niveles promedio ($X \pm DS$), Desviación estándar, mínimo y máximo de las Areas Bajo la Curva postprandial de glucosa, triglicéridos, AGNE y de cambios en triglicéridos por grupo étnico expresado en $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

Areas bajo La curva	Grupo étnico				
	Blanco	Negro	Mestizo	Indígena	Total
Glucosa	2023±204 1629 - 2743	1885±150 1721 - 2189	1985±211 1696 - 2686	1718 - 2180	1966±231 1629 - 2743
Triglicéridos	695 ± 480 357 - 2001	476 ± 227 261 - 1109	640 ± 289 255 - 1185	457 - 1261	619 ± 355 255 - 2001
AGNE	334±127 154 - 634	360±180 115 - 786	299±114 95 - 490	180-299	324±137 95 - 786
Cambio en trigliceridemia	164±193 -15- 685	82±101 -11 - 379	205±186 -51 - 702	37 - 457	161±175 -51 - 702

AGNE: Acidos grasos no esterificados.
No se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$)

FIGURA 1

Valores promedio postprandiales de glucosa, AGNE y TG en los diversos grupos étnicos según tiempo.
A: Glucosa, B: AGNE y C: TG. (\diamond) Blancos, (n) Negros, (s) Mestizos, (o) Indígenas. TG: Triglicéridos, AGNE: Acidos grasos no esterificados

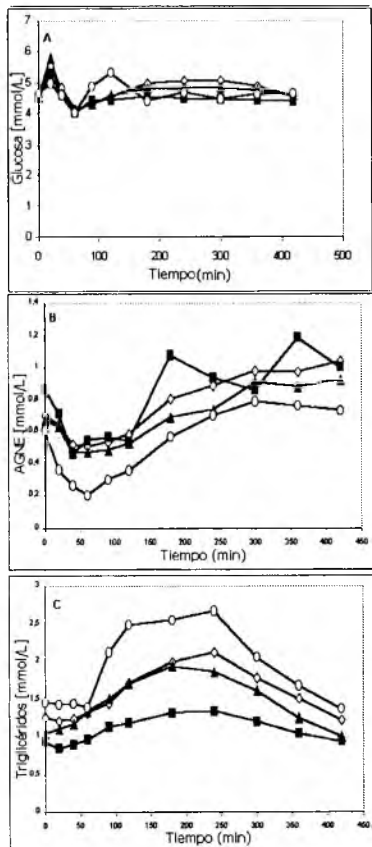
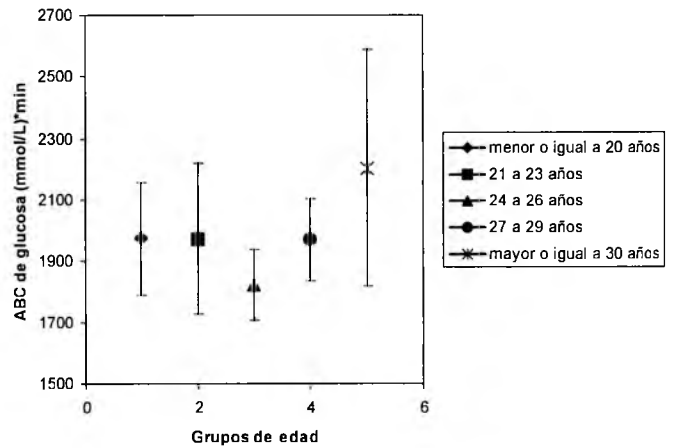


FIGURA 2

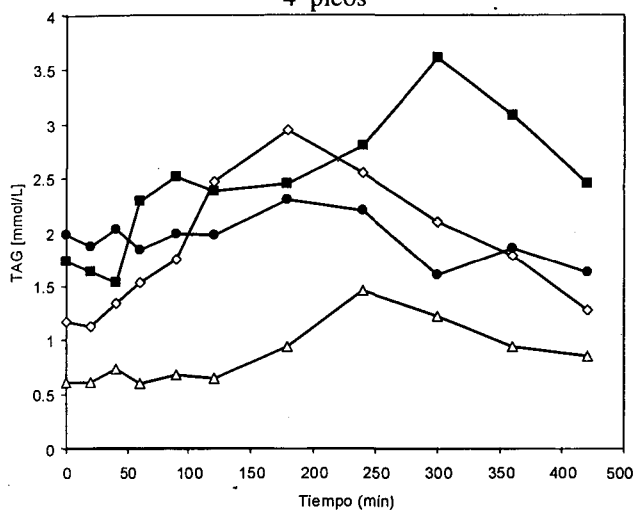
Area bajo la curva de glucosa por grupo de edad. Promedios \pm Desviación estándar. Diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupo de 24 a 26 años y grupo de mayores o igual a 30



El patrón de las curvas postprandiales de TG fue menos homogéneo (Figura 1). Se presentó un aumento progresivo de la concentración hasta alcanzar un valor máximo a las 3 o 4, en la mayoría de los sujetos y disminución posterior. En los menores de 20 años el valor máximo se alcanzó a las 2 h. El 41% del grupo presentó un pico de aumento, el 37% dos, 18% tres y el 4% cuatro. Este último grupo se encontró en el cuartil superior de IMC (Figura 3). Los dos indígenas presentaron un pico a las 2h y otro a las 4 h. El 40% de los mestizos presentaron 2% y el 27% de los negros 3 picos de aumento.

FIGURA 3

Comportamiento postprandial de valores promedio de TG en el tiempo. (◇) Un pico, (□) 2 picos, (Δ) 3 picos y (●) 4 picos



El 31% de los sujetos tuvieron a las 7h del período postprandial un valor de TG mayor a su valor en ayunas y tenían adicionalmente otras características comunes como pertenecer principalmente a la etnia mestiza (44%), estar ubicados en los grupos de mayor edad (56%) y en los cuartiles superiores de IMC. Además hubo porcentajes importantes de alteraciones en el perfil lipídico como 30% con triglicéridos elevados, 62% con LDL-C aumentado y 87.5% con valores bajos de HDL-C.

Los niveles de trigliceridemia postprandial fueron mayores en blancos que en negros ajustando por género (Dunnnett $T3 < 0,05$) y mayores en blancos y mestizos que en negros ajustando por IMC y género (Bonferroni $p \leq 0,05$). Fueron más elevados en individuos >29 años al comparar con los tres primeros grupos de edad (≤ 20 años, 21 a 23 años y 24 a 26 años) (Dunnnett $< 0,05$). La trigliceridemia fue mayor en los hombres (Bonferroni $< 0,05$) (Figura 4).

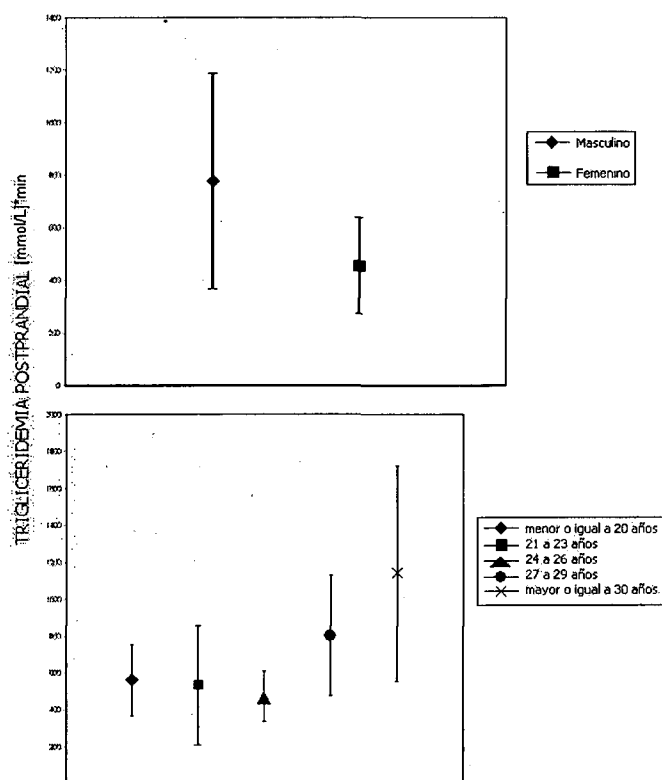
Las concentraciones plasmáticas de AGNE disminuyeron en las primeras dos horas de la ingesta y ascendieron en las horas 6 y 7 a niveles superiores al basal (Figura No. 1). La etnia negra presentó dos incrementos. Las curvas postprandiales muestran gran variación de los valores de AGNE entre los grupos considerados por etnia, edad, género y por grado de sensibilidad a insulina. No se encontraron diferencias en el área bajo la curva de AGNE para ninguna de las variables analizadas.

La correlación de Pearson fue significativa entre IMC y trigliceridemia; entre IMC y el cambio en trigliceridemia en

blancos y entre IMC y el cambio en trigliceridemia en etnia negra. (Tabla 4). El cálculo del valor predictivo positivo (VPP) entre trigliceridemia e IMC fue de 87.5% y entre el cambio en trigliceridemia y el IMC fue 55.6%.

FIGURA 4

Valores promedio ($X \pm DS$) de trigliceridemia postprandial por género y grupos de edad



A. Trigliceridemia postprandial por género. ($p < 0,05$). B. Trigliceridemia postprandial por grupo de edad. El grupo >29 años diferente a los 3 primeros grupos ($p < 0,05$)

El cambio en trigliceridemia fue mayor en hombres ($p = 0,000$ ANOVA) y en mayores de 27-29 años ($p = 0,004$ Bonferroni). No se encontró diferencia por grupo étnico. La correlación entre el cambio en trigliceridemia y la trigliceridemia postprandial total en cada grupo étnico, fue mayor en blancos ($R^2 = 0,70$), y menor para etnia negra ($R^2 = 0,38$).

TABLA 4
Correlación entre IMC y lipemia postprandial y entre triglicéridemia postprandial y cambio en triglicéridemia por grupos étnicos. La correlación es significativa * $p < 0,01$ (Pearson), y † $p < 0,05$

	Blanco	Negro	Mestizo
Glucosa postprandial (mmolxL ⁻¹ x min ⁻¹)	,124	,498	,326
Triglicéridos postprandial (mmolxL ⁻¹ x min ⁻¹)	,786*	,722*	,312
AGNE Postprandial (mmolxL ⁻¹ x min ⁻¹)	,165	-,099	-,146
Cambio triglicéridemia postprandial (mmolxL ⁻¹ x min ⁻¹)	,557†	,644†	,137
Correlación entre triglicéridemia postprandial y cambio en triglicéridemia	,835*	,616†	,740*

* La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

† La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

DISCUSION

Diversos estudios han mostrado que individuos que comparten origen étnico similar pueden experimentar tasas distintas de enfermedades crónicas cuando viven en áreas geográficas y/o culturales diversas o cuando están expuestos a cambios en estilos de vida. Se ha sugerido que ciertas poblaciones o grupos étnicos que se han adaptado a condiciones desfavorables de alimentación y con labores físicas desgastantes llegan a ser más susceptibles a las ECNT cuando se exponen al estilo de vida occidental caracterizado por sobrenutrición y disminución de la actividad física. Existe una considerable evidencia de que en Colombia como en otros países en desarrollo el aumento en la esperanza de vida esta asociado con cambios predecibles en el patrón de enfermedad y salud, lo anterior tiene gran relevancia con respecto a la situación en Colombia ya que las ECNT han aumentado dramáticamente en los últimos 20 años (23).

En el presente estudio se evalúa la respuesta postprandial entre los diferentes grupos étnicos en sujetos que se han mantenido en su país de origen y se pretende determinar de esta manera si lo reportado en otros estudios con respecto a población hispana se debe a características propias de esta población o a los cambios sufridos por ésta al desplazarse a otros países.

Las dificultades para la identificación de etnias se hicieron aparentes desde un principio como ha sido reportado en varios estudios (24). En la población colombiana, según las publicaciones de la Expedición Colombia realizada por la Universidad Javeriana, hay una gran mezcla de etnias. Por lo tanto la clasificación étnica se efectuó por características fenotípicas y de origen (25,26). Si bien es cierto que el grupo investigado constituido por adultos jóvenes no muestra ninguna evidencia de asociación entre la etnia y la mayoría de las variables de la lipemia postprandial, al examinar los individuos dentro de cada etnia para la triglicéridemia postprandial, se observaron diferencias al ajustar con otras variables como IMC y género. Lo anterior está de acuerdo con un estudio

realizado en Estados Unidos (27) con mujeres afro-americanas y blancas en el cual no se hallaron diferencias en la lipemia postprandial entre estos dos grupos pero el aumento de ésta en respuesta a una ingesta alta en grasa fue similar.

Se han encontrado diferencias en los niveles de ingreso asociados con la presencia de enfermedades crónicas en varios países del mundo; poblaciones hispana, africana, asiática que habitan en países de altos ingresos generalmente tienen un nivel socioeconómico inferior a la población blanca (28), pero este hecho que parecía justificar la alta prevalencia de estas enfermedades en esos grupos, no explica el por qué en este estudio en sujetos colombianos se encontraron alteraciones en la lipemia postprandial; la adopción por parte de la población hispana de los estilos de vida de propios países desarrollados en cuanto a nutrición y actividad física se refiere podría ser una hipótesis.

La comparación de este grupo de individuos con otros de estudios similares se ha dificultado por la falta de características comunes. En este caso la mayoría de los participantes fueron adultos jóvenes posiblemente con mayor capacidad de adaptación fisiológica frente al proceso de disminución de sensibilidad a la insulina, al desarrollo de hipertensión y a estados de dislipidemias excepto en el caso de HDL-C que fue la única variable del perfil lipídico que se encontró con valores considerados de riesgo (21). Solamente se registró como observación general actividad física poco frecuente y esto último podría explicar en parte el hecho de que estos individuos manejaran valores postprandiales más altos que los esperados. La importancia de la actividad física como factor preventivo se demostró en un estudio realizado en mujeres postmenopáusicas por Gill *et al* (29) en el cual evaluaron el efecto que sobre la lipemia postprandial tenía el ejercicio comparado con restricción dietaria y se demostró un mejor manejo de los lípidos en el período postprandial en las mujeres que realizaron actividad física frente a un grupo control y frente a las mujeres que recibieron una dieta con menor cantidad de energía; igualmente se encontró disminución de la lipemia postprandial, de los triglicéridos en ayunas y de las concen-

traciones postprandiales de insulina en las mujeres que hicieron ejercicio.

El comportamiento observado de la glucosa postprandial similar al reportado por K. Frayn (30), permite confirmar que la glucosa es el metabolito mejor regulado en el organismo y que por tanto su cuantificación en estado de ayuno se debe acompañar con la determinación de otras variables para la identificación temprana de factores de riesgo de ECNT. Con respecto a la aparición del segundo pico de aumento de glucosa en los indígenas, esta observación no se puede generalizar debido al escaso número de participantes pertenecientes a esta etnia, pero debe ser tenido en cuenta en estudios similares. El mayor valor de ABC de la glucosa en los sujetos ≥ 30 años posiblemente refleja un estado inicial de la resistencia a insulina y la incapacidad de responder eficientemente a ésta ya que estos individuos se encontraban en los grupos de menor sensibilidad a la hormona (resultados no mostrados).

Una observación preocupante en los resultados del presente estudio con participantes que son latinoamericanos de nacionalidad colombiana, fue la trigliceridemia postprandial con valores mayores a los reportados en estudios con el mismo tipo de análisis realizado en sujetos de Inglaterra y Estados Unidos (15,31) pues se conoce que en individuos sanos el aumento de la concentración de triglicéridos en plasma después de una ingesta de grasa es 2 veces la concentración basal e implica una serie de cambios coordinados en el metabolismo de lípidos que llevan de un lado a la supresión del paso de triglicéridos al plasma y del otro al aumento de la captura de triglicéridos plasmáticos; entonces, cualquier alteración en estos dos procesos seguramente lleva a perturbación de la lipemia postprandial situación reconocida como factor de riesgo de ECV. Condiciones como edad, género, obesidad, diabetes e ingesta de azúcares simples y la carga de grasa de la dieta, son factores que afectan la lipemia, por ejemplo, los carbohidratos parecen ser determinantes de la naturaleza pero no de la magnitud de la lipemia postprandial (32). También vale la pena resaltar que un alto porcentaje de estos individuos que no fueron capaces de retornar a su valores basales en un periodo de 7 horas, presentaron valores alterados de perfil lipídico (21) para este rango de edad lo cual constituye un factor de riesgo si no se toman las medidas adecuadas de prevención.

Los resultados sobre la respuesta postprandial de triglicéridos de manera similar a los reportados en otros estudios muestran un aumento inicial gradual, y un pico entre 2 y 5h seguido de disminución hasta el valor basal en la mayoría de los sujetos. Concentraciones entre 0.66-1.76 mmol/L se consideran normales en individuos sanos con media de 1.1 mmol/L. Cuando se proporciona una comida con 30% de energía proveniente de grasa, que representa 1/3 de la ingesta de energía diaria del individuo, la concentración postprandial de triglicéridos alcanza un pico de 1.65-1.98 mmol/L entre

3 y 5 h más tarde. Se consideran hipertrigliceridémicos los sujetos con valor en ayunas por encima de 2.2 mmol/L. Generalmente, estos individuos alcanzan valores de 3.3 ó 4.4 mmol/L un poco más tarde. Los sujetos del presente estudio no encajaban dentro de la clasificación de hipertrigliceridémicos al utilizar el valor en ayunas, pero al analizar los valores postprandiales se observaron concentraciones mucho mayores que las esperadas, evidenciando un manejo postprandial alterado.

Aun cuando en algunos estudios se reporta que la curva de triglicéridos postprandiales es monofásica, también se han reportado hasta 3 picos, número que es independiente del valor en estado de ayuno. Se ha observado por ejemplo, que la curva bifásica aparece en individuos que consumen una comida de prueba 5 h después de otra como el desayuno; otros pocos sujetos presentan esta modalidad de curva después del período de ayuno. Según Fielding *et al.* la composición de la dieta es uno de los determinantes de estos patrones que también reflejan la velocidad de absorción intestinal. La curvas con más de un pico ya fueron reportadas y como lo sugieren Shishebor *et al.* este patrón refleja por un lado la velocidad de absorción intestinal de grasa influenciada por múltiples factores y por el otro la grasa previamente almacenada en las paredes del intestino delgado o de los vasos linfáticos y que se puede liberar a la circulación. Fielding *et al.* sugieren que el patrón de picos de la curva de triglicéridos postprandiales refleja la composición en grasa de la comida anterior a la prueba y que en condiciones de ayuno no se observa más de un pico. Sin embargo, en estudios anteriores como el de Cohn *et al.* aparecen reportadas curvas de triglicéridos postprandiales con más de un pico en sujetos en estado de ayuno que han recibido carga de grasa, esta última condición es similar a la del presente estudio con individuos cuya costumbre alimentaria estilo occidental se caracteriza por un menor tiempo transcurrido entre el consumo de comidas y alto contenido de grasa en las mismas (datos no incluidos en el presente reporte). Así pues, si se tiene un consumo constante de grasa, la liberación de ésta a la circulación muestra patrones con más de un pico de aumento e incapacidad para volver al valor basal como se pudo observar (15,32-34).

Con respecto a los ácidos grasos no esterificados (AGNE), K. Frayn (5) ha reportado que su concentración en plasma varía considerablemente y tiene un marcado ritmo circadiano: más alta en la mañana y va disminuyendo durante el día. Hay una disminución considerable post-ingesta y aumento gradual durante la noche, estos niveles se ven afectados por hábitos dietarios como frecuencia de ingesta de alimentos y composición de los mismos. En el presente estudio se observó la liberación temprana de AGNE a la sangre cuando aún no se ha terminado el período postprandial. Esto indicaría que los sujetos inician tempranamente síntesis de C-VLDL cuando aún tienen circulando en sangre los quilomicrones de la die-

ta. Ahora, la permanencia en plasma de C-VLDL permite que las C-LDL y HDL-C se enriquezcan en triglicéridos y que el aumento en el recambio de triglicéridos y de ésteres de colesterol entre estas lipoproteínas favorezca el proceso aterogénico (10). Por otro lado, la liberación de AGNE a la circulación portal puede desempeñar un papel muy importante en la alteración del metabolismo hepático propio del síndrome de resistencia a insulina y favorecer los estados de dislipidemia, hiperinsulinemia e intolerancia a glucosa (5).

Es interesante que como lo describe L. Berglund, los sujetos con patrones postprandiales alterados tienen varias características del síndrome de resistencia a la insulina, incluyendo altas concentraciones de triglicéridos e insulina en ayunas, altos depósitos de grasa visceral, y un alto índice arterial (CT / HDL-C), variables que se consideran actualmente mejores indicadores de alteraciones en el metabolismo (35). Adicionalmente, en este estudio se hizo evidente que estas variables asociadas a otros indicadores como IMC podrían ser considerados predictores del comportamiento postprandial y también que el metabolismo postprandial puede no necesariamente tener como única característica la obesidad.

Es preocupante que estos sujetos jóvenes ya evidencien factores de riesgo para el desarrollo de ECNT como son alteración postprandial de triglicéridos, sedentarismo y antecedentes familiares de ECNT. Es probable entonces, que la alteración en el metabolismo de lípidos como factor de riesgo sea un fenómeno más común de lo esperado en la población joven colombiana lo cual sería parte de la explicación del aumento de tasas de mortalidad específica por enfermedades crónicas en este país. El conocimiento de las diferencias en el comportamiento postprandial ayudará a la identificación en poblaciones vulnerables de factores de riesgo para ECNT y a la elaboración y ejecución de programas preventivos como parte de las políticas de salud.

CONCLUSIONES

No se encontró asociación detectable entre el pertenecer a un determinado grupo étnico y las variables de lipemia postprandial excepto para los triglicéridos. Existe una alta correlación y un alto valor predictivo positivo (VPP) entre la magnitud de la trigliceridemia postprandial y el IMC en las etnias blanca y negra, lo cual hace de esta característica antropométrica un buen indicador de posibles alteraciones postprandiales en estos grupos de sujetos.

Se encontró en todos los participantes una respuesta anormal a una carga de grasa, con liberación de ácidos grasos no esterificados en el período postprandial cuando aún no se ha realizado por completo la remoción de triglicéridos de la circulación; este hecho no presenta ninguna asociación con otras variables estudiadas. Contrario a lo esperado, se encontró una proporción muy alta de alteraciones metabólicas y la presen-

cia de otros factores de riesgo en individuos jóvenes aparentemente sanos. El comportamiento postprandial de la glucosa en estos sujetos no se evidencia como factor de riesgo. Se observaron niveles más altos de lipemia postprandial que los reportados en otros estudios y una proporción elevada de alteraciones metabólicas en el grupo de adultos jóvenes. Este hallazgo aun cuando la muestra no es representativa, podría sugerir una de las explicaciones a la elevada mortalidad por enfermedades crónicas en la población colombiana menor de 60 años.

AGRADECIMIENTOS

A todos los personas que participaron en el estudio. A Mauricio Palacios MD y Ricardo Plata MD por el control médico durante la realización de las pruebas clínicas. Al Enfermero Germán Florez por su asistencia técnica en la parte de toma de muestras. A Biosystems DRS S.A. por las facilidades proporcionadas en la adquisición de equipos y reactivos. Al Doctor Oscar Pineda PhD. por su valiosa aporte en la revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Cruz M, Bergman R and Goran M. Unique effect of visceral fat on insulin sensitivity in obese Hispanic children with a family history of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002; 25(9): 1631-1636.
2. Karpe F, Hamsten A. Post-prandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Curr. Opin Lipidol* 1995; 6:123-9.
3. Nikkila M Solakivi, Lehtimaki T, Laippala P, Astrom B. Postprandial plasma lipoprotein changes in relation to apolipoprotein E phenotypes and low density size in men with and without coronary artery disease. *Atherosclerosis* 1994; 106: 149-157.
4. Couch SC, Isasi CR, Karmally W, Blamer WS, Starc TJ, Kaluski D, Deckerbaum RJ, Ginsber HN, Shea S and Berglund L. Predictors of postprandial triacylglycerol response in children: the Columbia University Biomarkers Study. *Am. J. Clin Nutr* 2000; 72: 1119-1127.
5. Frayn K, Williams CM, Arner P. Are increased plasma non-esterified fatty acid concentrations a risk marker for coronary heart disease and other chronic diseases? *Clin Sci (Lond)* 1996; 90: 243-253.
6. Ministerio de Salud. La salud en Colombia, 10 años de información. Bogotá: Litografía Arco; 1994.
7. Secretaría de Salud Pública Municipal de Santiago de Cali. Salud en cifras. Cali: Editorial Secretaria; 1998.
8. Dodu SRA. Emergence of cardiovascular disease in developing countries. *Cardiology* 1988; 75:56-64.
9. Phillips DR. Urbanisation and human health. *Parasitology*. 1993; 106:S93-S107.
10. Frayn K, Coppack S. Insulin resistance, adipose tissue and coronary heart disease. Editorial review. *Clin Sci (Lond)* 1992; 82:1-8.

11. Benfante R. Studies on cardiovascular disease and cause-specific mortality in Japanese American men living in Hawaii and risk factor comparisons with other Japanese populations in the pacific region: A review. *Hum Biol.* 1992; 64:791.
12. McKeigue, Miller y Marmot Mortality from coronary Herat disease in south Asians overseas: A review. *Lancet* 1989; 337:382-86.
13. Akinmokun A, Selby PL, Ramaiya K, Alberti KGMM. The short insulin tolerance test for determination of insulin sensitivity: A comparison with the Euglycaemic clamp. *Diabet Med* 1992; 9: 432-437.
14. Sierra I, Perez C, Mendivil O, Pinzón G, Mantilla G, Gómez A. *et al.* Evaluación del comportamiento del perfil de lípidos postingesta de un desayuno de prueba en jóvenes sanos de la Universidad Nacional de Colombia, 2000. *Revista Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.* 2001; 49(3): 141-147.
15. Thomsen C, Rasmussen O, Lousen T, Holst JJ, Fenselau S, Schrezenmeir J, Hermansen K. Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects. *Am. J Clin Nutr.* 1999; 69:1135-43.
16. Fielding B, Callow J, Owen RM, Samra JS, Matthews DR, Frayn KN. Postprandial lipaemia: the origin of an early peak studied by specific dietary fatty acid intake during sequential meals. *Am J Clin Nutr.* 1996; 63:36-41.
17. Biosystems, Reagents & instruments. Barcelona España.
18. Escorcia J. Química Clínica. 1ra edición. Ed. Diseño e impresión. Bogotá 2001.
19. Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18:499-502.
20. Matsubara C, Neshikawa Y, Yoshida Y, Tateamura K. *Anal Biochem.* 1983; 130:128-133.
21. Third report of National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on: Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adults Treatment Panel III). National Institutes of Health (NIH). p. II-1 a II-60. September 2002.
22. Dawson J. Comparing treatment groups on the basis of slopes, areas-under-the-curve, and other summary measures. *Drug Information J.* 1994; 28:723-732.
23. Benfante R. Studies on cardiovascular disease and cause-specific mortality in Japanese American men living in Hawaii and risk factor comparisons with other Japanese populations in the pacific region: A review. *Hum Biol* 1992; 64: 791.
24. Chaturvedi N and McKeigue P. Methods for epidemiological surveys of ethnic minority groups. *J Epidemiol Community Health.* 1994; 48:107-111.
25. Bernal J. Terrenos de la gran expedición humana, serie reportes de investigación. Número 8. 1ra Edición. Bogotá: Fundación cultural Javeriana de artes graficas. 1999.
26. Proyecto de Documentación Ñuke Mapu, URL:<http://www.soc.uu.se/mapuche>. Oct. 1999.
27. Gerhanard G, Connor S, Wander R, Connor W. Plasma lipid and lipoprotein responsiveness to dietary fat and cholesterol in premenopausal African American and white woman. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:56-63.
28. Lockyear P. Nutritional status of young women: cultural differences in health status. *Medscape Ob/Gyn & women's health.* URL: <http://www.medscape.com/viewarticle/479849>. Junio 2004.
29. Gill J, Hardman A. Postprandial lipemia: effects of exercise and restriction of energy intake compared. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:465-471.
30. Frayn KN, *Metabolic Regulation. A Human Perspective.* 1th edition. London: Portland Press Ltda. 1996.
31. Cohn J, McNamara J, Cohn S, Ordovas J and Schaefer E. Postprandial plasma lipoprotein changes in human subjects of different ages. *J Lipid Res.* 1988; 29:469-479.
32. Frayn K. Invited commentary: Dietary factors and postprandial lipaemia. *Br J Nutr.* 1998; 80:409-410.
33. Griffin B and Fielding B. Postprandial lipid handling. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2001; 4:93-98.
34. Shishebor F, Roche HM and Gibney MJ. The effect of acute carbohydrate load on the monophasic or biphasic nature of the postprandial lipaemic response to acute fat ingestion in human subjects. *Br J of Nutr.* 1998; 80: 411-418.
35. Berglund L. Postprandial lipemia and obesity – any unique features? [editorial]. *Am j Clin Nutr* 2002;76:299-300.

Recibido: 20-10-2003

Aceptado: 08-07-2004

Efecto de un desayuno con alto contenido en grasa o en carbohidratos sobre el perfil de lípidos posprandial en individuos sanos con y sin antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2

Manuel González-Ortiz, Blanca R. Balcázar-Muñoz, José M. Mora-Martínez, Esperanza Martínez-Abundis

Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica, Hospital de Especialidades,
Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, México

RESUMEN. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un desayuno con alto contenido en grasa o en carbohidratos sobre el perfil de lípidos posprandial en individuos sanos con y sin el antecedente familiar en primera línea de diabetes mellitus tipo 2. Se realizó un ensayo clínico, ciego simple, controlado con grupos paralelos, en 20 jóvenes sanos; 10 con antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2 y 10 sin dicho antecedente. De cada grupo, la mitad de los individuos recibió al azar un desayuno con alto contenido en grasa y el resto uno alto en carbohidratos. Se determinó un perfil metabólico que incluyó medición de ayuno y posprandial de lípidos, así como estimación de la sensibilidad a la insulina. Se encontró una menor concentración del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad ($p < 0,02$) y de apolipoproteína A1 ($p < 0,03$) en el grupo con antecedente familiar diabético. En ese mismo grupo, el desayuno con alto contenido en carbohidratos condicionó un aumento en las concentraciones de apolipoproteína B al minuto 300 ($p < 0,03$) y de triglicéridos al minuto 360 ($p < 0,03$). En el grupo sin antecedente familiar de diabetes se encontró un aumento en la concentración de triglicéridos y de lipoproteínas de muy baja densidad al minuto 180 ($p < 0,03$) después del desayuno alto en grasa. En conclusión, los jóvenes sanos con el antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2 mostraron algunas características aterogénicas en su perfil de lípidos y un desayuno con alto contenido en carbohidratos ocasionó un aumento en la apolipoproteína B y en los triglicéridos; mientras que en los jóvenes sin el antecedente familiar fue la ingesta alta en grasa la que condicionó efectos desfavorables en los lípidos.

Palabras clave: Antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2, Lipemia posprandial, Apolipoproteínas, Triglicéridos.

SUMMARY . Effect of a high fat or high carbohydrate breakfast on postprandial lipid profile in healthy subjects with or without family history of type 2 diabetes mellitus. The objective of this study was to evaluate the effect of a high fat or high carbohydrate breakfast on postprandial lipid profile in healthy subjects with or without family history of type 2 diabetes mellitus. A single blind, controlled clinical trial with parallel groups was performed in 20 healthy subjects; 10 subjects with family history of type 2 diabetes mellitus and 10 individuals without that background. Each group was randomized to receive a high fat or high carbohydrate breakfast. A metabolic profile that included fasting and postprandial lipids, as well as, the assessment of insulin sensitivity were performed. Lower high-lipoprotein cholesterol ($p < 0,02$) and apolipoprotein A1 ($p < 0,03$) concentrations were found in subjects with family history of type 2 diabetes mellitus than those without that background. In this same above mentioned group with the high carbohydrate breakfast, there were significant increments in apolipoprotein B at minute 300 ($p < 0,03$) and in triglycerides at minute 360 ($p < 0,03$). In the group without family history of diabetes that received the high fat breakfast, there were increments in triglycerides ($p < 0,03$) and very-low density lipoprotein concentrations at minute 180 ($p < 0,03$). In conclusion, healthy subjects with family history of type 2 diabetes showed some atherogenic characteristics in their metabolic profile, and the high carbohydrate breakfast produced in them increments in apolipoprotein B and in triglycerides, meanwhile that, in those subjects without such background the high fast breakfast produced unfavorable effects on their lipid concentrations.

Key words: Family history of type 2 diabetes mellitus, postprandial lipid profile, Apolipoproteins, Triglycerides.

INTRODUCCION

Se ha descrito que la presencia del antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2 en primera línea puede originar en etapas preclínicas una serie de anormalidades metabólicas, dentro de las que se incluyen trastornos en la secreción y acción de la insulina (1,2). Estas alteraciones pueden anteceder por muchos años a la aparición de intolerancia a la glucosa y de diabetes mellitus tipo 2 (3,4). Dentro de las anormalidades

metabólicas observadas en individuos considerados resistentes a la insulina, el trastorno más común del perfil de lípidos es el aumento de triglicéridos y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) con una reducción en el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), lo cual podría ser ocasionado probablemente por un aumento en el catabolismo de la apolipoproteína A1 y por una reducción de la lipasa proteica (5).

La homeostasis del binomio glucosa-insulina y el meta-

bolismo de las lipoproteínas han recibido particular atención dentro del síndrome de resistencia a la insulina, el cual predecir y predice la aparición de diabetes mellitus tipo 2 (6). Existen factores de riesgo para diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular que se encuentran asociados a la concentración y composición de las diferentes fracciones de las lipoproteínas durante el estado de alimentación. Se ha reportado que una lipemia posprandial alta y prolongada se relaciona con una futura enfermedad coronaria y aterosclerosis carotídea (7).

En la actualidad, el conocimiento de la regulación de la lipemia posprandial es pobre, algunos autores apoyan la participación de la función intestinal, sin embargo, esto se encuentra aún en debate. (8). Además, existen diferentes factores que pueden influir en dicha regulación, así como en la sensibilidad a la insulina, como son la concentración sérica de triglicéridos, la tolerancia a la glucosa, la edad, el género, el tipo de dieta, la obesidad, la distribución de la grasa corporal y el genotipo de apolipoproteína E (8, 9).

Hasta el momento no se encuentra definido el efecto que tiene una dieta mal balanceada en sus componentes sobre el perfil de lípidos en sujetos de alto riesgo y que pudiera culminar en el futuro en un aumento de aterosclerosis y enfermedad de arterias coronarias (7).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de un desayuno con alto contenido en grasa o en carbohidratos sobre el perfil de lípidos posprandial en individuos sanos con y sin el antecedente familiar en primera línea de diabetes mellitus tipo 2.

MATERIAL Y METODOS

Se llevó a cabo un ensayo clínico, ciego simple, controlado con grupos paralelos, en 20 sujetos jóvenes (edad entre 18 y 26 años) voluntarios sanos y no obesos [índice de masa corporal (IMC) entre 18 y 25 kg/m²]. Diez participantes tenían antecedente familiar en primera línea por cualquiera de las dos ramas de diabetes mellitus tipo 2 y 10 sujetos carecían de dicho antecedente familiar, confirmado por historia clínica, glucosa en ayuno y, en caso necesario, curva de tolerancia oral a la glucosa. No existía el antecedente familiar de enfermedad coronaria prematura. Los sujetos se seleccionaron de la zona metropolitana de la ciudad de Guadalajara y correspondieron a un estrato socio-económico de nivel medio (10). Ninguno tenía antecedente de sedentarismo o actividad física importantes. El peso corporal de todos los individuos se había mantenido estable durante los tres meses previos al estudio. Se corroboró el estado de salud mediante una historia clínica y un examen físico completos, incluyendo presión arterial < 140/90 mmHg y glucosa en ayuno < 6,1 mmol/l. Ninguno de los participantes ingería medicamentos que pudieran afectar el metabolismo de lípidos o carbohidratos.

Todos los participantes consumieron una dieta isocalórica calculada entre 25 y 30 kcal/kg de peso que contenía más de 250 g de carbohidratos por día, durante los tres días previos a la prueba de sensibilidad a la insulina y ninguno consumió grasa de origen animal 24 h antes de la valoración de lípidos. En las mujeres participantes los estudios se realizaron durante la fase folicular (días 3 a 8) del ciclo menstrual. Todas las pruebas se llevaron a cabo a las 8:00 a.m. después de un ayuno nocturno de 12 h.

A todos los sujetos se les registró el peso y la talla con ropa ligera y sin zapatos. La talla se determinó con aproximación al medio centímetro más cercano con el sujeto de pie. El IMC se calculó con el peso (en kilogramos) dividido entre la talla al cuadrado (en metros). La presión arterial se evaluó después de un período de reposo de 5 minutos con el sujeto sentado, con un esfigmomanómetro de mercurio estándar y por el mismo investigador; la presión diastólica fue considerada con el V ruido de Korotkoff.

En una habitación tranquila del hospital participante, en posición decúbito supino, a todos los voluntarios se les extrajo una muestra sanguínea venosa la cual se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó para separar el suero en dos alícuotas. La primera alícuota se utilizó para determinar en suero creatinina, ácido úrico, glucosa, colesterol total, HDL-C, triglicéridos y apolipoproteínas A1 y B; la segunda se congeló a -20° C para determinar en un lapso no mayor a 30 días la concentración de insulina sérica. Durante el primer día de pruebas se estimó la sensibilidad a la insulina por medio de la prueba de supresión a la insulina modificada con octreótido (11), que consistió en una infusión intravenosa durante 180 minutos con glucosa a 6 mg/kg/min, insulina regular (Humulin R, Ely Lilly Co. México) a 0,77 mU/kg/min y octreótido (Sandostatina, Novartis Farma, México) a 0,5 µg/min precedida por un bolo de 25 µg. Se tomaron muestras sanguíneas a los 0, 30, 60, 120, 150, 160, 170 y 180 minutos para la medición de glucosa e insulina y con el promedio de los valores de las últimas cuatro determinaciones de glucosa e insulina se calculó el estado estacionario de glucosa (EEG) y el estado estacionario de insulina (EEI). El EEG se utilizó para estimar la sensibilidad a la insulina en los voluntarios.

Tres o cuatro días después de la realización de la prueba de sensibilidad a la insulina, los voluntarios regresaron al hospital y se llevó a cabo la medición de lípidos posprandiales. Previa asignación al azar, a los individuos de cada grupo se les suministró un desayuno matutino con alto contenido en grasa o en carbohidratos. El desayuno alto en grasa consistió en un platillo preparado con huevo, verdura y aceite vegetal, acompañado con tortilla de maíz y café endulzado con 0.8 g de endulzante bajo en calorías (Canderel, Mex.). Este desayuno de 312 kcal estaba compuesto por 12,5 g (16,0%) de carbohidratos, 19,9 g (25,5%) de proteína y 20,3 g (58,5%)

de grasa total, de la cual 32,7% era saturada, 48,5% monosaturada y 14,1% poliinsaturada con 822 mg de colesterol (4,7%). El desayuno con alto contenido en carbohidratos consistió en jugo de naranja, fruta, pan con mermelada y café endulzado con 0,8 g de endulzante bajo en calorías (Canderel, Mex.). Dicho desayuno de 298,2 kcal estuvo compuesto de 69,4 g (91,9%) de carbohidratos, 5,3 g (7,0%) de proteína y 0,38 g (1,1%) de grasa total, de la cual 36,9% era saturada, 19,8% monosaturada y 43,3% poliinsaturada sin colesterol. Antes de la administración del desayuno se colocó un catéter venoso con heparina el cual fue utilizado para la toma de muestras sanguíneas, previa extracción de 1 ml de sangre de desecho. Se tomaron muestras de sangre antes del desayuno y cada hora posteriormente en 6 ocasiones para la medición de colesterol total, HDL-C, triglicéridos y apolipoproteínas A1 y B. No se permitió la ingesta de alimentos o líquidos durante ese lapso de tiempo.

La glucosa sérica se determinó mediante la técnica de glucosa-oxidasa. Los lípidos (colesterol total, HDL-C y triglicéridos) y el ácido úrico se midieron por métodos enzimáticos. En particular el HDL-C se determinó después de una precipitación selectiva de la fracción no HDL. La creatinina sérica se midió mediante un procedimiento colorimétrico basado en la reacción de Jaffé. Todas las determinaciones se realizaron utilizando los equipos comerciales disponibles (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) con un error intra e inter-ensayo menor al 3%. Las concentraciones de insulina sérica fueron cuantificadas con técnica estándar de radioinmunoanálisis (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California, USA) con coeficiente de variación intra e inter-ensayo de 4,4% y 6,9% respectivamente. Las apolipoproteínas A1 y B se determinaron mediante nefelometría bajo las indicaciones sugeridas por el laboratorio. El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) se estimó mediante la fórmula de Friedewald ($LDL-C = \text{colesterol total} - HDL-C - \text{triglicéridos}/5$) y las VLDL se calcularon como $\text{triglicéridos}/5$.

Estadística. El tamaño de muestra de 5 voluntarios por grupo fue calculado con la fórmula para ensayos clínicos (12), con un nivel de confianza de 95%, un poder de 80% y una diferencia esperada del doble de la desviación estándar observada para cada una de las determinaciones de lípidos. Todos los valores se expresan en unidades internacionales y se presentan en media y desviación estándar. El área bajo la curva se calculó para los lípidos con la fórmula de polígonos. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar grupos no relacionados, una vez transformados los valores a escala ordinal y se consideró un nivel de significación estadística con un valor de $p < 0,05$, lo cual fue llevado a cabo con ayuda del programa SPSS, versión 10.0.

A todos los participantes se les informó con anticipación de los procedimientos y posibles inconvenientes del estudio y

se obtuvo su consentimiento informado por escrito. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del hospital y cumplió con las normas establecidas para realizar investigación en seres humanos.

RESULTADOS

El grupo con historia familiar de diabetes mellitus tipo 2 se conformó de 5 mujeres y 5 hombres; el grupo que carecía de dicho antecedente familiar consistió en 6 mujeres y 4 hombres. La edad fue similar entre ambos grupos, $21,4 \pm 2,7$ para el de antecedente y $20,6 \pm 0,8$ años para el que carecía de la historia familiar de diabetes ($p = 0,87$). El IMC fue de $23,2 \pm 1,9$ en los sujetos con antecedente y de $23,2 \pm 1,3 \text{ kg/m}^2$ en los sujetos sin antecedente ($p = 0,82$). Ambos grupos fueron similares en sus cifras de presión arterial, tanto sistólica 114 ± 4 y 111 ± 7 ($p = 0,41$) como diastólica 75 ± 6 y 73 ± 7 mmHg ($p = 0,48$), con y sin antecedente familiar de diabetes, respectivamente.

Como se muestra en la Tabla 1, el HDL-C y la apolipoproteína A1 fueron menores en el grupo con el antecedente familiar de diabetes y no existieron diferencias significativas entre ambos grupos en el resto del perfil de lípidos, en glucosa, ácido úrico, creatinina e insulina séricas, así mismo, no se presentaron diferencias significativas en lo que respecta al EEG (sensibilidad a la insulina) y al EEI.

TABLA 1
Perfil metabólico de ayuno en los individuos con y sin antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2

	Sin antecedente	Con antecedente	p
Glucosa (mmol/l)	5,0 ± 0,4	5,2 ± 0,5	0,42
Insulina (pmol/l)	102,6 ± 36,1	92,8 ± 29,4	0,13
Colesterol total (mmol/l)	4,6 ± 0,8	4,2 ± 0,8	0,38
HDL-C (mmol/l)	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,2	<0,03
VLDL (mmol/l)	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,67
LDL-C (mmol/l)	2,4 ± 0,6	2,5 ± 0,7	0,88
Triglicéridos (mmol/l)	1,1 ± 0,6	1,0 ± 0,4	0,67
Apolipoproteína A1 (mg/dl)	144,3 ± 27,5	116,7 ± 24,0	<0,04
Apolipoproteína B (mg/dl)	77,5 ± 16,7	78,4 ± 20,7	0,94
Creatinina (μmol/l)	78,6 ± 14,1	78,6 ± 13,2	1,00
Acido úrico (μmol/l)	318,8 ± 38,6	343,7 ± 95,7	0,62
EEG (mmol/l)	7,5 ± 2,5	7,2 ± 2,6	0,54
EEI (pmol/l)	313,1 ± 117,9	289,9 ± 43,4	0,88

HDL-C: Colesterol de las lipoproteínas de alta densidad.

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

LDL-C: Colesterol de las lipoproteínas de baja densidad.

EEG: Estado estacionario de la glucosa.

EEI: Estado estacionario de la insulina.

En la Tabla 2 y 3 se muestra el perfil metabólico de ayuno en los sujetos con y sin antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2 respectivamente; donde se observa que existió una mayor concentración de apolipoproteína B en el grupo con antecedente de diabetes ($p < 0,05$) y de ácido úrico en los sujetos sin antecedente de diabetes ($p < 0,01$) en los individuos que recibieron el desayuno con alto contenido en carbohidratos.

TABLA 2
Perfil metabólico de ayuno en los sujetos con antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2

	Grupo con desayuno alto en grasa	Grupo con desayuno alto en carbohidratos	P
Género (f/m)	3/2	2/3	
Glucosa (mmol/l)	5,0 ± 0,0	5,4 ± 0,7	0,34
Insulina (pmol/l)	84,2 ± 16,5	82,0 ± 28,3	0,91
Colesterol total (mmol/l)	3,7 ± 0,6	4,7 ± 0,5	0,07
HDL-C (mmol/l)	1,1 ± 0,4	1,3 ± 0,0	0,34
VLDL (mmol/l)	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,25
LDL-C (mmol/l)	2,1 ± 0,2	2,8 ± 0,7	0,07
Triglicéridos (mmol/l)	0,8 ± 0,0	1,1 ± 0,3	0,25
Apolipoproteína A-1 (mg/dl)	108,8 ± 42,2	124,6 ± 4,9	0,24
Apolipoproteína B (mg/dl)	66,9 ± 22,1	89,8 ± 25,3	<0,05
Creatinina (μmol/l)	81,3 ± 0,0	76,0 ± 18,5	0,66
Acido úrico (μmol/l)	321,1 ± 92,5	366,3 ± 54,1	0,34
EEG (mmol/l)	7,6 ± 2,2	6,9 ± 2,2	0,34
EEI (pmol/l)	278,9 ± 24,3	300,9 ± 2,7	0,25

HDL-C: Colesterol de las lipoproteínas de alta densidad.
VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.
LDL-C: Colesterol de las lipoproteínas de baja densidad.
EEG: Estado estacionario de la glucosa.
EEI: Estado estacionario de la insulina.

En el grupo con antecedente familiar de diabetes mellitus, el desayuno con alto contenido en carbohidratos aumentó significativamente la concentración de apolipoproteína B en el minuto 300 al compararse con la obtenida posterior al desayuno alto en grasa ($88,5 \pm 22,6$ vs. $62,1 \pm 8,3$ mg/dl, respectivamente; $p < 0,03$). Así mismo, los triglicéridos alcanzaron un valor más alto al minuto 360 en el grupo que recibió un desayuno alto en carbohidratos al compararse con los del grupo que recibió un desayuno alto en grasa ($1,1 \pm 0,2$ vs. $0,6 \pm 0,1$ mmol/l, respectivamente $p < 0,03$). No existieron diferencias significativas en el resto del perfil de lípidos (colesterol total, VLDL, LDL-C, HDL-C y apolipoproteína A1) en las mediciones de cada hora, ni en sus áreas bajo la curva, al comparar ambos tipos de desayuno (datos no mostrados).

TABLA 3
Perfil metabólico de ayuno en los sujetos sin antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2

	Grupo con desayuno alto en grasa	Grupo con desayuno alto en carbohidratos	P
Género (f/m)	4/1	2/3	
Glucosa (mmol/l)	5,0 ± 0,5	5,0 ± 0,7	1,00
Insulina (pmol/l)	103,8 ± 1,8	101,3 ± 47,8	0,75
Colesterol total (mmol/l)	4,8 ± 0,4	4,4 ± 0,1	0,46
HDL-C (mmol/l)	1,6 ± 0,7	1,6 ± 0,3	0,75
VLDL (mmol/l)	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,0	0,91
LDL-C (mmol/l)	2,6 ± 1,0	2,3 ± 0,2	0,60
Triglicéridos (mmol/l)	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,0	0,91
Apolipoproteína A-1 (mg/dl)	152,2 ± 7,0	136,4 ± 24,7	0,25
Apolipoproteína B (mg/dl)	82,1 ± 7,7	72,9 ± 17,8	0,34
Creatinina (μmol/l)	76,0 ± 6,2	81,3 ± 6,1	0,45
Acido úrico (μmol/l)	286,6 ± 0,0	350,9 ± 29,1	<0,01
EEG (mmol/l)	8,3 ± 3,8	6,7 ± 1,6	0,34
EEI (pmol/l)	315,7 ± 56,8	310,6 ± 1,2	0,46

HDL: Colesterol de las lipoproteínas de alta densidad.
VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.
LDL: Colesterol de las lipoproteínas de baja densidad.
EEG: Estado estacionario de la glucosa.
EEI: Estado estacionario de la insulina.

En el grupo sin antecedente familiar de diabetes, el desayuno con alto contenido en grasa, aumentó en forma significativa la concentración de triglicéridos al minuto 180 al compararse con la concentración del grupo con desayuno alto en carbohidratos ($1,96 \pm 0,8$ vs. $1,76 \pm 0,2$ mmol/l, respectivamente; $p < 0,03$). Así mismo, las VLDL al minuto 180 alcanzaron un valor mayor en el grupo con desayuno alto en grasa al compararse con las del grupo que recibió un desayuno alto en carbohidratos ($0,9 \pm 0,4$ vs. $0,4 \pm 0,1$ mmol/l, respectivamente; $p < 0,03$). No existieron diferencias significativas en el resto del perfil de lípidos (colesterol total, LDL-C, HDL-C, apolipoproteínas A1 y B) en las mediciones de cada hora, ni en sus áreas bajo la curva, al comparar ambos tipos de desayuno (datos no mostrados).

DISCUSION

Se ha observado la existencia, en diferente magnitud, de modificaciones en el perfil de lípidos en hijos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (13) y aunque se ha estipulado que el factor genético es la causa más importante (14), los factores ambientales indicarán la pauta de aparición de la enfermedad en el futuro (15). Uno de esos factores ambientales es el consumo de alimentos de la población, donde la ingesta

de los nutrientes y, sobre todo, el balance energético aportado por las grasas y carbohidratos juegan un papel importante (16).

El presente estudio mostró que los individuos sanos con antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2 presentaron disminución de los lípidos conocidos como protectores de enfermedad cardiovascular, a diferencia de su contraparte sin el antecedente, aunque los valores se mantuvieron dentro de los rangos normales. Así mismo, la respuesta ante la ingesta de alimentos varió entre ambos grupos, donde el desayuno alto en carbohidratos en aquellos con el antecedente familiar de diabetes y el desayuno alto en grasas en aquellos sin dicho antecedente ocasionaron un aumento de lípidos que se han asociado a aterosclerosis temprana. Lo anterior pone en evidencia la participación de factores genéticos en la expresión de los lípidos y la influencia que tienen los factores ambientales en la modificación de sus concentraciones sanguíneas.

Hasta el momento actual, no se ha definido la participación que la lipemia posprandial, fuertemente ligada a la génesis de la enfermedad arterial coronaria (17), juega en la diabetes mellitus, debido a que la mayoría de los estudios realizados para demostrarlo utilizan dietas fuera de los estándares considerados como normales, durante períodos variables de tiempo y con la adición de algún tipo específico de grasa (6,18).

Existen reportes donde la administración de una dieta alta en colesterol en sujetos con hipertrigliceridemia ha llegado a alterar la respuesta posprandial de los lípidos, incluyendo a la apolipoproteína B (6,19). Estudios en ratas sometidas a dietas con alto contenido en grasas saturadas muestran hipercolesterolemia reversible aunada a un aumento en la apolipoproteína A1 al añadir ciertos tipos de grasas no saturadas (18). Existe evidencia en la literatura que concuerda con nuestros hallazgos, en donde la ingesta alta en carbohidratos se relaciona con aumento en la concentración de triglicéridos en grupos seleccionados, como pacientes diabéticos de reciente inicio o individuos con ganancia de peso; así mismo, cómo una ingesta de alimentos con alto contenido en grasas saturadas se asocia con aumento en la concentración de LDL-C en aquellos sujetos con diabetes mellitus reciente y no así en aquellos con larga evolución de la enfermedad (20). Por lo tanto, con estos estudios en humanos y en modelos animales se demuestra que la concentración de los lípidos posprandiales puede ser alterada por el tipo de dieta y su período de administración, así como por los estados patológicos subyacentes.

Aunque el efecto de algunas apolipoproteínas, como la A IV, es actuar como inhibidoras de la absorción de grasa de la dieta (21), estados crónicos pueden bloquear esta respuesta en dietas con alto contenido en grasas, lo que predispone a obesidad con la consecuente enfermedad aterosclerosa (22). Las dietas altas en grasa también influyen en forma aguda sobre el endotelio vascular al disminuir su reactividad, sin embargo, los mecanismos que participan se desconocen (23). Se ha reportado que el estado posprandial de los lípidos juega

un papel fundamental en la enfermedad de arterias coronarias, no solo por la hipertrigliceridemia posterior a la ingesta de alimentos, sino también por una respuesta anormal de los vasos sanguíneos ante un aumento de sustancias endógenas que producen espasmo arterial como los radicales libres de oxígeno, al desactivar el óxido nítrico (24).

Coincidimos con otros autores, en que el tener un antecedente familiar de diabetes mellitus se asocia con disminución en la concentración de los lípidos que son protectores para la formación de ateromas y que el comportamiento posprandial ante una dieta mal balanceada en sus componentes pudiera contribuir en un futuro al desarrollo de alteraciones en la función cardiovascular (6,13,24,25). Sin embargo, es de señalar que el contenido de proteínas en los desayunos suministrados en nuestro estudio fue diferente y su efecto sobre el perfil de lípidos no es posible de analizar con el presente diseño.

La mayor concentración de ácido úrico sérico en ayuno de los individuos sin antecedente familiar de diabetes que recibieron desayuno alto en carbohidratos probablemente se debió a una mayor proporción de mujeres en el grupo que recibió desayuno alto en grasas. Por esta misma razón, algunas otras mediciones clínicas y de laboratorio pudieran verse afectadas por el género, lo cual es una limitante que debemos reconocer en el presente estudio, ya que para realizar un análisis estratificado se requeriría un aumento significativo en el tamaño de la muestra.

Aunque los individuos fueron asignados al azar, fue mayor la concentración inicial de la apolipoproteína B encontrada en los individuos con antecedente familiar de diabetes que recibieron desayuno alto en carbohidratos y no tenemos explicación plausible para ello. Este diferente comportamiento metabólico quizá dificulte la correcta interpretación de los resultados y limite las conclusiones, sin embargo, nos estimula a pensar sobre las diferentes respuestas que pudieran aparecer en los sujetos de alto riesgo sobre su perfil de lípidos.

En conclusión, los jóvenes sanos con el antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2 mostraron algunas características aterogénicas en su perfil de lípidos y un desayuno con alto contenido en carbohidratos ocasionó un aumento en la apolipoproteína B y en los triglicéridos; mientras que en los jóvenes sin el antecedente familiar fue la ingesta alta en grasa la que condicionó efectos desfavorables en los lípidos. Son necesarios más estudios específicos y con mayor tamaño de muestra que permitan ratificar y complementar los presentes hallazgos, antes de poder brindar recomendaciones a la población general como parte de la prevención de diabetes y de enfermedades cardiovasculares.

REFERENCIAS

1. Grill V, Persson G, Carlsson S, Norman A, Alvarsson M, Östensson C-G, Svanström L, Efendic S. Family history of diabetes in middle-aged Swedish men is a gender unrelated factor

- which associates with insulinopenia in newly diagnosed diabetic subjects. *Diabetologia* 1999; 42:15-23.
2. Pederson O. Genetics of insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107:113-118.
 3. Danadian K, Balasekaran G, Lewy V, Meza M, Robertson R, Arslanian S. Insulin sensitivity in African-American children with and without family history of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22:1325-1329.
 4. Kahn R. Insulin action, diabetogenesis, and the cause of type 2 diabetes. *Diabetes* 1994; 43:1066-1084.
 5. Boer J, Feskens E, Kromhout D. Characteristics of non-insulin-dependent diabetes mellitus in elderly men: Effect modification by family history. *Int J Epidemiol* 1996; 25:394-402.
 6. Tinker L, Parks E, Berh S, Scheneeman B, Davis P. (n-3) fatty acid supplementation in moderately hypertriglyceridemic adults changes postprandial lipid and apolipoprotein B responses to a standardized test meal. *J Nutr* 1999; 129:1126-1134.
 7. Clifton P, Nestel P. Effect of dietary cholesterol on postprandial lipoproteins in three phenotypic groups. *Am J Clin Nutr* 1996; 64:361-367.
 8. Boquist S, Hamsten A, Karpe F, Ruotolo G. Insulin and non-esterified fatty acid relations to alimentary lipaemia and plasma concentrations of postprandial triglyceride-rich lipoproteins in healthy middle-aged men. *Diabetologia* 2000; 43:185-193.
 9. Teno S, Uto Y, Nagashima H, Endoh Y, Iwamoto Y, Omori Y, Takizawa T. Association of postprandial hypertriglyceridemia and carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23:1401-1406.
 10. Rivas B, Bianchi R. El nivel socioeconómico en la investigación. *Asoc Mex Enferm Metab Obes* 1991; 2:44-48.
 11. González-Ortiz M, Martínez-Abundis E, Balcazar-Muñoz B, Pascoe-González S. Effect of sleep deprivation on insulin sensitivity and cortisol concentration in healthy subjects. *Diab Nutr Metab* 2000; 13:80-83.
 12. Jeyaseelan L, Rao PSS. Methods of determining sample sizes in clinical trials. *Indian Ped* 1999; 26:115-121.
 13. Axelsen M, Smith U, Eriksson J, Taskinen M, Jansson P. Postprandial hypertriglyceridemia and insulin resistance in normoglycemic first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 1999; 131: 27-31.
 14. Berenson G, Bao W, Srinivasan S. Abnormal characteristics in young offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 962-967.
 15. Shaw J, Purdie D, Neil H, Levy J, Turner R. The relative risks of hyperglycaemia, obesity and dyslipidaemia in the relatives of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 1999; 42:24-27.
 16. Daly M, Vale C, Walker M, Alberti G, Mathers J. Dietary carbohydrates and insulin sensitivity: a review of the evidence and clinical implications. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:1072-1085.
 17. Brunzell J, Hokanson J. Dyslipidemia of central obesity and insulin resistance. *Diabetes Care* 1999; 22:C10-C13.
 18. Yokogoshi H, Mochizuki H, Nanami K, Hida Y, Miyachi F, Oda H. Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *J Nutr* 1999; 129:1705-1712.
 19. Sane T, Taskinen M. Does familial hypertriglyceridemia predispose to NIDDM?. *Diabetes Care* 1993; 16:1494-1501.
 20. Mayer-Davis E, Levin S, Marshall J.A. Heterogeneity in associations between macronutrient intake and lipoprotein profile in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22:1632-1639.
 21. Tso P, Liu M, Kalogeris T. The role of apolipoprotein A-IV in food intake regulation. *J Nutr* 1999; 129:1503-1506.
 22. Barakat HA, Carpenter JW, Mclendon VD, Khazanie P, Leggett N, Heath J, Marks R. Influence of obesity, impaired glucose tolerance, and NIDDM on LDL structure and composition. *Diabetes* 1990; 39:1527-1533.
 23. Plotnick GD, Corretti MC, Vogel RA. Effect of antioxidant vitamins on the transient impairment of endothelium – dependent brachial artery vasoactivity following a single high – fat meal. *JAMA* 1997; 278:1682-1686.
 24. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol* 1997; 79: 350-354.
 25. Byrne C, Wareham N, Philips D, Hales C, Martensz N. Is an exaggerated postprandial triglyceride response associated with the component features of the insulin resistance syndrome?. *Diabetic Medicine* 1997; 14:942-950.

Recibido: 06-06-2003

Acéptado: 22-06-2004

Exactitud del índice de masa corporal en la predicción de la adiposidad medida por impedanciometría bioeléctrica

Fernando Carrasco N., Eliana Reyes S., Olga Rimler S., Francisca Rios C.

Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago - Chile, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Santiago de Chile - Chile

RESUMEN. El objetivo del estudio fue determinar la exactitud del IMC para diagnosticar obesidad y su capacidad de predecir la masa grasa corporal en una población de adultos chilenos. En 433 mujeres (18-73 años; IMC:19,7-69,7 kg/m²) y 264 hombres (18-83 años; IMC:19,1-54,8 kg/m²), se midió la resistencia por bioimpedanciometría y se calculó el porcentaje de masa grasa (%MG), aplicando las ecuaciones de Segal según adiposidad. Se definió obesidad con un IMC \geq 30 kg/m², y exceso de adiposidad con un %MG \geq 25% en hombres y \geq 30% en mujeres. Un 60,4% de las mujeres y 23,6% de los hombres con IMC < 30 kg/m² presentaron un %MG \geq 30 y \geq 25%, respectivamente. Según análisis de sensibilidad vs. especificidad, un IMC de 26 kg/m² en mujeres y de 30 kg/m² en hombres se aproxima mejor a los puntos de corte de adiposidad. Las ecuaciones para predecir adiposidad son: %MG mujeres = $0,96 \cdot \text{IMC} + 0,154 \cdot \text{edad} + 1,44$ ($r^2=0,75$; error estándar 3,8%); %MG hombres = $0,99 \cdot \text{IMC} + 0,141 \cdot \text{edad} - 9,914$ ($r^2=0,66$; error estándar 4,4%). La diferencia entre la medición y estimación del %MG mostró una gran dispersión de valores, con un intervalo de ± 2 ds de 7,5 %MG en mujeres y 8,8 %MG en hombres. El IMC de 30 kg/m² muestra una baja sensibilidad para identificar individuos con exceso de masa grasa, especialmente en mujeres. En este estudio el IMC muestra una baja confiabilidad para estimar adiposidad a nivel individual, particularmente en hombres y cuando el IMC es menor de 30 kg/m².

Palabras clave: Índice de masa corporal, masa grasa corporal, impedanciometría, obesidad.

SUMMARY. Predictive accuracy of body mass index in estimating body fatness measured by bioelectrical impedance. The aim of this study was to determine the performance of body mass index (BMI) for the diagnosis of obesity and as a predictor of body fatness in adult Chilean subjects. We conducted a study in 433 women (18-73 years old; BMI: 19.7 to 69.7 kg/m²) and 264 men (18-83 y.; BMI: 19.1 to 54.8 kg/m²). Bioelectrical resistance was measured by impedance method and fat mass percent (FM%) was calculated by fatness-specific equations developed by Segal et al. Obesity was defined as a BMI of at least 30 kg/m². Increased fatness was defined by the FM% cut-off points of at least 25% for men and at least 30% for women. Sixty-four percent of women and 23.6% of men with BMI below 30 kg/m² had FM% higher than 30% and 25%, respectively. A value of BMI of 26 kg/m² in women and 30 kg/m² in men had the best agreement to the cut-off points of fatness according to sensitivity vs. specificity analysis. The following equations were developed to predict individual fatness: women FM% = $0.96 \cdot \text{BMI} + 0.154 \cdot \text{age} + 1.44$ ($r^2=0.75$; standard error 3.8%); men FM% = $0.99 \cdot \text{BMI} + 0.141 \cdot \text{age} - 9.914$ ($r^2=0.66$; standard error 4.4%). Differences between measured and predicted FM% presented a wide variation, with a range of ± 2 sd of 7.5% in women and 8.8% in men. The commonly used value of BMI \geq 30 kg/m² as a cut-off point for obesity does not have adequate sensitivity and specificity for the screening of increased fatness subjects, specially in women. In this study BMI shows a low reliability as a predictor of individual body fatness, particularly in men and in subjects with a BMI below 30 kg/m².

Key words: Body mass index, body fat mass, bioelectrical impedance, obesity.

INTRODUCCION

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por un aumento en la masa grasa corporal, con una fuerte asociación con hipertensión arterial, dislipidemia, diabetes tipo 2, cardiopatía isquémica y algunos tipos de cáncer (1).

Para el diagnóstico de sobrepeso u obesidad se han utilizado habitualmente los índices de peso en relación a la estatura, debido a que el incremento en la grasa corporal se acompaña usualmente de un aumento en el peso corporal total. El índice

de masa corporal de Quetelet (IMC: peso/estatura²), ha sido definido por la OMS (1), y la NIH (2), como el parámetro para el diagnóstico de sobrepeso y obesidad, considerando la buena correlación que éste tiene con adiposidad (3), y su fuerte asociación epidemiológica con mortalidad y morbilidad asociada a obesidad (4,5). Sin embargo, la exactitud del IMC para estimar la composición corporal es discutible (6-8), siendo afectada por el sexo, raza y edad, lo cual puede conducir a una mala clasificación de la condición de obesidad (9). Es así como individuos diagnosticados como normales según IMC

pueden tener un porcentaje de masa grasa elevado (falsos negativos), y otros diagnosticados como obesos por un $IMC > 30$ pueden tener un porcentaje de grasa dentro de límites normales (falsos positivos).

Algunos investigadores han demostrado que el IMC estima inadecuadamente el porcentaje de masa grasa al utilizar diferentes técnicas de medición de composición corporal, tales como densitometría por inmersión (10,11), medición de agua corporal total por deuterio (12), o impedanciometría bioeléctrica (6,13,14), y que los puntos de corte para definir la obesidad de acuerdo al porcentaje de masa grasa, corresponden a valores de IMC inferiores a 30 kg/m^2 , tanto en poblaciones predominantemente caucásicas (11-13), como en distintos grupos raciales asiáticos (14,15).

El presente estudio se desarrolló para determinar la exactitud del IMC para diagnosticar correctamente obesidad y su capacidad de predecir la adiposidad medida por impedanciometría bioeléctrica.

MATERIAL Y METODOS

Sujetos

Se estudió a 433 mujeres (65 normopeso, 157 con sobrepeso y 211 con obesidad), y 264 hombres (23 normopeso, 87 con sobrepeso y 154 con obesidad), mayores de 18 años. Los controles (C), fueron sujetos voluntarios sanos con IMC entre 18,5 y $24,9 \text{ kg/m}^2$. La muestra de individuos con sobrepeso ($IMC 25-29,9 \text{ kg/m}^2$), y obesidad (IMC igual o mayor a 30 kg/m^2), fue obtenida entre los consultantes a un programa de tratamiento de obesidad, en los cuales se midió la composición corporal por impedanciometría previo al inicio del plan de reducción de peso.

Evaluación antropométrica y de composición corporal

Se midió el peso (kg), utilizando una balanza de palanca (Detecto®), con una precisión de 0,1 kg., y la estatura (m), con un cartabón adosado a la balanza, para calcular el índice de masa corporal ($IMC = \text{kg/m}^2$). Se midió la composición corporal mediante impedanciometría bioeléctrica (16,17), con un impedanciómetro tetrapolar de monofrecuencia (50 kHz), Biodynamics modelo 310 (Biodynamics Corp. Seattle, Washington, USA). Se solicitó al paciente no haber ingerido alcohol, café, ni bebidas cafeinadas el día anterior al examen, así como abstenerse de actividad física intensa y encontrarse en ayuno por al menos 6 horas. Con el sujeto en decúbito se colocaron electrodos en la mano derecha, en posición distal, 1 cm. sobre los nudillos y proximal inmediatamente sobre el extremo distal del cúbito, y en el pie derecho 1 cm. sobre los ortijos (electrodo distal), y en la zona media de la línea que une los maléolos lateral y medial (electrodo proximal). En estas condiciones se obtuvo una medición de la resistencia

(R). La masa libre de grasa (MLG) y el porcentaje de masa grasa (%MG) fueron calculados aplicando las ecuaciones de Segal específicas según adiposidad (18):

- mujeres delgadas: $MLG \text{ (kg)} = 6,4602 (T^2) - 0,01397 (R) + 0,42087 (P) + 10,43485$
- mujeres obesas: $MLG \text{ (kg)} = 9,1186 (T^2) - 0,01466 (R) + 0,2999 (P) - 0,07012 (E) + 9,37938$
- hombres delgados: $MLG \text{ (kg)} = 6,6366 (T^2) - 0,02117 (R) + 0,62854 (P) - 0,1238 (E) + 9,33285$
- hombres obesos: $MLG \text{ (kg)} = 8,858 (T^2) - 0,02999 (R) + 0,42688 (P) - 0,07002 (E) + 14,52435$

Dónde: T, talla (m); R, resistencia (ohms); P, peso (kg); E, edad en años.

En sujetos no claramente delgados ni obesos (IMC entre 25 y 30 kg/m^2), se aplicó el valor promedio de las 2 ecuaciones, según el método recomendado por Stolarczyk y cols. (19), para poblaciones heterogéneas. Estas ecuaciones han sido validadas con densitometría con el mayor tamaño muestral de una población heterogénea ($n=1567$), con un amplio rango de edad (17-62 años), y %MG (3-56%). Además, han sido revalidadas en población caucásica (20-21), multirracial e hispana (22,23), al compararlas con mediciones más directas de composición corporal (ej. densitometría, DEXA, deuterio).

Definición de obesidad según porcentaje de masa grasa

Para el diagnóstico de obesidad según adiposidad se utilizaron como puntos de corte un %MG igual o mayor de 25% en hombres (9, 24), o igual o superior a 30% en mujeres (13).

Análisis estadístico

Todos los parámetros son expresados como promedio y desviación estándar ajustados por edad. Se confeccionaron tablas de sensibilidad y especificidad para distintos puntos de corte de IMC, independientes en hombres y mujeres, para luego graficar en curvas R.O.C. (Receiver Operator Characteristic). Se fijó el mejor punto de corte como aquel IMC más cercano al ángulo superior izquierdo de la gráfica de la curva ROC (25). Se efectuó análisis de regresión simple y multivariado entre el %MGs (variable dependiente), y el IMC y edad (variables independientes), y el %MG estimado por las ecuaciones de regresión se comparó con el %MG medido con el análisis de Bland y Altman, con límites de concordancia en ± 2 desviaciones estándar del residual (26). Se utilizó el programa estadístico Jandel Sigma Stat, versión 2.0 (Copyright® 1995, Jandel Corp.), y un nivel de significancia de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Las características de los sujetos estudiados se muestran en la Tabla 1. Un 49% de las mujeres y 58% de los hombres presentan un IMC igual o mayor de 30 kg/m². Ninguna mujer con IMC > 30 kg/m² presenta un %MG inferior a 30%, en cambio 29 de 154 hombres (19%) con IMC > 30 kg/m² presentan un %MG inferior a 25%. Por otro lado, un 60,4% de las mujeres y 23,6% de los hombres con IMC < 30 kg/m², tienen un %MG que los califica como obesos según el criterio de adiposidad (>30% y >25 %MG, respectivamente).

TABLA 1
Características generales y composición corporal de la población estudiada

Variable	Mujeres (n=433)			Hombres (n=264)		
	Promedio	DS	Rango	Promedio	DS	Rango
Edad (años)	36,4	11,9	18 - 73	36,3	12,1	18 - 83
IMC (kg/m ²)	30,7	6,1	19,7 - 69,7	31,7	5,7	19,1 - 54,8
MLG (kg)	48,2	6,4	33,8 - 79,9	68,9	9,7	40,2 - 106,8
% MG	36,5	7,6	18,5 - 56,3	26,7	7,6	9,1 - 40,5
Resistencia (ohms)	468	90,5	269 - 842	413	73,0	243 - 733

IMC: índice de masa corporal; MLG: masa libre de grasa; % MG: porcentaje de masa grasa.

En la Tabla 2 se muestra la sensibilidad y especificidad de distintos puntos de corte de IMC para diagnosticar obesidad según el criterio de adiposidad descrito. El menor IMC en el cual se detectan casos con obesidad según %MG determinado por impedanciometría es 22 y 26 kg/m² en mujeres y hombres, respectivamente (100% de sensibilidad). El menor IMC sobre el cual todos los casos corresponden a obesidad según %MG es 30 y 37 kg/m² en mujeres y hombres, respectivamente (100% de especificidad).

El análisis de las curvas ROC (Figuras 1 y 2), muestra que el IMC es más adecuado para discriminar adiposidad en mujeres (Figura 1), que en hombres (Figura 2), considerando el criterio de mayor área bajo la curva o de la curva más cercana al punto de sensibilidad y especificidad de 100%. El IMC con mejor equilibrio entre sensibilidad y especificidad está alrededor de 26 kg/m² en mujeres (sensibilidad= 90,1%; especificidad= 92,6%), y cercano a 30 kg/m² en hombres (sensibilidad= 82,8%; especificidad= 81,2%).

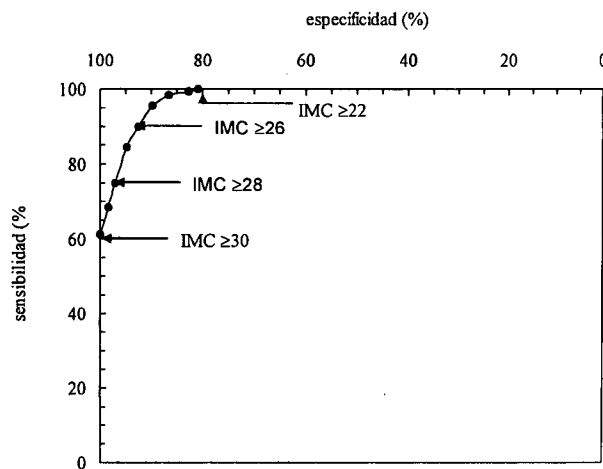
TABLA 2

Sensibilidad y especificidad de distintos puntos de corte de índice de masa corporal (IMC), para diagnosticar obesidad usando como criterio la adiposidad medida por impedanciometría

IMC (kg/m ²)	Mujeres		IMC (kg/m ²)	Hombres	
	Sensibilidad	Especificidad		Sensibilidad	Especificidad
22	100,0	81,0	26	100,0	65,1
23	99,4	82,7	27	98,0	66,4
24	98,3	86,5	28	95,4	70,6
25	95,7	89,7	29	89,4	75,8
26	90,	92,6	30	82,8	81,2
27	84,3	94,8	31	73,5	83,5
28	75,1	97,0	32	66,2	88,5
29	68,4	98,3	33	59,6	90,9
30	61,2	100,0	34	49,0	94,9
			35	40,4	96,8
			36	32,5	98,0
			37	26,5	100,0

Sensibilidad: proporción positivos verdaderos (adiposidad aumentada), correctamente identificados por IMC; Especificidad: proporción de casos identificados por IMC que son positivos verdaderos.

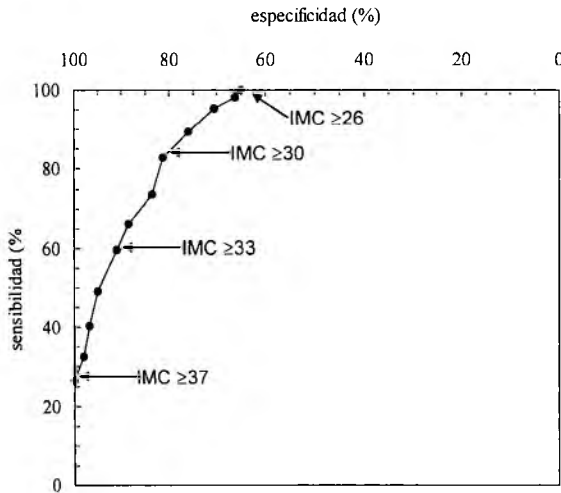
FIGURA 1
Curva ROC (Receiver Operator Characteristic), para el índice de masa corporal (IMC) como indicador de obesidad en mujeres



Estimación de la adiposidad

Las ecuaciones de regresión con mayor coeficiente de correlación para estimar el porcentaje de masa grasa son aquellas que incluyen el IMC y la edad como variables independientes y separadas por sexo: en mujeres %MG=(0,959*IMC) + (0,154*edad) + 1,44 (r²=0,75; error estándar=3,76); en hombres %MG=(0,993*IMC) + (0,141*edad)- 9,914 (r²=0,66; error estándar=4,41).

FIGURA 2
Curva ROC (Receiver Operator Characteristic), para el índice de masa corporal (IMC), como indicador de obesidad en hombres



En las Figuras 3 y 4 se analizan según Bland-Altman las diferencias entre el %MG medido y el valor estimado por ecuaciones de regresión en hombres y mujeres, respectivamente. La dispersión de los residuales (diferencia entre medición y estimación), es mayor en hombres que en mujeres (2 DS= 8,8 vs 7,5 %MG, respectivamente), y disminuye a mayor IMC tanto en hombres como en mujeres.

FIGURA 3
Diferencia entre el porcentaje de masa grasa medido por impedanciometría (%MG), y el valor estimado según índice de masa corporal y edad en 264 hombres

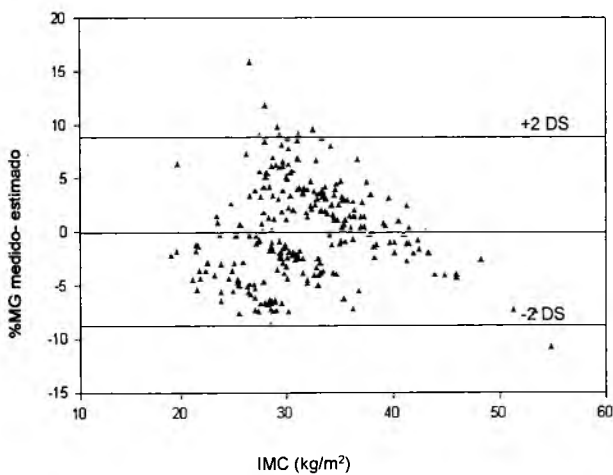
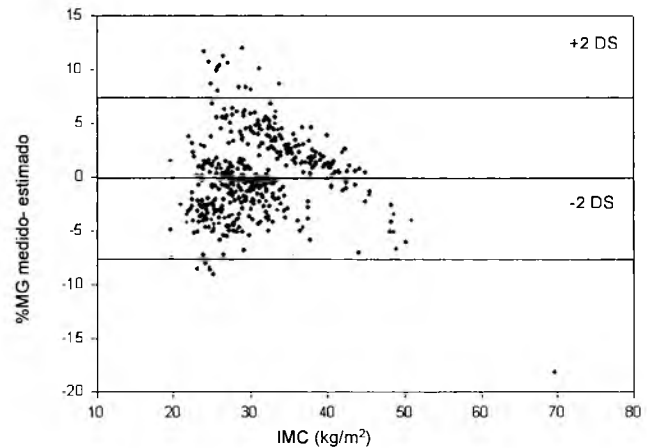


FIGURA 4
Diferencia entre el porcentaje de masa grasa medido por impedanciometría (%MG), y el valor estimado según índice de masa corporal y edad en 433 mujeres



Numerosos estudios muestran que el índice de masa corporal puede inducir a errores en la predicción de la adiposidad a nivel individual. Algunos sujetos, especialmente hombres, pueden ser clasificados como obesos con el cálculo de un IMC igual o mayor de 30 kg/m², siendo que presentan un porcentaje de masa grasa medido menor al valor máximo sugerido de 25% (falsos positivos). Esta circunstancia se observa en un 33% de los hombres evaluados por Wellens y cols. mediante densitometría por inmersión (11). En nuestra serie alrededor de 19% de los hombres con IMC igual o mayor de 30 kg/m² presentan un %MG menor de 25%. Esta discordancia entre el IMC y el porcentaje de masa grasa puede explicarse en parte por las diferencias en la composición corporal relacionadas con el nivel de actividad física o con factores raciales. Al respecto, Ross y cols. (27), han observado que a un nivel determinado de IMC la masa grasa total y abdominal, evaluada por pliegues cutáneos y circunferencia de cintura, es menor en sujetos con mayor grado de entrenamiento cardiorespiratorio. Estas observaciones han sido confirmadas recientemente en el estudio de Janssen y cols. (28), con menores valores de masa grasa corporal total medida por densitometría por inmersión, y de grasa abdominal subcutánea y visceral evaluada por tomografía computada, en mujeres y hombres con mayor nivel de entrenamiento cardiorespiratorio. Es probable que en sujetos con mayor nivel de actividad física, un aumento en la masa magra contribuya parcialmente al exceso de peso y a un mayor índice de masa corporal.

Por otro lado, una proporción importante de mujeres con IMC menor de 30 kg/m² tienen un %MG por sobre los niveles aceptables. Entre las mujeres con IMC menor de 30 kg/m², un 88% tienen un %MG igual o superior a 33% en el

estudio de Wellens y cols. (11), y un 46% presenta un %MG mayor de 30% en el análisis de Frankenfield y cols. (13). En nuestra muestra esta situación se observa en cerca de 60% de las mujeres, confirmando la noción de que en mujeres la obesidad debiera diagnosticarse con algún punto de corte de IMC menor a 30 kg/m².

Puntos de corte según índice de masa corporal versus porcentaje de masa grasa

A nivel colectivo existe concordancia entre diversos estudios en que el punto de corte para el IMC en 30 kg/m² corresponde a niveles de adiposidad muy elevados, especialmente en mujeres. En un estudio multicéntrico publicado por Gallagher y cols. (29), en el cual se estimó el %MG por un método de 4 compartimentos, se observó que un IMC de 30 kg/m² corresponde a un %MG de 39% o más en mujeres caucásicas y afroamericanas mayores de 20 años. El mismo estudio muestra una concordancia entre el IMC de 30 kg/m² y un %MG de 25% en hombres. En la muestra analizada por Frankenfield y cols. (13), en 141 adultos entre 18 y 78 años, el IMC de 30 kg/m² concordó con un %MG medido por impedanciometría de alrededor de 39% en mujeres y 28% en hombres. En nuestro estudio el mismo punto de corte se relacionó con un %MG de $\pm 36\%$ en mujeres y 25% en hombres. El cálculo inverso se puede efectuar para determinar a que IMC corresponde el %MG máximo aceptable según sexo. En esta serie un %MG menor a 30% en mujeres corresponde a un IMC menor de 24 kg/m².

El análisis de las curvas R.O.C. es concordante en señalar al IMC de 30 kg/m² como el punto de corte adecuado para discriminar un exceso de adiposidad en hombres, aún cuando su sensibilidad y especificidad es relativamente baja (± 83 y 81%, respectivamente).

En mujeres el análisis de la curva R.O.C. muestra que un IMC de alrededor de 26 kg/m² ofrece el mejor equilibrio entre una alta sensibilidad y especificidad (± 90 y 93%, respectivamente). Un IMC de 24 kg/m², que se ajusta según la ecuación de regresión a un %MG de 30% en mujeres, presenta una gran sensibilidad (98%), pero con una baja especificidad que implicaría diagnosticar a muchas mujeres falsamente como obesas.

Predicción del porcentaje de masa grasa a partir del IMC

La estimación del %MG a través de ecuaciones predictivas que incluyan el IMC, la edad y el sexo como variables independientes ha sido analizada por distintos investigadores, dando origen a ecuaciones lineales (29,30) o cuadráticas (13). En nuestro estudio se observó que las variables independientes con mayor peso estadístico para predecir el %MG en un análisis multivariado fueron el IMC y la edad. Este resultado es concordante con la apreciación de los distintos autores (9,30). La confiabilidad de una ecuación predictiva se puede obser-

var, previo a una validación externa, observando el error estándar de la regresión o a través del análisis de Bland-Altman. Las ecuaciones obtenidas en nuestro estudio presentan una correlación aceptable (r^2 de 0,75 en mujeres y 0,66 en hombres), con un error estándar de $\pm 3,8\%$ de MG en hombres y 4,4% en mujeres. El análisis de diferencias entre el %MG medido y el valor estimado por fórmula muestra una gran dispersión de los residuales especialmente en hombres (2 desviaciones estándar $\approx 9\%$ de MG), y en sujetos con IMC menor de 30 kg/m². Lo anterior le resta valor a estas ecuaciones en su aplicación práctica para predecir la adiposidad a nivel individual. Esta baja exactitud del IMC para predecir el porcentaje de masa grasa puede explicarse en parte, como se discutió previamente, por diferencias en la composición corporal relacionadas con el nivel de actividad física o con factores raciales.

Limitaciones del estudio

La validez de las mediciones de masa grasa corporal mediante impedanciometría surge como una de las principales limitaciones del presente análisis. La predicción de la masa grasa se basa en la relación matemática inversa entre la resistencia del cuerpo a la conducción de una corriente eléctrica de muy baja intensidad y el contenido de agua corporal o masa libre de grasa medidos por alguna técnica de alta confiabilidad (deuterio o densitometría por inmersión). Es importante que la ecuación de predicción de masa grasa seleccionada sea la más apropiada para el grupo de sujetos a estudiar (31), esto significa que su origen sea de una población semejante a aquella en que va a ser aplicada o de una población suficientemente heterogénea (raza, edad e IMC), para ser utilizable universalmente. Las ecuaciones que proveen los equipos se han originado de estudios en poblaciones caucásicas, probándose posteriormente su validez en otras poblaciones. En general se ha encontrado una buena correlación entre el %MG estimado por estas ecuaciones y las mediciones por otros métodos como la densitometría por inmersión o dilución isotópica con deuterio (17), aunque los análisis de concordancia muestran una subestimación sistemática de la masa grasa en sujetos obesos (32). La expansión del compartimento de agua extracelular en obesos da la falsa información de incremento en la masa libre de grasa y una menor estimación de la masa grasa (33). Esta subestimación puede originarse en parte por la aplicación de ecuaciones cuya población estudiada se compone de un escaso número de sujetos obesos, y podría disminuirse el error con el uso fórmulas apropiadas para obesos como las de Segal y cols. (18). En un análisis de variadas ecuaciones para estimar el %MG en mujeres obesas, Fuller y cols. (34), encontraron un error entre $-6,7\%$ y $+7,8\%$, con el menor error al utilizar las ecuaciones de Segal ($0,1 \pm 6,5\%$). Estas ecuaciones tienen la ventaja adicional de incluir a sujetos en un amplio rango de edad y, para nuestro estudio, haber sido validadas

en población hispana (22).

Aún asumiendo que exista una subestimación del %MG en sujetos obesos, este error tendería a enmascarar los resultados obtenidos y su corrección tendería a desplazar el punto de corte de IMC hacia un valor más bajo.

CONCLUSIONES

Las mediciones de masa grasa derivadas del análisis de impedanciometría muestran una baja sensibilidad del IMC de 30 para identificar a individuos con exceso de adiposidad. En hombres se observa una concordancia entre un IMC de 30 y el valor máximo desable de masa grasa, pero en mujeres un nivel aceptable de adiposidad se observa con valores de IMC mucho más bajos ($< 26 \text{ kg/m}^2$). El IMC muestra en este estudio una baja confiabilidad para predecir la adiposidad de un individuo, especialmente en hombres y cuando el IMC es menor de 30 kg/m^2 .

REFERENCIAS

- World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, June 3-5, 1997. Geneva: WHO, 1998.
- US Department of Health and Human Services. Clinical Guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults: the evidence report. Washington DC: US DHHS, 1998.
- Bray GA. Contemporary Diagnosis and Management of Obesity 1998. Pennsylvania, USA. Handbooks in Health Care Co. 1998.
- Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, Van Itallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *JAMA* 1999; 282:1530.
- Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *JAMA* 1999; 282:1523.
- Roubenoff R, Dallal GE, Wilson PWF. Predicting body fatness: the body mass index vs. estimation by bioelectrical impedance. *Am J Public Health* 1995; 85 (5): 726-728.
- Smalley KJ, Knerr AN, Kendrick ZV, Colliver JA, Owen OE. Reassessment of body mass indices. *Am J Clin Nutr* 1990; 52 (3): 405-408.
- Revicki DA, Israel RG. Relationship between body mass index and measures of body adiposity. *Am J Public Health* 1986; 76 (8): 992-994.
- Baumgartner RN, Heymsfield SB, Roche AF. Human body composition and the epidemiology of chronic disease. *Obes Res* 1995; 3 (1): 73-95.
- Hortobagyi T, Israel RG, O'Brien KF. Sensitivity and specificity of the Quetelet index to assess obesity in men and women. *Eur J Clin Nutr* 1994; 48 (5): 369-375.
- Weillens RI, Roche AF, Khamis HJ, Jackson AS, Pollock ML, Siervogel RM. Relationships between the body mass index and body composition. *Obes Res* 1996; 4 (1): 35-44.
- Piers LS, Soares MJ, Frandsen SL, O'Dea K. Indirect estimates of body composition are useful for groups but unreliable in individuals. *Int J Obes* 2000; 24(9): 1145-1152.
- Frankenfield DC, Rowe WA, Cooney RN, Smith JS, Becker D. Limits of Body Mass Index to Detect Obesity and Predict Body Composition. *Nutrition* 2001; 17 (1): 26-30.
- Ko GT, Tang J, Chan JC, Sung R, Wu MM, Wai HP, et al. Lower BMI cut-off value to define obesity in Hong Kong Chinese: an analysis based on body fat assessment by bioelectrical impedance. *Br J Nutr* 2001; 85 (2): 239-42.
- Deurenberg-Yap M, Schmidt G, Van Staveren WA, Deurenberg P. The paradox of low body mass index and high body fat percentage among Chinese, Malays and Indians in Singapore. *Int J Obes* 2000; 24 (8): 1011-1007.
- Kushner RF. Bioelectric impedance analysis: a review of principles and applications. *J Am Coll Nutr* 1992; 11 (2): 199-209.
- Houtkooper LB, Lohman TG, Going SB, Howell WH. Why bioelectrical impedance analysis should be used for estimating adiposity. *Am J Clin Nutr* 1996; 64 (suppl): 436S-448S.
- Segal KR, Van Loan M, Fitzgerald PI, Hodgson JA, Van Itallie TB. Lean body mass estimation by bioelectrical impedance analysis: a four-site cross-validation study. *Am J Clin Nutr* 1988; 47 (1): 7-14.
- Stolarczyk LM, Heyward VH, Van Loan MD, Hicks VL, Wilson WL, Reano LM. The fatness-specific bioelectrical impedance analysis equations of Segal et al: are they generalizable and practical?. *Am J Clin Nutr* 1997; 66 (1): 8-17.
- Gray DS, Bray GA, Gemayel N, Kaplan K. Effect of obesity on bioelectrical impedance. *Am J Clin Nutr* 1989; 50 (2): 255-260.
- Ross R, Leger L, Martin P, Roy R. Sensitivity of bioelectrical impedance to detect changes in human body composition. *J Appl Physiol* 1989; 67 (4): 1643-1648.
- Stolarczyk LM, Heyward VH, Goodman JA, Grant DJ, Kessler KL, Kocina PS, Wilmerding V. Predictive accuracy of bioelectrical impedance in estimating fat-free mass of Hispanic women. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27 (10): 1450-1456.
- Stolarczyk LM, Heyward VH, Hicks VL, Baumgartner RN. Predictive accuracy of bioelectrical impedance in estimating body composition of Native American women. *Am J Clin Nutr* 1994; 59 (5): 964-970.
- Bray GA. Fat distribution and body weight. *Obes Res* 1993; 1 : 203-206.
- Identificación de los casos de enfermedad: Clinicometría y diagnóstico. En: Jenicek M, ed. Epidemiología: La lógica de la medicina moderna. Maason, S.A. 1996, Barcelona, España, Pag.: 79-120.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1 (8476): 307-310.
- Ross R, Katzmarzyk PT. Cardiorespiratory fitness is associated with diminished total and abdominal obesity independent of body mass index. *Int J Obes* 2003; 27 (2): 204-210.
- Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R, Leon AS, Skinner JS, Rao DC, Wilmore JH, Rankinen T, Bouchard C. Fitness alters the association of BMI and waist circumference with total and abdominal fat. *Obes Res* 2004; 12 (3): 525-537.

29. Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb S, Murgatroyd PR, Sakamoto Y. Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (3): 694-701.
30. Deurenberg P, Weststrate JA, Seidell JC. Body mass index as a measure of body fatness: age and sex specific prediction formulas. *Br J Nutr* 1991; 65 (2): 105-114.
31. Jebb SA. Measuring Body Composition: from the Laboratory to the Clinic. En: Kopelman PG & Stock MJ (eds) *Clinical Obesity*, pp. 18-49. London: Blackwell Science Ltd. Blackwell Science (UK), 1998.
32. Wang ZM, Deurenberg P, Guo SS, Pietrobelli A, Wang J, Pierson RN, Heymsfield SB. Six-compartment body composition model: inter-method comparison of total body fat measurements. *Int J Obes* 1998; 22 (4): 329-337.
33. Deurenberg P. Limitations of the bioelectrical impedance method for the assessment of body fat in severe obesity. *Am J Clin Nutr* 1996; 64 (suppl): 449S-452S.
34. Fuller N, Sawyer M, Elia M. Comparative evaluation of body composition methods and predictions, and calculation of density and hydration of fat-free mass, in obese women. *Int J Obes* 1994; 18 (7): 503-512.

Recibido: 04-09-2003

Aceptado: 16-07-2004

Influencia del estado nutricional sobre la efectividad de un suplemento dietario de bacterias lácticas. Prevención y cura de diarreas infantiles

María Esther Río¹, Liliana Beatriz Zago², Hugo García³ y Luis Winter⁴

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) ¹, Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires ², Departamento de Pediatría. Hospital Posadas. Provincia de Buenos Aires ³, Centro Malvinas Argentinas. Haedo, Provincia de Buenos Aires ⁴

RESUMEN. La influencia de la desnutrición sobre la efectividad de un suplemento de lactobacilos vivos para prevenir y curar cuadros de diarrea infantil se estudió sobre 200 niños entre 6 y 24m de edad, desnutridos (D) o controles (C) que recibieron a ciegas durante 90 días leche fermentada con *L. Acidofilus* y *L. Casei* (10^7 - 10^8 /ml) (LB) o cantidad equivalente de leche fluida pasteurizada (L). Los episodios de diarrea se clasificaron según su duración fuera 1-4, 5-14 y diarrea prolongada (DP) si duraba más de 14 días. Los 119 niños que completaron el estudio se dividieron en 4 grupos: D-L: n=25; D-LB: n=32; C-L: n=27 y C-LB: n=35. Los aspectos preventivos se evaluaron a través del número de episodios y los terapéuticos a través de la duración de los mismos. Durante el estudio se registraron 134 episodios: 29 en D-L; 48 en D-LB; 37 en C-L y 20 en C-LB. Se presentaron 12 DP, todas en los grupos L: 3 en los controles y 9 en los desnutridos. En el grupo D-LB más del 90% de los episodios fueron de muy corta duración, porcentaje muy superior al de D-L y similar al observado en C-LB. En conclusión, la leche fermentada fue capaz de prevenir la mitad de los episodios en los controles, pero fue ineficaz en los desnutridos; sin embargo, fue efectiva para acortar la duración y evitar las DP con independencia del estado nutricional. Por ende, la desnutrición afectó los aspectos preventivos de los lactobacilos que requieren del sistema inmune, pero no los curativos, eminentemente locales.

Palabras clave: Diarrea, desnutrición, probióticos, probióticos en desnutrición, niños.

SUMMARY. Influence of nutritional status on the effectiveness of a dietary supplement of live lactobacillus to prevent and cure diarrhoea in children. The influence of undernutrition on the effectiveness of a dietary supplement of live lactobacillus regarding prevention and treatment of infantile diarrhoea was studied on 200 children 6 to 24m old. Children, undernourished (D) or controls (C), received for 90 days, in a blind experiment, a fermented milk providing *L. Acidofilus* y *L. Casei* (10^7 - 10^8 /ml) (LB) or an equivalent amount of fluid milk (L). diarrhoea episodes were recorded and classified according duration: 1-4, 5-14 days, and protracted diarrhoea (DP) those lasting beyond 14 days. Study requirements were fulfilled by 119 children: D-L: n=25; D-LB: n=32; C-L: n=27 y C-LB: n=35. Preventive aspects were evaluated through number of episodes and through their lasting the therapeutic ones. Episodes recorded were 134: 29 in D-L; 48 in D-LB; 37 in C-L and 20 in C-LB. In the D-LB group over 90% episodes were very short (1-4 days), percentage far higher to that observed in D-L and similar to C-LB. There were 12 episodes of DP, 9 D and 3 in C, all in the L groups. In conclusion, although the fermented milk prevent half episode in the controls but not in the undernourished, it was able to shorter episodes duration and prevent protracted diarrhoea irrespectively of nutritional status. Therefore, undernutrition impaired the ability of the *lactobacillus* supplement to prevent children diarrhoea, which implicates immune system, but not curative effects which are the result of local actions.

Key words: Probiotics, undernutrition, diarrhea, probiotics and undernutrition, children.

INTRODUCCION

El término *probiótico* define aquellos microorganismos no patógenos que, cuando ingeridos, ejercen una influencia positiva sobre la salud o la fisiología del huésped (1). Una de las múltiples aplicaciones potenciales de los microorganismos con características probióticas reiteradamente mencionada en la bibliografía es su efectividad para prevenir y tratar desórdenes intestinales (2). Debido a que las diarreas de origen diverso representan una muy alta proporción de dichas

patologías, la evaluación en humanos de la capacidad de alimentos fermentados con microorganismos probióticos para prevenirlas o curarlas se ha convertido en una de las áreas prioritarias de las investigaciones en salud, tanto básicas cuanto aplicadas; la importancia del tema queda expuesta en un trabajo de revisión publicado por de Roos y Katan según el cual de 49 trabajos publicados entre 1988 y 1998 sobre efectividad de probióticos estudiados en humanos, 26 correspondían a patologías gastrointestinales y de ellos 24 tenían por tema la prevención o cura de las diarreas (3). Dichos trabajos,

realizados en diversos tipos de poblaciones tuvieron el objetivo común de evaluar la utilidad de suplementos de microorganismos vivos para el manejo de las diarreas.

Entre los microorganismos a los que se les han reconocido efectos benéficos sobre las diarreas se encuentran diversas bacterias lácticas, entre ellas lactobacilos aislados de heces humanas. En nuestro país, en el Centro de Referencia para Lactobacilos, se ha desarrollado una mezcla de *L. acidophilus* y *L. casei*, cepa CERELA, que demostró ser de utilidad en el control de las diarreas agudas (4) y crónicas (5). Dicha cepa es la utilizada para fermentar el producto estudiado en este trabajo en el cual se busca discriminar la influencia del estado nutricional como variable capaz de modificar la respuesta al suplemento de lactobacilos vivos en sus aspectos preventivos y terapéuticos sobre los cuadros de diarrea infantil.

SUJETOS Y METODOS

El estudio se realizó en forma ambulatoria excepto cuando se presentaron cuadros de diarrea cuya severidad hiciera necesaria la internación. La distribución de los productos (leche fermentada y leche) y el control y seguimiento de los niños se realizó en dos centros asistenciales del Partido de Morón, Gran Buenos Aires: el Hospital Posadas y el Centro de Atención Primaria Malvinas Argentinas -localizado en el Barrio Carlos Gardel- de él dependiente, una de las zonas socioeconómicamente más precarias del Gran Buenos Aires.

Sujetos

El estudio se llevó a cabo sobre 200 niños entre 6 y 24 m de edad, desnutridos de grados I o II según el parámetro Peso/Talla %, según clasificación de Ariza Macías⁶ (6) sin otra patología clínica diagnosticada al inicio del estudio (D), o niños antropométricamente compensados y clínicamente sanos (C), que fueron utilizados como controles de estado nutricional.

Métodos

Los niños fueron asignados al azar a grupos que, bajo el sistema de doble ciego, recibieron diariamente durante los meses de otoño e invierno -entre abril y septiembre-, durante un mínimo de 90 días, un suplemento dietario de *L. acidophilus* y *L. casei* viables en 250-300 ml de una leche cultivada hasta una concentración de 10^7 - 10^8 microorganismos por ml (Grupo LB; n=100) o una cantidad equivalente de leche fluida pasteurizada (Grupo L; n=100) para descartar eventuales efectos del vehículo; por la misma razón, durante el período del estudio ninguno de los niños seleccionados estaba recibiendo alimentación a pecho.

A lo largo del estudio se registraron todos los episodios de diarrea, según normas de la Sociedad Argentina de Pediatría. Durante los episodios se aplicaron las normas terapéuticas del Hospital Posadas excepto en que se mantuvo la administración

de la dosis diaria del suplemento de lactobacilos y de la leche fluida. Como parte de los estudios clínicos, se identificó la causa de las diarreas que, como es habitual en la zona para esa época del año, fueron casi exclusivamente de origen viral. El protocolo fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación del Hospital Prof. Dr. A. Posadas y por el Comité de Docencia en Nutrición de la Sociedad Argentina de Pediatría. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los padres o tutores.

Análisis estadístico

Se realizó mediante el programa InStat®, GraphPad software, versión 3.0. Para evaluar diferencia de medias entre los grupos se utilizó el test paramétrico de ANOVA o el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Para evaluar diferencias entre proporciones se utilizó el test exacto de Fisher. Las diferencias halladas se consideraron estadísticamente significativas a partir de un $p < 0.05$.

RESULTADOS

Los resultados que se presentan corresponden a los 119 niños que permanecieron en el proyecto y tuvieron seguimiento satisfactorio durante 90 días. De ellos 62 niños presentaron peso normal para la talla (C) y 57 se identificaron como desnutridos (D) según el mismo criterio; 67 niños recibieron la leche fermentada con lactobacilos (LB) y 52 la leche fluida pasteurizada (L) quedando constituidos cuatro grupos experimentales: controles que recibieron leche (C-L; n=27) o leche fermentada con lactobacilos (C-LB; n=35) y desnutridos que recibieron leche (D-L; n=25) o leche fermentada (D-LB; n= 32). Durante el período del estudio no se registró ninguna muerte.

Prevalencia y duración de los episodios de diarrea

Como podía esperarse dadas las características de la población estudiada, se registró un número considerable de episodios de diarrea tanto en los niños desnutridos cuanto en los controles. Como criterio de análisis se tomó la duración en días del episodio: 1 a 4 d, 5 a 14 d, y diarrea prolongada (DP) en el caso de que el episodio persistiera por lo menos 15 días (7). En un primer análisis global, en el que no se tuvo en cuenta el estado nutricional, se obtuvieron los siguientes resultados: el número total de episodios registrados fue de 134, 12 de ellos de diarrea prolongada, todos en los niños que consumieron leche pasteurizada. En el grupo L (n=52) se presentaron 66 episodios y 68 en el grupo LB (n=67). En total los niños presentaron diarrea durante 543 días, de los cuales 416 fueron en el grupo L y 127 en el grupo LB lo que hace que los días promedio de diarrea por niño incluido en el estudio fueron 8,0 vs. 1,9; la duración media de los episodios fue de 6,3 vs. 1,9 días para los grupos L y LB, respectivamente.

Cuando al análisis se incorporó la variable estado nutricional se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 1. Tal como puede apreciarse en ella, de los 134 episodios 77 se presentaron en los desnutridos y 57 en los no desnutridos. Por otra parte, tanto en los desnutridos cuanto en los controles no desnutridos se observó que los niños del grupo L acumularon un número de días totales de diarrea que triplicaba a los de los niños del grupo LB, siendo aún mayor esta diferencia en los desnutridos. El porcentaje de niños que

presentaron algún episodio de diarrea fue muy inferior para el grupo C-LB respecto de los otros tres grupos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo C-L ($p = 0.0396$). El número de episodios por niño también fue menor para el grupo C-LB respecto de todos los otros grupos. Se presentaron 12 casos de DP, 9 en los desnutridos y 3 en los controles, que como ya se ha mencionado, se presentaron todos en los grupos que recibieron leche.

TABLA I
Características generales de las diarreas registradas durante el estudio agrupadas según estado nutricional y grupo experimental

	Desnutridos (n=57)		Controles (n=62)	
	Grupo L n=25	Grupo LB n=32	Grupo L n=27	Grupo LB n=35
Episodios totales	29	48	37	20
Niños que presentaron algún episodio	13	18	17	12
% de niños que presentaron diarrea	52	56	63	34
Episodios promedio por niño	1.16 ±1.34	1.50 ±1.68	1.37 ±1.36	0.57 ±0.88
Días de diarrea totales	266	75	150	52
Duración de los episodios (días)	9.17±8.35 ^a	1.56±0.85	4.05±5.31	2.60±1.60
Episodios de diarrea prolongada	9	0	3	0

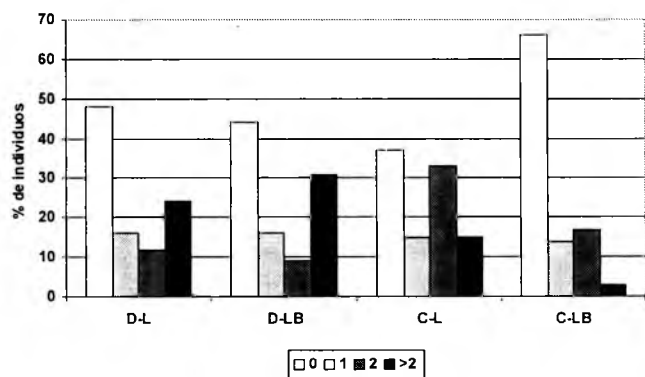
L: niños que recibieron leche; LB: niños que recibieron leche fermentada

^a $p < 0.001$ respecto de los grupos D-LB, C-L y C-LB.

Para analizar la influencia del estado nutricional sobre los efectos preventivos (número de episodios) y terapéuticos (duración de los episodios) los resultados se agruparon según un modelo 2x2: 2 estados nutricionales y 2 productos.

El aspecto preventivo de la administración del suplemento se muestra en la Figura 1 a través de la distribución porcentual de cada grupo según el número de episodios de diarrea registrados por niño. En ella se aprecia que en los niños controles que recibieron el suplemento de lactobacilos el porcentaje de los que no sufrieron ningún episodio fue muy superior al de los otros grupos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo C-L ($p=0.0396$); además, se observó un desplazamiento en el sentido de una menor acumulación de episodios por niño respecto del grupo que recibió la leche fluida, registrándose en el grupo C-LB sólo 1 niño (3%) que sufrió más de 2 episodios. En el grupo C-L el porcentaje de niños que tuvieron más de dos episodios de diarrea fue 5.1 veces superior a los observados en el grupo C-LB. Sin embargo, el escaso número de casos con más de dos episodios (4 vs. 1) no permitió detectar diferencias estadísticamente significativas.

FIGURA 1
Distribución porcentual de cada grupo según el número de episodios de diarrea registrados por niño

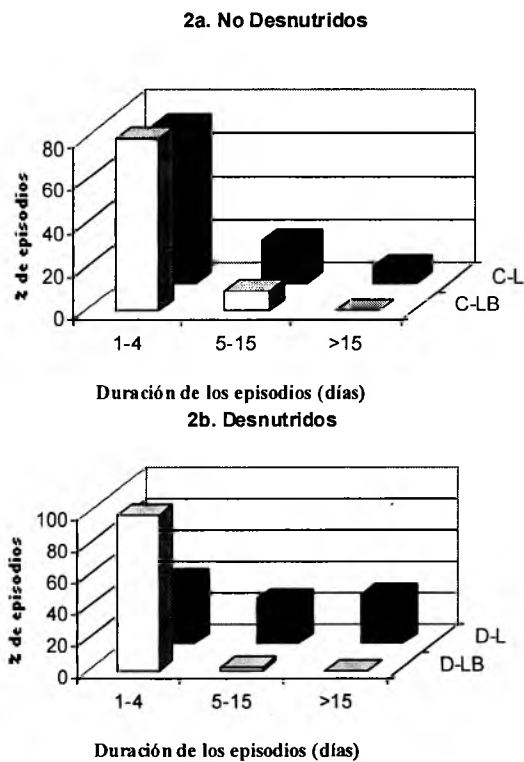


D-L: desnutridos que recibieron leche; D-LB: desnutridos que recibieron leche fermentada;

C-L: controles que recibieron leche; C-LB: controles que recibieron leche fermentada.

Cuando se aplicó el mismo modelo de análisis respecto de los efectos terapéuticos del suplemento, evaluados sobre la base de los cambios en la duración de los episodios se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 2. La figura permite apreciar que el producto fermentado fue efectivo para acortar la duración de las diarreas y que este efecto fue mucho más evidente en los desnutridos. En los niños no desnutridos (Figura 2a), la sustitución de la leche fluida por la fermentada dio por resultado un desplazamiento de las diarreas hacia las de menor duración y en ningún caso se superaron los 10 días por episodio; la efectividad fue mucho mayor en el grupo de los desnutridos (Figura 2b), tal que las diarreas de corta duración alcanzaron el 98% de los casos. En este sentido cabe destacar que el grupo D-L presentó un riesgo relativo de 28,1 de diarreas de más de 4 días de duración respecto del grupo D-LB (58.6 vs. 2.1%; $p < 0.0001$). A esto debe sumarse que la eliminación de los cuadros de diarrea prolongada dio por resultado la disminución de los días promedio de diarrea, por niño y por episodio.

FIGURA 2
Distribución porcentual de los episodios de diarrea de cada grupo según la duración de los mismos



D-L: desnutridos que recibieron leche; D-LB: desnutridos que recibieron leche fermentada;
C-L: controles que recibieron leche; C-LB: controles que recibieron leche fermentada.

DISCUSION

En las últimas décadas del siglo XX comenzó a darse base científica al muy antiguo uso tradicional de emplear bacterias lácticas con fines de prevención o cura de ciertas enfermedades. Entre las múltiples funciones que se han asignado a estos microorganismos, la más intensamente estudiada ha sido la relacionada con la prevención y tratamiento de las diarreas mediante la ingestión de alimentos fermentados con lactobacilos y bifidobacterias (3, 8-10). Desde la diarrea secretoria infecciosa, identificada habitualmente con la *diarrea estival* a la de origen viral, o la del viajero, pasando por la causada por la intolerancia a la lactosa o la ingestión de antibióticos, las bacterias lácticas han sido incluidas en múltiples proyectos destinados a evaluar su capacidad tanto para prevenir los cuadros de diarrea cuanto para acortar su duración cuando ésta ya se ha hecho presente (11-13).

La diarrea ha sido considerada desde hace mucho tiempo como una causa de desnutrición y la desnutrición como un factor que predispone a sufrir episodios de diarrea (14, 15). Es por eso que llama la atención que cuando se estudia el efecto de los lactobacilos a nivel de prevención o cura de las diarreas, el estado nutricional no haya sido habitualmente tomado en consideración.

En un estudio previo de nuestro grupo, en el cual fue analizada la interrelación entre estado nutricional y efectividad de los lactobacilos para prevenir y morigerar cuadros de patologías de vías respiratorias, quedó demostrado que la desnutrición actúa como un factor capaz de limitar la efectividad del suplemento de bacterias lácticas vivas (16). En este trabajo hemos investigado si el estado nutricional es capaz de ejercer un efecto similar en cuanto a la efectividad del mismo suplemento para prevenir y modificar la duración de episodios de diarrea infantil.

Influencia del estado nutricional sobre la aparición y duración de los episodios de diarrea

Como se ha mencionado, el efecto de la desnutrición sobre la efectividad de los suplementos dietarios de bacterias lácticas vivas no es una variable habitualmente tomada en consideración, y aún cuando se lo haga, no siempre se utiliza un diseño nutricional adecuado para ponerlo de manifiesto. Un buen ejemplo de esta situación es un estudio realizado en Perú en el cual se evaluó la capacidad del *Lactobacillus GG* para prevenir la diarrea en niños desnutridos (17); debido a que el diseño incluyó sólo niños desnutridos según el criterio de peso para la edad, la influencia de la variable *estado nutricional* no pudo ser analizada aunque esa haya sido, probablemente, la razón por la cual no se identificó una reducción clara de los episodios de diarrea (5.21 vs. 6.02 episodios por año) en los niños que recibieron el probiótico

respecto de los que recibieron placebo y que la efectividad haya sido considerada irrelevante desde el punto de vista de la salud pública (18). Este resultado no difiere conceptualmente del hallado por nosotros en los grupos desnutridos pero si difiere del comportamiento observado en los respectivos controles no desnutridos. Por otra parte, la falta de reducción de la duración de los episodios en el trabajo mencionado contrasta con nuestros resultados aunque ello podría deberse a que las diarreas que se presentaron tenían un promedio de 2 días de duración, no muy diferente del de nuestros niños del grupo D-LB pero si muy inferiores a las del grupo D-L cuya duración promedio fue elevada debido a la presencia de los 9 casos de diarrea prolongada; al respecto, si se eliminan del promedio los casos de DP, los valores obtenidos son similares a los del estudio de Perú, en ambos casos dentro del grupo de 1 a 4 días de duración.

A diferencia del trabajo arriba comentado, el objetivo de este estudio fue discriminar la influencia del estado nutricional como variable capaz de modificar la respuesta al suplemento de lactobacilos vivos en sus aspectos preventivos y terapéuticos sobre los cuadros de diarrea infantil.

La falta de efectividad en los aspectos preventivos hallada en los desnutridos contrasta con los resultados reportados por Saran y Col. (19), quienes describen que un suplemento de *L. acidophylus* en 50 g de cuajada por día, durante 6 meses, fue capaz de prevenir los episodios de diarrea, así como también favorecer el crecimiento en peso y en talla de los niños en comparación con aquellos que recibieron un suplemento isocalórico. Sin embargo, en el análisis no se ha tenido en cuenta la gran diferencia en el contenido de proteína de alta calidad de la cuajada respecto de un bizcocho isocalórico, diferencia que, a lo largo de 180 días, pudo haber contribuido a mejorar significativamente el estado nutricional de los sujetos en estudio respecto del de los controles. En los desnutridos de este estudio no se observaron diferencias en el porcentaje de niños que sufrió más de dos episodios entre el grupo LB y el grupo L; sí se hallaron diferencias entre los desnutridos y los controles del grupo LB ($p=0.0022$).

Efectos combinados de estado nutricional y producto recibido

En este estudio la presencia de desnutrición *per se* no modificó el porcentaje de niños que contrajeron diarrea respecto de los controles, cuando ambos consumían leche fluida, hecho que concuerda con observaciones de Black en Bangladesh (20); no obstante, los desnutridos tuvieron predisposición a sufrir mayor número de episodios de diarrea prolongada. Con la administración del suplemento de lactobacilos, el porcentaje de niños controles afectados por algún episodio de diarrea cayó prácticamente a la mitad sin que se observara un efecto similar en los desnutridos (Tabla 1); sin embargo en estos últimos, aunque más del 20% de los niños presentó más de dos episodios (Figura 1), la duración

pasó a ser en casi todos los episodios menor de 5 días (Figura 2 b). En resumen, los resultados permiten concluir que en los niños no desnutridos se verificó un efecto preventivo y curativo de los lactobacilos siendo el primero preponderante, mientras que en presencia de desnutrición sólo se evidenciaron los aspectos curativos en forma mucho más marcada que en los controles. No se puede descartar la influencia que en esta mejoría haya tenido la mejor tolerancia a la lactosa que es esperable en los productos fermentados respecto de la leche, y que ha sido observado para el producto utilizado en este estudio en adultos con hipolactasia e intolerancia clínica a la lactosa (21).

Los resultados de este estudio confirman hallazgos previos (16) acerca de la influencia del estado nutricional como factor modificador de la respuesta al suplemento de lactobacilos vivos. Estos hallazgos coinciden además con conocimientos existentes sobre las relaciones entre desnutrición y mecanismos de defensa tales como la expresión de la IgA y la inmunidad mediada por células en las placas de peyer (22) y también la expresión de los marcadores intracelulares de maduración del tejido linfóide asociado a la mucosa intestinal (23). En dichos estudios se verificó que para recuperar, aunque sólo sea parcialmente, los niveles de inmunoglobulina A y otros marcadores celulares, así como restaurar el ciclo y lograr la maduración celular es imprescindible, como mínimo, la recuperación del peso corporal. Por consiguiente no nos sorprenden los resultados obtenidos que son los esperables para una población de alto riesgo social y alta prevalencia de una deficiencia de peso de alrededor del 15%. Este puede ser un motivo fundamental de las discrepancias entre muchos de los trabajos reportados en la literatura y explicar el énfasis que se pone en los aspectos curativos de los lactobacilos mientras que no se dan por adecuadamente documentados los aspectos de prevención de las diarreas (3).

El análisis conjunto del número de casos de diarrea observados durante el seguimiento y de su severidad confirman que la leche cultivada con *Lactobacillus acidophyllus* y *casei* tiene efectos preventivos y curativos en niños pertenecientes a grupos de alto riesgo social (4,5). Los resultados de este estudio también confirmarían que, en lo que a la prevención de la aparición de las diarreas se refiere, la inmunoestimulación asociada a la ingestión de *Lactobacillus acidophyllus* y *casei* está limitada por la capacidad del organismo para poner en marcha una adecuada respuesta inmune (16). Por otra parte, durante el desarrollo del proceso diarreico el estado nutricional parece tener menor importancia y este hecho podría hallarse ligado al aumento de la proporción de lactobacilos en la microflora intestinal por el consumo del alimento fermentado (5); este mecanismo de defensa presenta características eminentemente locales ya que la presencia de los lactobacilos en el intestino puede considerarse una barrera microbiana que contribuye a impedir la colonización por los patógenos debido a la liberación de compuestos con capacidad antibiótica (24).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido parcialmente financiado mediante subsidio otorgado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires, UBACyT B065.

REFERENCIAS

- Sanders ME. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nutrition* 2000;130:384S-90S.
- Gorbach SL. Probiotics in gastrointestinal health. *Am J Gastroenterol* 2000;95 (Suppl): S2-4.
- De Roos MN, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 2000;71:405-11.
- Perdigón G, Nader de Macías ME, Alvarez S, Medici M, Oliver G, Pesce de Ruiz Holgado A. Actividad inmunopotenciadora de bacterias lácticas administradas por vía oral. Su efecto beneficioso en diarreas infantiles. *Medicina (Buenos Aires)* 1986; 46:351-4.
- Gaon D, Garmendia C, Murrielo NO, de Cuecco Games A, Quintas R, González SN, Oliver G. Efecto de *L casei* y *L acidophilus*, cepa CERELA sobre el sobrecrecimiento bacteriano relacionado a la diarrea crónica. *Medicina (Buenos Aires)* 2002;62:159-63.
- Ariza Macías J. Método para la evaluación del crecimiento de hombres y mujeres desde el nacimiento hasta los 20 años, para uso a nivel nacional e internacional. *Arch Latinoamer Nutr* 1972;22:531-46.
- The treatment of diarrhoea. WHO/CDR/95.3-10/95. A manual for physicians and other senior health workers. Documento OMS 1992.
- Rautanen T, Isolauri E, Salo E & Vesikari T. Management of acute diarrhoea with low osmolarity oral rehydration solutions and lactobacillus strain GG. *Arch Dis Child* 1998; 79:157-61.
- Isolauri E. Modification of viral diarrhoea by probiotics. En: *Probiotics 3. Immunomodulation by the gut microflora and probiotics*. R Fuller and G Perdigón. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht 2000; pp 139-47.
- Saavedra JM, Bauman NA, Oung Y, Perman JA, Yolken RH. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994;344:1046-49.
- Goldin BR. Health benefits of probiotics. *Br J Nutr* 1998;80:S203-207.
- Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *J Pediatr* 1999;135: 564-8.
- Marteau PR, de Vese M, Cellier CJ, Schezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001;73 Suppl:430S-6S.
- A Majid Molla, A Ayesha Molla. Diarrhoeal disease. En: *Encyclopedia of human nutrition*. MJ Sandler, IJ Strain, B Caballero, Academic Press, Londres 1999, pp 535-9.
- Briend A. Is diarrhoea a major cause of malnutrition among the underfives in developing countries? A review of available evidence. *Eur J Clin Nutr* 1990;44:611-28.
- Río ME, Zago LB, García H, Winter L. El estado nutricional modifica la efectividad de un suplemento dietario de bacterias lácticas sobre la aparición de patologías de vías respiratorias en niños. *Arch Latinoamer Nutr* 2002;52:29-34.
- Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, Taylor DN, Black RE, Cabrera L, Lescano AG, Meza R, Madico G. A placebo-controlled trial of lactobacillus to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J. Pediatr* 1999;134:15-20.
- Editorial. Prevention of diarrhea by the probiotic, Lactobacillus GG. *J pediatr* 1999; 134:1-2.
- Saran S, Gopalan S, Prasanna Krishna T. Use of fermented foods to combat stunting and failure to thrive. *Nutrition* 2002; 18: 393-6.
- Black RE, Brown KH and Becker S. Malnutrition is a determining factor in diarrhoeal duration, but not incidence, among young children in longitudinal study in rural Bangladesh. *Am J Clin Nut* 1984;39:87-94.
- Gaon D, Doweck Y, Gómez Zavaglia A, Ruiz Holgado A, Oliver G. Digestión de la lactosa por una leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* de origen humano. *Medicina (Buenos Aires)* 1995; 55: 237-242.
- Pallaro AN, Fernandez I, Río ME, Roux ME, Slobodianik NH. Low quality dietary protein: its impact on Wistar rat's mesenteric lymph nodes. *J Nutr Immunol* 1996;4:65-74.
- Slobodianik NH, Langini SH, Río ME, Sanahuja JC, López MC, Roux ME. Effect of casein on the recovery of lymphoid organs surface and intracellular markers in growing rats. *Comunicaciones Biológicas (Argentina)* 1984; 3: 191-9.
- Heymen M. Effect of lactic acid bacteria on diarrheal disease. *J Am Coll Nutr* 2000;19: 137S-46S.

Recibido: 11-02-2004

Aceptado: 05-08-2004

Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7

Xinia Barrantes, Dylana Railey, María Laura Arias y Carolina Chaves

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

RESUMEN. Se estudió el efecto de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 inoculados en yogurt durante su almacenamiento. En tres ocasiones diferentes, dos distintas marcas comerciales de yogurt, una con probióticos adicionales (*Lactobacillus casei* y *L. acidophilus*) fueron inoculadas con una población conocida (10^6 UFC/g) de *L. monocytogenes* o *E. coli* O157:H7 y almacenadas a 5°C por 32 días. Cada cuatro días se realizó un recuento de bacterias lácticas, de los patógenos agregados y se determinó el pH, de acuerdo a la metodología descrita en el Bacteriological Analytical Manual. El número de bacterias lácticas y el pH se mantuvieron constantes durante el período de evaluación. El yogurt con probióticos adicionales redujo la población de *L. monocytogenes* a niveles no detectables en 8 días de almacenamiento, la población de *E. coli* O157:H7 en 16 días; el yogurt sin probióticos adicionales tardó 20 días en reducir la población de *L. monocytogenes* a niveles no detectables y aún después de 28 días de almacenamiento, se pudo cultivar la *E. coli* O157:H7. En este trabajo, se confirma de nuevo los efectos beneficiosos de los cultivos probióticos adicionales en yogurt.

Palabras clave: Yogurt, probióticos, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7.

SUMMARY. Evaluation of the effect of probiotic cultures added to commercial yogurt over a known population of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. The effect of probiotic cultures over *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 during yogurt storage was evaluated. Two different yogurt brands, one with additional probiotic cultures (*Lactobacillus casei* and *L. acidophilus*) were inoculated with known populations (10^6 UFC/g) of either *L. monocytogenes* or *E. coli* O157:H7 in three different times and stored for 32 days at 5°C. Every four days the count of lactic bacteria, the added pathogens and pH was evaluated, according to the methodology described in the Bacteriological Analytical Manual. The pH and lactic bacteria population were constant during the testing period. Yogurt with additional probiotic cultures reduced the population of *L. monocytogenes* in 8 days, the population of *E. coli* O157:H7 in 16; yogurt with no additional probiotics took 20 days to reduce *L. monocytogenes* to non-detectable levels and even after 28 days of storage, *E. coli* O157:H7 was cultured. In this work, the beneficial effects of additional probiotic cultures in yogurt is confirmed again.

Key Words: Yogurt, probiotics, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7.

INTRODUCCION

Se define probiótico como todo microorganismo vivo, cuya ingestión en cierto número confiere beneficios a la salud más allá de sus beneficios nutricionales inherentes (1).

En los últimos tiempos estos productos han adquirido una gran relevancia como complemento alimentario dada la gran cantidad de cualidades que se les atribuyen. Se ha observado que los probióticos tienen efectos más allá del valor nutritivo del alimento, incluyendo la exclusión, antagonismo e interferencia con microorganismos patógenos, la inmunoestimulación e inmunomodulación, actividades anticarcinogénicas y antimutagénicas, alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa, reducción de colesterol sérico, reducción de la presión arterial, disminución en la incidencia y duración de diarrea (*Cl. difficile*, rotavirus y ETEC), prevención de vaginitis y mantenimiento de la integridad de las mucosas entre otras (1). Otros beneficios incluyen la

estimulación de la síntesis de vitaminas y producción de enzimas, estabilización de la microflora, y reducción del riesgo de cáncer de colon (2).

Son muchos los microorganismos utilizados como probióticos tanto en animales como en humanos, incluyendo los géneros *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y, el más utilizado de todos, *Lactobacillus* (3).

El interés por los cultivos probióticos y su uso en de los productos lácteos fermentados ha crecido en los últimos años (4). Tradicionalmente la producción de yogurt está basada en la adición de fermentos de *Streptococcus salivarius thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. Hoy día, la introducción de microorganismos probióticos ha permitido no sólo mejorar la producción de éste (por ejemplo para disminuir la postacidificación), sino también el que actúe como agente terapéutico, causando efectos beneficiosos en las personas que los ingieren (5).

Por otra parte, de acuerdo con las últimas estadísticas presentadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades de transmisión alimentaria son actualmente, de 300 a 350 veces más frecuentes de lo indicado en reportes anteriores y entre los principales patógenos involucrados en estas enfermedades se encuentran *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* (6).

De acuerdo con estudios realizados en Canadá y Estados Unidos, la *Escherichia coli* O157:H7 ocupa el segundo lugar entre los enteropatógenos bacterianos asociados a diarrea no específica y es el agente más frecuente en casos de diarrea sanguinolenta (7). Por otro lado, *Listeria monocytogenes* es el agente bacteriano asociado a enfermedad alimentaria con un 20-30% de letalidad.

El efecto de cultivos probióticos sobre estos dos patógenos ha sido estudiado, no obstante, los resultados obtenidos han sido divergentes, dada la variación en los cultivos y sistemas utilizados (8-11).

El objetivo del presente estudio es el evaluar el posible efecto inhibitorio que puedan ejercer las bacterias lácticas presentes en dos marcas comerciales costarricenses de yogurt sobre los patógenos anteriormente mencionados y su conservación durante el tiempo de almacenaje.

MATERIAL Y METODOS

Localización del proyecto

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica; durante los meses de mayo a setiembre del 2001.

Materiales

Cultivo de *Listeria monocytogenes*, cepa WS 2247 (112 UCR), suministrada por el Laboratorio de Bacteriología, Facultad de Microbiología, UCR.

Cultivo de *Escherichia coli* O157:H7, cepa de origen clínico, Hospital Nacional de Niños.

Yogurt A. Yogurt de fresa, presentación de un litro, conteniendo *Lactobacillus acidophilus* (CRL 730) y *Lactobacillus casei* (CRL 431) como cultivos probióticos. Como cultivo tradicional se utilizó cultivos lácticos YC 180 (CHR HANSEN®), que contiene una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.

Yogurt B. Yogurt de fresa, presentación de un litro. Como cultivo tradicional presenta cultivos lácticos YC 180 (CHR HANSEN®), que contiene una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. No contiene probióticos adicionales.

Metodología

Definición de los sistemas

Se conformaron cuatro sistemas: yogurt A + *E. coli*, yogurt B + *E. coli*, yogurt A + *L. monocytogenes*, yogurt B + *L. monocytogenes*.

Lo anterior se resume en la siguiente Tabla.

TABLA 1
Diferentes tratamientos según el sistema empleado

Sistema	Yogurt	Bacteria patógena
1	A	<i>L. monocytogenes</i>
2	A	<i>E. coli</i> O157:H7
3	B	<i>L. monocytogenes</i>
4	B	<i>E. coli</i> O157:H7

Inoculación de los sistemas

Durante tres ocasiones diferentes, se preparó una suspensión de aproximadamente 10^8 UFC/mL de *Listeria monocytogenes* y otra de *Escherichia coli* O157:H7. Se utilizó 25 mL de esas suspensiones para inocular, respectivamente, 1 L de yogurt de fresa de cada una de las 2 distintas marcas a estudiar. Se almacenó cada sistema a 4°C por 32 días.

Medición de las poblaciones

Las poblaciones iniciales de bacterias lácticas, *L. monocytogenes* y *E. coli* fueron medidas por recuento total (UFC/g) en cada uno de los sistemas mencionados y luego se monitorearon estas poblaciones durante 32 días o hasta la desaparición del patógeno agregado, haciendo mediciones cada 4 días. Se utilizó la técnica de recuento total (UFC/g) para las bacterias mencionadas, exceptuando el monitoreo de *E. coli* que se realizó por la técnica de Número Más Probable (NMP/g), utilizando series de tres tubos. Al mismo tiempo, durante esos 32 días se determinaron las variaciones de pH utilizando un pHmetro de la casa Cole-Parmer.

Recuento total de Bacterias Lácticas

Se realizó tomando alícuotas de 25g del yogurt y se colocó en 225 mL de agua peptonada estéril (APE) (10^{-1}). A partir de esta dilución se hicieron diluciones consecutivas decimales que se inocularon en agar MRS, según el procedimiento para la determinación de bacterias lácticas descrito por Vanderzant & Splittstoesser (12).

Recuento total de *L. monocytogenes*

Se realizó utilizando las diluciones descritas anteriormente las cuales fueron inoculadas en agar Oxford, por esparcimiento, e incubadas a 35°C por 48 horas.

NMP de *E. coli* O157:H7

Se realizó utilizando las diluciones descritas anteriormente las cuales fueron inoculadas en series de 3 tubos de caldo EC e incubadas a 35°C por 24 horas (fase de enriquecimiento). Los tubos positivos por turbidez y formación de gas fueron rayados en agar McConkey Sorbitol, el cual se incubó a 35°C por 24 horas (fase selectiva).

RESULTADOS Y DISCUSION

Diversas investigaciones han demostrado que varias especies de probióticos presentan una acción antagónica en contra de patógenos intestinales y de deterioro de alimentos (2,13). Esta acción es constatada al evaluar cada sistema de yogurt inoculado a través del tiempo, los cuales presentaron una disminución en la población de los microorganismos patógenos agregados. En la Figura 1 se describe el comportamiento de *L. monocytogenes* inoculada en los yogures A y B. Para el sistema 1, (yogurt A inoculado con *L. monocytogenes*), la desaparición de esta última se dio al octavo día. Para el sistema 3 (yogurt B inoculado con *L. monocytogenes*), la desaparición de esta bacteria se dio hasta el día 20 de almacenamiento. Por otro lado, la población de bacterias lácticas permaneció en 10^8 UFC/g durante las mediciones, mientras que el pH se mantuvo entre 3,6 y 4 (el pH original del producto es 4,1).

El descenso en el pH del medio es considerado como un factor importante para controlar el crecimiento de patógenos, pues muchos se ven inhibidos a pH bajos. La *L. monocytogenes* es una bacteria que ha demostrado, en diversos estudios, su resistencia tanto a pH ácido, así como su capacidad de multiplicación a bajas temperaturas. Estudios efectuados con *L. monocytogenes* revelan que ésta puede crecer en un ámbito de pH entre 5,0 y 9,6, siendo su pH óptimo de crecimiento alrededor de 7,0, aunque le favorece una ligera alcalinidad (14). Por su parte, Brackett (9) establece que el ámbito de pH en el cual *L. monocytogenes* puede crecer es de 5,6 a 9,8. Es importante destacar que Sorrels et al (13) reportaron que la bacteria puede crecer a pH 4,4, un valor considerablemente inferior de lo anteriormente reportado. Por otro lado, Gahan et al (15) reporta la adaptación de esta bacteria a condiciones ácidas, mediante el fenómeno de respuesta ácido tolerante (ATR), logrando sobrevivir a pH de 3,87 inclusive.

Dadas las anteriores aseveraciones, es muy probable que la disminución en número sufrida por esta bacteria en los yogures A y B sea por un efecto independiente del grado de pH alcanzado pero asociado a las bacterias lácticas presentes o a sus productos metabólicos.

Datos similares fueron obtenidos por Zúñiga y colaboradores (16), donde una concentración de 10^3 UFC/mL de *L. monocytogenes* fue inoculada en leche fermentada

con cultivo iniciador para yogurt (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*), disminuyendo en pocas horas y para una concentración de 10^7 UFC/mL desapareció al cabo de 32 días.

En la Figura 2 se describe el comportamiento de *E. coli* O157:H7 inoculada en los yogures A y B. Para el sistema 2, (yogurt A inoculado con *E. coli* O157:H7), la desaparición de esta última se dio al décimo sexto día de almacenamiento. Para el sistema 4 (yogurt B inoculado con *E. coli* O157:H7), hubo detección de esta bacteria aún luego del día vigésimo octavo de almacenamiento. Por otro lado, al igual que en los sistemas anteriores, la población de bacterias lácticas permaneció en 10^8 UFC/g durante las mediciones, mientras que el pH se mantuvo entre 3,6 y 4.

FIGURA 1

Comportamiento de *Listeria monocytogenes* en yogurt con y sin prebióticos adicionados a través del tiempo

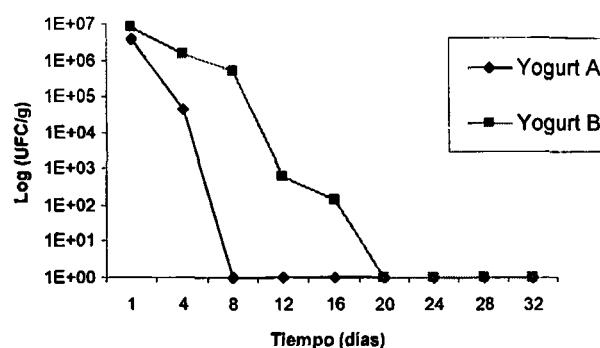
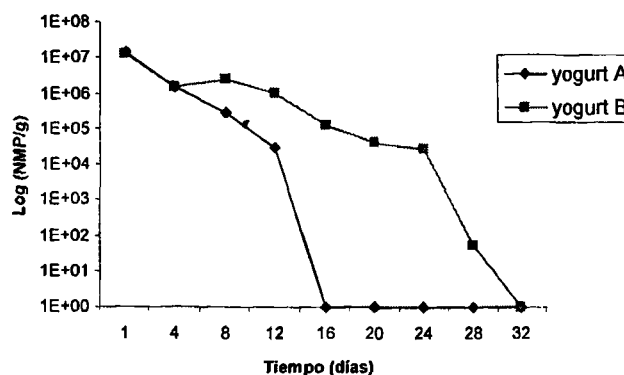


FIGURA 2

Comportamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en yogurt con y sin prebióticos adicionados a través del tiempo



Los estudios realizados por Arias et al. (17) en leche pasteurizada inoculada con este patógeno demuestran que éste posee una importante resistencia a bajas temperaturas y es capaz de reproducirse a pH ácido.

Según los datos obtenidos y dadas las condiciones de almacenamiento y acidez del producto, se puede aducir a los cultivos probióticos adicionados en el yogurt A una importante acción en la disminución de la *E. coli* O157:H7. En el sistema 4, la leve y tardía disminución de *E. coli* O157:H7 puede deberse al efecto de sus propios desechos o al agotamiento de nutrientes dado que no hay probióticos adicionales.

A partir de los datos obtenidos, se podría concluir que el yogurt A es más eficiente en la inhibición in vitro de las bacterias patógenas adicionadas que el yogurt B; ya que inhibe a *L. monocytogenes* en un período de 8 días y a *E. coli* en 16 días; mientras que el yogurt B lo logra en 20 y más de 28 días, respectivamente. La efectividad del yogurt A se puede explicar basado en el hecho de que éste tiene, además del cultivo iniciador tradicional (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*), las cepas probióticas mejoradas (*Lactobacillus acidophilus* (CRL 730) y *Lactobacillus casei* (CRL 431)). La producción de ácidos orgánicos, compuestos carboxílicos y bacteriocinas como la acidofilina, acidolina, lactocidina y bactericina son algunas de las posibilidades planteadas para explicar la acción de los probióticos.

Sin embargo, el cultivo iniciador por sí sólo (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*) también genera sustancias que pueden actuar como bactericidas, lo cual explicaría la disminución de las bacterias patógenas que también ocurre en el caso del yogurt B. En estudios realizados por Gallardo et al, 1988, se aislaron proteasas extracelulares que presentan acción en leche a partir de *Lactobacillus bulgaricus*, y se purificaron proteasas intracelulares de *Streptococcus thermophilus*, lo cual explicaría la acción del yogurt B (18).

La eficiencia de los probióticos en inactivar *L. monocytogenes* más rápido que *E. coli* O157:H7 puede explicarse con base a la acción de bacteriocinas producidas por algunas especies de probióticos. Las bacteriocinas producidas especialmente por lactococos y lactobacilos demuestran una actividad bactericida dirigida hacia bacterias Gram positivas (19-21). En condiciones normales, las bacterias Gram negativas son poco sensibles a bacteriocinas (21-24), debido a la membrana externa y constitución de su pared.

Los niveles necesarios para que las bacterias probióticas ejerzan su acción contra bacterias patógenas in vivo dependen de una dosis mínima por porción de 2×10^6 bacterias/g. En este trabajo se midieron poblaciones in vitro de 10^8 UFC/g, las cuales al llegar al sistema digestivo se verán afectadas por una acidez estomacal de rango menores a los que estas bacterias toleran, sin embargo, se ha encontrado que pueden liberar sustancias al medio logrando un efecto "bufferizante" de los alrededores, aumentando el pH y manteniendo su sobrevivencia (25).

En este trabajo se comprobó el beneficio de los probióticos, especialmente el proveniente de cepas especializadas que en los últimos tiempos se añaden a los alimentos con el fin de

conferir mayores beneficios. No obstante, se comprueba también que las bacterias patógenas pueden sobrevivir al bajo pH y a las temperaturas de refrigeración por un tiempo significativo, existiendo la posibilidad de que si contaminaran productos lácteos después de la pasteurización, podrían sobrevivir el tiempo necesario para infectar a alguna persona. Esto resalta la importancia de un buen manejo durante la producción y almacenamiento del yogurt.

REFERENCIAS

1. Klaenhammer T. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *J Nutr.* 2000;130: 415S-416S.
2. Naidu A, W Bidlack & A Clemens. Probiotic spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nut.* 1999;38(1): 13-126.
3. Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65: 3763-3766.
4. Tecnología Láctea Latinoamericana. Oportunidades para los probióticos en productos lácteos. *Tecnología Láctea Latinoamericana.* 1999;17: 60-65.
5. CHR Hansen. Simposium de quesos y productos lácteos fermentados. San José, Costa Rica, pp 2-4, 1998.
6. World Health Organization. Foodborne disease-possibly 350 times more frequent than reported. WHO, Geneva, 1997.
7. Karmali M. Salud Pública y Aspectos Preventivos de la Invección por *Escherichia coli* productora de Verotoxina. <http://www.hospitalitaliano.org>, 2001.
8. Berrocal D, Arias ML, Wong E, Henderson M. Evaluación del efecto de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogurt. *Arch Latinoamer Nutric.* 52, 2002.
9. Bracket, R. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Tech.* 1988;42: 162-164.
10. Charlton, B. Environmental survey of *Listeria* species in California milk processing plants. *J. Food Prot.* 1990;53: 198-201.
11. Hoover, D. Bifidobacteria: activity and potential benefits. *Food Tech.* 1993;47:120-124.
12. Vanderzant C & Splittstoesser D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA. Washington DC. 1995;553-590.
13. Sorrells, K, D Enigl & J Hatfield. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 1989;52: 571-573.
14. Donnelly C. & Briggs, E. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J Food Prot.* 1986;49: 994-998.
15. Gahan C, B O'Driscoll & C Hill. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Food Tech.* 1996;62: 3128-3132.
16. Zúñiga A, A López-Merino & L Mota de la Garza. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en leche fermentada con un cultivo iniciador para elaborar yogur. *Rev Lat Microbiol.* 1995;37: 257-265.
17. Arias, M.L, Monge R, Antillón F & Chaves C. Effect of stor-

- age temperatura on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in foods from a neotropical environment. *Rev Biol Trop.* 2001;42: 517-524.
18. Gallardo N, Flores V, Hernández S. Estudio de la cinética de crecimiento de las bacterias del yogurt y caracterización parcial de una proteasa de *Streptococcus thermophilus*. *Procesamiento y conservación de Alimentos de América Latina e Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología.* 1997;2: 178-193.
 19. Blackburn P, Polar J, Gusik A & Rubing D. Nisin composition for the use as enhanced broad range bactericides. International Patent Application publication WO 89112399, 1989.
 20. Kalchayananel N, Itanilin M & Ray B. Sublethal injury makes Gram negative and resistant Gram positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcTI and nisin. *Lett Appl Microbiol.* 1992;15: 239-243.
 21. Stevens K, Sheldon B, Klapes N & Klaenhammer T. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram negative bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57: 3613-3615.
 22. Sahl H.G. Influence of the staphylococcin-like peptide Pep5 on membrane potential of bacterial cells and cytoplasmic membrane vesicles. *J Bacteriol.* 1985;162: 833-836.
 23. Hurts, A. Nisin. *Adv. Appl Microbiol.* 1981;27: 85-123.
 24. Ray B & Daeschel, M. Food biopreservatives of microbiological origin. CRC press, Ing., Boca Ratón, Fla, 1992.
 25. Jack R, Tagg J & Ray B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microb. Rev.* 1995;59:171-200.

Recibido: 17-09-2002

Aceptado: 28-06-2004

Evaluación del efecto de cultivos probióticos presentes en yogurt sobre *Staphylococcus aureus* y la producción de termonucleasa

Marlon Salvatierra, Andrea Molina, María del Mar Gamboa y María Laura Arias

Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

RESUMEN. Se estudió el efecto de cultivos probióticos sobre poblaciones conocidas de *Staphylococcus aureus* inoculadas en yogurt, a lo largo de su vida útil normal (28 días); también se evaluó el efecto de éstos sobre la producción y estabilidad de su termonucleasa. En tres ocasiones distintas dos marcas comerciales de yogurt, una con probióticos adicionados (*Lactobacillus casei* y *L. acidophilus*), fueron inoculadas con una población conocida de *S. aureus* en alta y baja concentración (10^9 UFC/g y 10^7 UFC/g, respectivamente) y almacenadas a 5°C por 28 días. Cada cuatro días se realizó un recuento de bacterias lácticas, de *S. aureus* y se midió el pH de acuerdo a la metodología descrita en el Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods, Vanderzant & Splittstoesser; además se determinó la presencia de termonucleasa usando petrifilm *S. aureus* de la casa 3M ®. El número de bacterias lácticas y el pH se mantuvo constante durante el período de evaluación en ambos tipos de yogurt. La población de *S. aureus* (en alta y baja concentración) se redujo a niveles indetectables en 8 días de almacenamiento en el yogurt con probióticos; mientras que a partir del yogurt sin probióticos se pudo aislar esta bacteria aún después de 24 días de almacenamiento. Se pudo detectar la termonucleasa a lo largo de todo el estudio, aún en el yogurt con probióticos. La presencia de termonucleasa se relaciona, con una alta probabilidad, con la producción de enterotoxina de *S. aureus*. Este trabajo confirma de nuevo los efectos beneficiosos de los cultivos probióticos en yogurt sobre bacterias, así como la necesidad de mantener las normas de higiene para evitar que *S. aureus* contamine alimentos y pueda producir enterotoxina, ya que ésta no es afectada por los probióticos. **Palabras clave:** Yogurt, probióticos, *Staphylococcus aureus*, termonucleasa.

SUMMARY. Evaluation of the effect of probiotic cultures on two different yogurt brands over a known population of *Staphylococcus aureus* and the production of thermonuclease. The effect of probiotic cultures over known populations of *Staphylococcus aureus* inoculated in yogurt was studied; also the production and stability of its thermonuclease during yogurt storage was evaluated. In three different occasions, two different yogurt brands, one with additional probiotic cultures (*Lactobacillus casei* and *L. acidophilus*), were inoculated with known populations of *S. aureus* in high and low concentration (10^9 CFU/g and 10^7 CFU/g), respectively. These samples were stored for 28 days at 5°C. Every four days the count of lactic bacteria, *S. aureus* and pH were evaluated, according to the methodology described in the Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Vanderzant & Splittstoesser. The presence of thermonuclease was determined using petrifilm for *S. aureus* from 3M company ®. The pH and lactic bacteria population were constant during the testing period. Yogurt with additional probiotic cultures (high and low concentration) lowered the population of *S. aureus* to non detectable levels in 8 days; but, *S. aureus* could be cultured from yogurt without probiotics even after 24 days of incubation. Same time, the presence of thermonuclease was positive in all tests; it was not affected by probiotics. The presence of thermonuclease is related to the production of *S. aureus* enterotoxin. This work emphasizes again the beneficial effects of probiotic cultures in yogurt over bacteria and the importance of keeping hygienic practices in order to avoid the contamination of food with *S. aureus* and the eventual production of its enterotoxin, since it is not affected by probiotics.

Key words: Yogurt, probiotics, *Staphylococcus aureus*, thermonuclease.

INTRODUCCION

El yogurt es un gel de apariencia viscosa, resultante de la acidificación microbiana de la leche (1). Intervienen en su fermentación ácido láctica las bacterias *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, las cuales deben encontrarse en una relación 1:1 para una acción simbiótica efectiva. Los cocos son los responsables de la producción de ácido, los bacilos aportan el sabor y aroma debido a la

producción de acetaldehído (2).

La relevancia del yogurt y su asociación con la salud surgió en Europa, a partir de los estudios de Metchnikoff y su teoría de la longevidad de los pueblos balcánicos asociada al alto consumo de productos fermentados de leche (2,3). Actualmente, diversos investigadores han estudiado los microorganismos utilizados en la producción de leche fermentada y productos afines y sus efectos beneficiosos sobre el metabolismo humano y animal (2-4). Estos microorganismos

vivos, conocidos como probióticos, son considerados como suplementos alimenticios que afectan benéficamente la fisiología del huésped, mediante la modulación intestinal y del sistema inmunológico y que mejoran el balance nutricional y microbiano en el tracto gastrointestinal, entre otros (3-4).

El interés por los cultivos probióticos y su uso en la industria de productos lácteos fermentados ha florecido en el último lustro (5), no sólo desde el punto de vista terapéutico, causando efectos beneficiosos en las personas que los ingieren (6), sino también como agente antagónico de agentes patógenos entéricos (2-4). Diversos trabajos han demostrado que las bacterias probióticas son capaces de prevenir la adherencia, establecimiento, replicación y acción patogénica de enteropatógenos específicos en el intestino y en alimentos, ya sea provocando un descenso en el pH a través de la producción de ácidos orgánicos volátiles de cadena corta, interviniendo en la disponibilidad de nutrientes necesarios para los patógenos, disminuyendo el potencial de óxido reducción del medio o produciendo compuestos inhibitorios específicos, incluyendo bacteriocinas (2,4,6).

Staphylococcus aureus es una de las bacterias que con mayor frecuencia producen brotes alimentarios, dada su amplia distribución en la naturaleza así como su capacidad de producir diversas enzimas y toxinas (7). Se incluyen dentro de estas últimas, diversas enterotoxinas termoestables, destacándose la enterotoxina A, la cual es extremadamente potente, una cantidad tan pequeña como 100 ng es suficiente para causar síntomas de intoxicación (8).

La producción de enterotoxinas se da bajo una gran gama de condiciones ambientales y de almacenamiento, especialmente en aquellas donde haya aerobiosis, un aw superior a 0,85, un pH superior a 5,0 y baja competencia microbiana. Por otro lado, estas enterotoxinas son muy resistentes al calor y son capaces de soportar tratamientos de cocción y hasta de esterilización (9).

Diversos trabajos científicos han evaluado el efecto de cultivos probióticos sobre el crecimiento de bacterias patógenas entéricas (10-13), obteniéndose resultados diversos pero que identifican claramente la acción antagónica de especies de probióticos sobre microorganismos patógenos. Por otro lado, existe un creciente interés relacionado con las malas prácticas sanitarias en la preparación de alimentos y su relación con la producción de brotes alimentarios. Siendo *S. aureus* una de las principales causas de intoxicación alimentaria a nivel mundial (6), el objetivo del presente estudio es evaluar el efecto inhibitorio que puedan ejercer las bacterias probióticas presentes en yogurt costarricense en el crecimiento y producción de enterotoxinas de *S. aureus*.

MATERIAL Y METODOS

Localización del proyecto

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica; durante los meses de mayo a octubre del 2002.

Materiales

Cultivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, productora de enterotoxina, suministrada por el Laboratorio de Bacteriología, Facultad de Microbiología, UCR.

Yogurt A. Yogurt de fresa, presentación de un litro. Como cultivo tradicional contiene cultivos lácticos YC 180 (CHRHANSEN®) el cual consiste en una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* y como cultivos probióticos adicionales *Lactobacillus acidophilus* (CRL 730) y *Lactobacillus casei* (CRL 431), añadidos después de la pasteurización.

Yogurt B. Yogurt de fresa, presentación de un litro. Como cultivo tradicional presenta cultivos lácticos YC 180 (CHRHANSEN®), el cual consiste en una mezcla de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. No contiene probióticos adicionales.

Metodología

Definición de los sistemas

En tres ocasiones diferentes, se conformaron cuatro sistemas: yogurt A (con probióticos) +*S. aureus* en alta concentración; yogurt A (con probióticos) +*S. aureus* en baja concentración; yogurt B (sin probióticos) +*S. aureus* en alta concentración y yogurt B (sin probióticos) +*S. aureus* en baja concentración. Lo anterior se resume en la Tabla 1.

TABLA 1

Composición de los sistemas empleados para determinar la actividad de cultivos probióticos sobre una población conocida de *S. Aureus*

Sistema	Yogurt	Bacteria patogena
1	A (con probióticos)	<i>S. aureus</i> (en alta concentración)
2	A (con probióticos)	<i>S. aureus</i> (en baja concentración)
3	B (sin probióticos)	<i>S. aureus</i> (en alta concentración)
4	B (sin probióticos)	<i>S. aureus</i> (en baja concentración)

Inoculación de los sistemas

Para el análisis de *S. aureus* en alta concentración en los dos tipos de yogurt evaluados (A y B), se inoculó 25 mL de una suspensión inicial con una concentración aproximada de

$10^8 - 10^9$ UFC/mL (sistemas 1 y 3). Para la inoculación de *S. aureus* en baja concentración, se preparó una dilución 1:100 de la suspensión inicial, obteniéndose concentraciones de $10^6 - 10^7$ UFC/mL aproximadamente, a partir de la cual se inoculó 25 mL en cada uno de los dos tipos de yogurt evaluados (sistemas 2 y 4). Se almacenó cada sistema a 4°C por 28 días.

Medición de las poblaciones

Las poblaciones iniciales de bacterias lácticas y *S. aureus* fueron medidas por recuento total (UFC/g) en cada uno de los sistemas mencionados, utilizando agar MRS y agar Baird Parker, respectivamente. Las poblaciones fueron monitoreadas durante 28 días, cada 4 días. Al mismo tiempo, se determinaron las variaciones de pH utilizando un pHmetro (Cole-Parmer).

Recuento total de bacterias lácticas

Se realizó tomando alícuotas de 25 g del yogurt que se añadieron a 225 mL de agua peptonada estéril (APE) (10^{-1}). A partir de esta dilución se hicieron diluciones decimales seriadas que se inocularon en agar MRS, según el procedimiento para la determinación de bacterias lácticas descrito por Vanderzant & Splittstoesser (9).

Recuento total de *S. Aureus*

Se realizó utilizando las diluciones descritas anteriormente las cuales fueron inoculadas en agar Baird Parker, por espárcimiento, e incubadas a 35°C por 48 horas.

Detección de la termonucleasa

Durante la incubación de los sistemas de yogurt citados, se determinó también la presencia de termonucleasa, utilizando la placa de recuento rápido de *S. aureus* (Petrifilm) de la casa 3M®. Cada cuatro días se inocularon 1 mL de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} preparadas en placas de petrifilm, las cuales permiten confirmar la presencia de termonucleasa mediante el indicador de azul de ortotoluidina.

RESULTADOS Y DISCUSION

El interés por los cultivos probióticos y su uso en los productos lácteos fermentados ha florecido en los últimos años (5), sobre todo debido a diversas investigaciones que han demostrado el poder antagonico de éstos en contra de patógenos intestinales que se transmiten por alimentos, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp., entre otros, a nivel de hospedero y de alimento (2, 10, 14).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo también permiten constatar el efecto antagonico de probióticos sobre la multiplicación de *S. aureus*. En la figura 1, se muestra el comportamiento de *S. aureus* (población alta) en yogurt con

y sin probióticos adicionados. Una concentración inicial de *S. aureus* de $4,1 \times 10^7$ UFC/g es reducida a <10 UFC/g en término de ocho días en yogurt con probióticos adicionados; esta misma población disminuye únicamente 4 logaritmos en yogurt sin probióticos adicionados, a lo largo de 28 días.

La desaparición del *S. aureus* en el yogurt con probióticos adicionados puede deberse a varias razones, incluyendo la competencia por nutrientes y espacio, la producción de bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, disminución del potencial de óxido reducción, entre otros (15).

Es necesario destacar que la acidez del medio es un factor importante en el control del crecimiento de patógenos, pues muchos se ven inhibidos en ambientes ácidos. No obstante, en el presente trabajo, el pH de los dos tipos de yogurt mostró muy leves modificaciones a través del tiempo de incubación (de 3,6 a 4), las cuales fueron independientes de la presencia de probióticos y probablemente no afectaron el crecimiento de la bacteria estudiada, ya que ésta es capaz de crecer en ambientes de pH aún más ácido (9).

También debe mencionarse que el número inicial de bacterias lácticas presentes en el yogurt con probióticos adicionados fue de $1,0 \times 10^8$ UFC/g y se mantuvo constante a través del período de incubación. Este número es el recomendado por la Organización Mundial de la Salud como la cantidad necesaria para que ejerzan sus efectos beneficiosos sobre el organismo, a pesar de la reducción que sufren al pasar por la barrera de la acidez estomacal (6,16).

En el caso de los yogures sin prebióticos (sistemas 3 y 4), la paulatina disminución en el número de bacterias inoculadas puede deberse al agotamiento de nutrientes en el medio, la acumulación de metabolitos o bien a la generación de sustancias bactericidas por parte del cultivo iniciador por sí solo (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*). Diversos estudios han demostrado la presencia de proteasas extracelulares generadas en leche por *Lactobacillus bulgaricus*, así como la producción de proteasas intracelulares por parte de *S. thermophilus* (15).

La Figura 2 muestra el comportamiento de *S. aureus* (población baja) ante yogurt con y sin probióticos adicionados. Al igual que en el Figura 1, la población de esta bacteria desaparece al cabo de 8 días de incubación en el yogurt con probióticos adicionados, mientras que en el yogurt sin probióticos desaparece después de 24 días de incubación.

Al comparar los resultados obtenidos con un trabajo anterior realizado con la misma metodología, pero evaluando el efecto de probióticos sobre *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 (14), se encontró que la primera bacteria desaparece luego de 8 días de incubación en el sistema con probióticos adicionales, pero en el sistema sin prebióticos se necesitó de 16 días para desaparecer. Por otra parte, *E. coli* O157:H7 desapareció luego de 16 días en el sistema con probióticos adicionales y fue recuperada aún después de 28 días de incubación en el sistema sin probióticos adicionados.

La diferencia de actividad de los probióticos, específicamente de sus bacteriocinas sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, ya se ha descrito en la literatura (15,16); su efecto está dirigido principalmente hacia bacterias Gram positivas, mientras que las Gram negativas demuestran una menor sensibilidad dada la presencia de membrana externa y la constitución de su pared celular (17).

FIGURA 1

Comportamiento de *Staphylococcus aureus* en yogurt con y sin probióticos adicionados a través del tiempo (población alta)

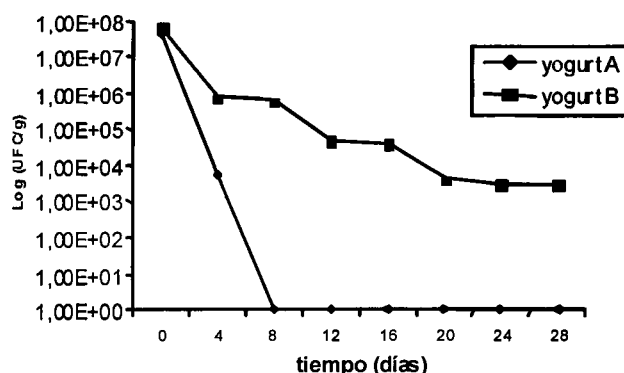
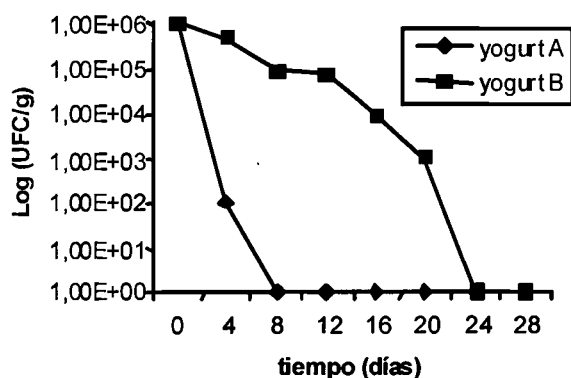


FIGURA 2

Comportamiento de *Staphylococcus aureus* en yogurt con y sin probióticos adicionados a través del tiempo (población baja)



La producción de termonucleasa por parte de *S. aureus* ha sido comúnmente asociada con su capacidad de producir enterotoxina; su mayor utilidad está dirigida a su detección en alimentos donde no se puede recobrar organismos viables luego de algún tipo de procesamiento. Cada día se describen más especies de *S. aureus* coagulasa negativas que son capaces de producir termonucleasa y por ende, enterotoxina (6). Consecuentemente, el énfasis puesto en el aislamiento de *S.*

aureus coagulasa positivo a partir de alimentos puede llevar a una sub-estimación del potencial enterotoxigénico de las cepas de *Staphylococcus* presentes (15). Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran el nulo efecto de probióticos sobre la producción de la termonucleasa ya que su presencia fue detectada cualitativamente en todos los sistemas evaluados, a pesar de la presencia de bacterias competidoras e independientemente de la concentración de *S. aureus* inoculada. También, se encontró que los probióticos no son capaces de desestabilizar esta enzima una vez que ha sido producida; su detección fue continua a través de los 28 días de incubación. Dada la estrecha vinculación entre la producción de enterotoxina y termonucleasa, estos resultados nos permiten inferir que la enterotoxina tampoco sería modificada por los probióticos evaluados.

Concluyendo, este trabajo demuestra que el yogurt adicionado con probióticos (*L. acidophilus* y *L. casei*) es capaz de suprimir la población de *S. aureus* de una manera más rápida y efectiva que el yogurt estándar que únicamente contiene *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, no obstante, no ejerce ningún efecto sobre la síntesis o estabilidad de la termonucleasa.

REFERENCIAS

- Gallardo N, Flores V & Hernández S. Estudio de la cinética de crecimiento de las bacterias del yogurt y caracterización parcial de una proteasa de *Streptococcus thermophilus*. Procesamiento y conservación de Alimentos de América Latina e Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología. 1997;2:178-193.
- Klaenhammer T. Probiotic bacteria: today and tomorrow. J Nutr. 2000;130:415S-416S.
- Anónimo. Oportunidades para los probióticos en productos lácteos. Tecnología Láctea Latinoamericana. 1999;17:60-65.
- Naidu A, Bidlack W & Clemens A. Probiotic spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1999;38(1):13-126.
- Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. Appl Environ Microbiol. 1999;65: 3763-3766.
- Dinges M, Orwin P & Schlievert P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000;13:16-34.
- Archer DI & Young F. Contemporary issues: disease with a food vector. Clin Microbiol Rev. 1988;1:377-398.
- Evenson M, Hinds M, Bernstein R & Abergdoll M. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. Int J Food Microbiol. 1988;7:311-316.
- Vanderzant C & Splittstoesser D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA. Washington DC. 1995;553-590.
- Berrocal D Arias ML, Wong E, Henderson M. Evaluación del efecto de cultivos probióticos sobre *Listeria monocytogenes* durante la producción y almacenamiento de yogurt. Arch Latinoamer Nutr 2002;52:125-129.

11. Bracket R. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Tech.* 1988;42:162-164.
12. Charlton B. Environmental survey of *Listeria* species in California milk processing plants. *J Food Prot.* 1990;53:198-201.
13. Hoover D. Bifidobacteria: activity and potential benefits. *Food Tech.* 1993;47:120-124.
14. Barrantes X, Railey D, Arias ML & Chaves C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. *Arch Latinoamer Nutr.* 2004; 54:293-297.
15. Jack R, Tagg J & Ray B. Bacteriocins of Gram positive bacteria. *Microb. Rev.* 1995;59:171-200.
16. Blackburn P, Polar J, Gusik A. & Rubing D. Nisin composition for the use as enhanced broad range bactericides. International Patent Application publication WO 89112399, 1989.
17. Kalchayananel N, Itanilin M & Ray B. Sublethal injury makes Gram negative and resistant Gram positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcTI and nisin. *Lett Appl Microbiol.* 1992;15:239-243.

Recibido:16-12-2003

Aceptado: 14-06-2004

Evaluación de la presencia de bacterias en alimentos y en el ambiente de una sección de oncología de un hospital nacional, San José, Costa Rica

Fabiola Jiménez, Laura Garro, Evelyn Rodríguez, Zenén Zeledón

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

RESUMEN. Se evaluó la calidad microbiológica de 92 muestras de la sección de Oncología de un Hospital Nacional, San José, Costa Rica durante los meses de febrero a julio, 2002. De éstas, 48 eran ensaladas, refrescos y frutas y 44 provenían de superficies, aire y manos del personal médico. Se determinó, mediante la técnica de recuento total, la presencia de coliformes totales y fecales utilizando Agar Bilis Rojo Violeta, de *Staphylococcus aureus* en Agar Baird-Parker, de *Pseudomonas* en Agar Cetrimida y de *Listeria* en Caldo Universidad de Vermont, Caldo Fraizer y posteriormente aislada en Agar Oxford. El 77% de los alimentos analizados dio positivo por al menos uno de los parámetros estudiados; las frutas presentaron la mayor contaminación (94%) y las ensaladas cocinadas la menor, no obstante se determinó en éstas la presencia de *Listeria* (13%). El 100% de las ensaladas crudas fue positivo por coliformes fecales. Se encontró *Pseudomonas* y *S. aureus* en frutas, ensaladas crudas y refrescos. Todas las superficies analizadas, con una excepción, resultaron negativas por los parámetros evaluados. El 75% de las manos del personal médico, dio positivo por al menos uno de los parámetros: 25% tenía coliformes totales (2.8×10^3 UFC por mano), 13% coliformes fecales (2.4×10^3 UFC por mano), 69% *S. aureus* (1.3×10^3 UFC por mano) y 19% *Pseudomonas* sp. Se seleccionaron al azar 115 aislamientos que se identificaron mediante pruebas miniaturizadas (API®). Al comparar esas identificaciones con los 166 aislamientos del Laboratorio Clínico del Hospital provenientes de infecciones en los pacientes de oncología, se determinó, mediante análisis de varianza, que ambas poblaciones bacterianas eran estadísticamente semejantes.

Palabras clave: Alimentos, contaminación, oncología, infección nosocomial, bacterias, ambiente.

SUMMARY. Evaluation of the presence of bacteria in food and environment of an Oncological Service of a National Hospital, San José, Costa Rica. The microbiological quality of 92 samples from the Oncological Service of a National Hospital, San José, Costa Rica was evaluated during the months of February to July, 2002. Of these samples, 48 were from salads, refreshments, and fruits and 44 from surfaces, air and hands of the medical personnel. The presence of total and fecal coliforms was determined by the total plate count technique, using Violet Red Bile Agar for the isolation of total and fecal coliforms, Baird-Parker Agar for *Staphylococcus aureus*, Cetrimide Agar for *Pseudomonas* and *Listeria* was enriched in University of Vermont Broth, Fraizer Broth and isolated in Oxford Agar. From the food samples analyzed, 77% were positive for at least one of the parameters studied; the fruits presented the greater contamination (94%) and the cooked salads the minor, even though *Listeria* was isolated in 13% of them. All tested salads (100%) were positive for fecal coliforms. *Pseudomonas* and *S. aureus* were isolated from fruits, raw salads, and refreshments. All the analyzed surfaces, with an exception, were negative for the parameters evaluated. 75% of the hands of the medical personnel were positive for at least one of the parameters evaluated; 25% had total coliforms (2.8×10^3 UFC/hand), 13% fecal coliforms (2.4×10^3 UFC/hand), 69% *S. aureus* (1.3×10^3 UFC/hand) and 19% *Pseudomonas* sp. 115 isolates were randomly selected, and identified using miniaturized tests (API®). When comparing these identifications with the 166 isolations done at the Clinical Laboratory of the Hospital from the infected patients of oncology, by means of variance analysis, it was determined that both bacterial populations were statistically similar.

Key words: Foods, contamination, oncology, nosocomial infection, bacteria, environment.

INTRODUCCION

En un paciente con cáncer se presentan una serie de condiciones que debilitan su sistema inmunológico, ya sea porque el crecimiento de la masa tumoral facilita el desarrollo de distintos procesos infecciosos, porque el tratamiento destruye células hematopoyéticas lo que produce anemia, leucopenia y trombocitopenia o por la destrucción de células epiteliales. Las bacterias de la flora normal pueden ocasionar

infecciones oportunistas y los largos períodos de hospitalización junto con la ruptura de piel por catéteres, facilitan la entrada de distintos microorganismos a sitios estériles dentro del cuerpo del paciente (1,2). Todos estos factores, sumados a la enfermedad oncológica que por sí misma es debilitante, causan en el paciente alta susceptibilidad a las infecciones intrahospitalarias, que con frecuencia son fatales.

Las infecciones nosocomiales, aquellas que se presentan en pacientes y personal de instituciones hospitalarias sin que se manifestaran o incubaran antes de la admisión (3), constituyen un problema importante para países desarrollados y en vías de desarrollo, pues afectan entre el 5% y 15% de los pacientes, se asocian a morbilidad elevada, aumentan los costos de operación de los centros de salud por empleo de antibióticos y procedimientos más costosos y prolongan la estancia hospitalaria de los enfermos infectados (4).

Debido a que la ingestión de alimentos o agua contaminada, aire, personal médico, o fomites, entre otros, pueden ser causa de infección nosocomial (3), se pretende con este estudio conocer las bacterias a las que usualmente están expuestos los pacientes del Servicio de Oncología de un Hospital clase A a través de estos mecanismos y correlacionar los hallazgos con las infecciones que padecen. De esta forma, se procura identificar algunos puntos claves para disminuir las infecciones nosocomiales en este servicio, con resultados beneficiosos para los pacientes y para el hospital.

MATERIAL Y METODOS

Se analizaron 92 muestras, 48 de las cuales fueron de alimentos (16 de frutas, 16 de refrescos y 16 de ensaladas), 12 de superficies, 16 de aire y 16 de manos del personal médico (de febrero a julio del 2002). Se siguió la metodología descrita por Vanderzant y Splittstoesser (5) y Arias y col. (6), en la que 25g muestra (fruta o ensalada) se diluyen en 225 mL de agua peptonada estéril al 0.1% para obtener una solución madre; el refresco se trabajó directamente como solución madre. A partir de estas soluciones se prepararon diluciones decimales hasta 10^{-5} y se inocularon, por duplicado, en agar Bilis Rojo Violeta (ABRV) incubadas a 35°C por 48 h para la cuantificación de coliformes totales y a 44.5°C por 24 h para la cuantificación de coliformes fecales. Se inocularon también, por duplicado 0.1mL y 0.5mL en agar Cetrimida incubados a temperatura ambiente y a 44.5°C por 48 h para la detección de *Pseudomonas* y 0.1mL y 0.5mL en agar Baird Parker incubados a 35°C por 48 h para la detección de *Staphylococcus*. De cada plato se seleccionaron colonias al azar y se identificaron con galerías bioquímicas miniaturizadas (API®) seleccionadas de acuerdo con la tinción de Gram, pruebas de catalasa y oxidasa.

Con el fin de buscar *Listeria* sp. se enriqueció, por 24 h a 35°C, 10 mL de solución madre en 90 mL de caldo University of Vermont Modified (CUVM); a partir de allí se inoculó un caldo Fraizer que se incubó a 35°C por 24 h y posteriormente un agar Oxford, incubado a 35°C hasta por 72 h. Aquellas colonias con morfología característica de *Listeria* sp. (redondas, café oscuras, con una depresión central) se confirmaron con tinción de Gram, movilidad a 25°C, luz de Henry, pruebas de oxidasa, catalasa y CAMP (5).

Para el análisis de superficies se raspó, con ayuda de

torunda estéril, un área de 50 cm² de las superficies donde se colocan las bandejas de los alimentos y las de preparación de medicamentos. La torunda se sumergió en 5 mL de agua peptonada al 0.1% para obtener la solución madre. A partir de ésta se hicieron diluciones decimales que se trabajaron como se mencionó anteriormente.

El análisis ambiental se realizó mediante la exposición a la atmósfera por 15 minutos de placas de agar sangre ubicadas en distintos sitios de las secciones de Oncología. Las placas se incubaron durante 48 h a 35°C y se contaron las unidades formadoras de colonias; se escogieron colonias al azar y se identificaron con galerías bioquímicas miniaturizadas como se citó anteriormente.

Se analizó la flora bacteriana presente en las manos del personal que trabaja en las salas de Oncología, para lo cual se les pidió que se lavaran una de sus manos en 100 mL de agua peptonada estéril al 0.1% dentro de una bolsa plástica, que se constituyó en la solución madre. A partir de ésta se hicieron diluciones hasta 10^{-5} , que se trataron igual que las de alimentos y superficies.

RESULTADOS

El 77% de los alimentos analizados dio positivo por al menos uno de los parámetros evaluados, siendo las frutas el alimento con los mayores porcentajes de contaminación (94%) y las ensaladas cocinadas con los menores porcentajes (13%).

De las 16 ensaladas muestreadas, ocho estaban constituidas por ingredientes previamente cocinados y las restantes por ingredientes crudos. Todas las muestras con ingredientes cocinados resultaron negativas (<10 UFC/g) para coliformes totales, fecales, *Pseudomonas* o *Staphylococcus aureus*, en tanto que dos muestras (25%) dieron resultados positivos por *Listeria* sp. El 100% de las ensaladas crudas fueron positivas por coliformes totales y fecales, con un promedio de 8.5×10^3 UFC/g de coliformes totales y 4.6×10^3 UFC/g de coliformes fecales. Dos de las muestras (25%) fueron positivas por *S. aureus*, (promedio de 1.5×10^2 UFC/g) y otras dos muestras (25%) fueron positivas por *Pseudomonas*. En ninguna de estas muestras se detectó la presencia de *Listeria* sp. (Tabla 1).

De las 16 muestras de refresco, 12 (75%) fueron positivas por coliformes totales y fecales con un promedio de 1.7×10^4 y 6.0×10^3 UFC/mL respectivamente. Seis muestras (38%) fueron positivas por *S. aureus* con un promedio de 1.5×10^2 , 11 (69%) por *Pseudomonas* y dos (13%) por *Listeria* sp. (Tabla 1).

Los resultados de las muestras de frutas fueron los siguientes: 15 de 16 muestras (94%) fueron positivas por coliformes totales y fecales, con un promedio de 1.7×10^4 y 1.2×10^4 UFC/g respectivamente; cuatro muestras (44%) fueron positivas por *S. aureus* y 11 (69%) por *Pseudomonas*. En ninguna de las muestras se aisló *Listeria* sp. (Tabla 1).

TABLA 1
Evaluación microbiológica de alimentos obtenidos del servicio de Oncología de un Hospital Nacional, San José, Costa Rica

Alimento	Colif. totales		Colif. fecales		S.aureus		<i>Listeria</i>	<i>Pseudomonas</i>
	% ¹	UFC/g ²	%	UFC/g	%	UFC/g		
Ensalada cocinada	0	< 10	0	< 10	0	< 10	25	0
Ensalada cruda	100	8,5x10 ³	100	4,6x10 ³	25	1,5x10 ²	0	25
Fresco	75	1,7x10 ⁴	75	6,0x10 ³	38	1,5x10 ²	13	69
Fruta	94	1,7x10 ⁴	94	1,2x10 ⁴	44	2,5x10 ²	0	69

¹ Porcentaje de muestras positivas

² Promedio de unidades formadoras de colonias por gramo de alimento

Se seleccionaron al azar 76 aislamientos provenientes de las diferentes muestras de ensaladas, frutas y refrescos para identificarlas bioquímicamente. Los géneros que se encontraron con más frecuencia fueron *Pseudomonas* (25%), *Enterobacter* (20%) y *Staphylococcus* (21%). Aunque en bajo porcentaje, fue posible identificar a *Listeria* (8%) y a *Shigella* (3%).

Todas las superficies analizadas resultaron ser negativas por coliformes, *Pseudomonas* sp. y *Listeria* sp. y solo una muestra fue positiva por *S. aureus* con 1,2x10² UFC/cm².

En el 94% de las muestras ambientales hubo crecimiento bacteriano, con un promedio de 13 UFC/15 minutos. Los géneros que se aislaron fueron *Staphylococcus* sp. (46%), *Moraxella* sp. (23%), *Sphingomonas* sp. (15%), *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (8% cada uno). Se determinó, mediante un análisis de t-Student, que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de unidades formadoras de colonias aisladas en la época seca y en la época lluviosa (p>0.05).

Al estudiar la flora bacteriana de las manos del personal de oncología, se encontró que el 75% de las manos estaba positivo por al menos uno de los parámetros evaluados; 25% con coliformes totales (promedio 2,8x10³ UFC por mano) 13% con coliformes fecales (promedio 2,4x10³ UFC por mano), 69% con *S. aureus* (promedio 1,3x10³ UFC por mano) y 19% con *Pseudomonas* sp. Se realizó la identificación bacteriana a 23 aislamientos provenientes de estas muestras, de los cuales un 35% correspondió a *Staphylococcus* coagulasa negativa, un 26% a *S. aureus*, un 17% a *Pseudomonas* y a *Enterobacter* y un 5% a *Klebsiella*.

En total, considerando todas las muestras, se identificaron 115 cepas, dentro de las cuales predominaron *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter* (Tabla 2). Mediante análisis de varianza se determinó que no hubo diferencias estadísticamente significativas (p>0.05) entre los 115 aislamientos de este estudio y los 166 aislamientos identificados por el Laboratorio Clínico del Hospital, como responsables de infecciones en los pacientes de Oncología durante el período de tiempo que duró el estudio (Tabla 2).

TABLA 2
Géneros bacterianos aislados a partir de este estudio y los que se identificaron en pacientes en las secciones de Oncología de un Hospital Nacional, en el mismo período de tiempo. San José, Costa Rica

Bacterias	Porcentaje obtenido en el estudio	Porcentaje aislado de pacientes
<i>Acinetobacter</i>	0.87%	3.01%
<i>Aeromonas</i>	0.00%	0.60%
<i>Citrobacter</i>	3.48%	3.01%
<i>Enterobacter</i>	16.52%	15.06%
<i>Escherichia</i>	2.61%	13.86%
<i>Klebsiella</i>	8.70%	4.22%
<i>Listeria</i>	5.22%	0.00%
<i>Moraxella</i>	2.61%	0.00%
<i>Morganella</i>	0.00%	3.61%
<i>Proteus</i>	0.00%	1.81%
<i>Pseudomonas</i>	20.87%	9.64%
<i>Serratia</i>	1.74%	1.20%
<i>Shigella</i>	1.74%	0.00%
<i>Sphingomonas</i>	1.74%	0.00%
<i>Staphylococcus aureus</i>	15.65%	12.65%
<i>Staphylococcus coagulasa negativa</i>	18.26%	17.47%
<i>Stenotrophomonas</i>	0.00%	1.81%
<i>Streptococcus</i>	0.00%	3.01%
Otros	0.00%	9.04%

DISCUSION

Las bacterias del grupo coliforme, así como la presencia de *S. aureus*, se utilizan como parámetros de manipulación y evaluación de la calidad microbiológica de los alimentos (7). Es preocupante que el 77% de los alimentos analizados tuviera algún grado de contaminación; aunque el número UFC de coliformes totales no superó el orden de 10⁴, la presencia de coliformes fecales en alimentos listos para consumo en cantidades de 10³ y 10⁴ UFC/g es inadmisibles (5). Esto es

especialmente cierto si se trata de enfermos inmunosuprimidos, pues si estos microorganismos indicadores se encuentran en alimentos, también se pueden encontrar patógenos de transmisión fecal-oral como *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otros (8). Esta situación se confirma con el hallazgo de *Shigella* en el 3% de las bacterias identificadas en los alimentos analizados.

Los coliformes totales, que incluyen los géneros *Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, se hallaron repetidamente dentro de este estudio. Aunque *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* aislados de alimentos no se han relacionado con patologías importantes a nivel gastrointestinal, (9,10) son indicadores de higiene inadecuada (5). Además, su presencia dentro de una sección como ésta, donde se encuentran internados pacientes inmunocomprometidos, puede ser perjudicial para estos.

En lo que respecta a *Pseudomonas*, también sugerido como un patógeno de cuidado en las infecciones nosocomiales de pacientes inmunocomprometidos (8,10), se aisló en un 25% de las ensaladas crudas, además de un 69% en los refrescos y en las frutas del estudio (Tabla 1). Esto es muy importante considerando el estado de inmunosupresión de los pacientes, pues en ellos la dosis infectante se reduce hasta en un 50% (8,9). *P. aeruginosa* fue una de las especies encontradas en los refrescos analizados y también se encuentra dentro de las especies comúnmente aisladas por el Laboratorio del Hospital (Tabla 2).

En este estudio se aislaron menos de 10 UFC/g de *S. aureus* en las ensaladas cocinadas, un valor mucho más bajo que el obtenido en los otros alimentos que se encuentran entre $1,5 \times 10^2$ y $2,5 \times 10^2$ UFC/g (Tabla 1). Esto puede deberse al proceso de cocción al que se sometieron algunos de los ingredientes, que logra disminuir la carga microbiana. Sin embargo, debe recordarse que la toxina de estas bacterias puede resistir las temperaturas de cocción, por lo que este proceso no garantiza que recuentos bajos de *S. aureus* no constituyan un riesgo para los pacientes.

Con respecto a *Listeria*, también reconocida como un agente infeccioso importante en pacientes inmunosuprimidos, relacionada con meningitis, septicemias y gastroenteritis atípica (5,9,11), se encontró en un 13% de los refrescos y en un 25% de las ensaladas cocinadas (Tabla 1); estas últimas posiblemente se contaminaron después de la cocción, pues esta bacteria no soporta las temperaturas de pasteurización, aunque sí es resistente al pH ácido, por lo que pudo sobrevivir a pesar del vinagre. Aunque *L. monocytogenes* se encuentra dentro de las especies involucradas en infecciones nosocomiales, ésta no aparece dentro de los aislamientos realizados por el Laboratorio Clínico del Hospital (Tabla 2); esto podría deberse a que no se tienen protocolos establecidos para identificar esta bacteria, ya que es un microorganismo fastidioso.

Varias de las bacterias aisladas a partir de los alimentos en este estudio, pertenecen a los géneros *Escherichia*, *Shigella*, *Staphylococcus* y *Listeria* (Tabla 2) que han sido reconocidas como agentes de infecciones nosocomiales importantes. Algunos estudios indican que las frutas y los vegetales usados en servicios de comida hospitalarios portan bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa*, *Klebsiella* y especies de *Enterobacter* (12); inclusive, estos mismos agentes infecciosos pueden afectar otros sistemas además del tracto gastrointestinal (5). Al respecto es importante señalar que fueron precisamente las frutas el alimento que presentó los mayores índices de contaminación (Tabla 1), probablemente por un lavado inadecuado y por la manipulación que conlleva el prepararlas para el consumo de los pacientes.

Se determinó que las superficies de las mesas utilizadas por los pacientes tenían menos de 10 UFC/cm² de coliformes totales y fecales, que no se aisló ni *Listeria* ni *Pseudomonas* y que únicamente se encontró *S. aureus* en un 8% de las muestras estudiadas. Esta especie, por ser Gram positiva, soporta mejor las condiciones ambientales y algunos desinfectantes (10). Este hallazgo debe considerarse de cuidado, ya que es una especie bacteriana frecuentemente relacionada con infecciones nosocomiales (5,13). Sin embargo, en términos generales, se infiere una adecuada sanitización de las superficies en el servicio de oncología.

En el aire, muchas bacterias Gram positivas se mantienen viables e infectivas en el polvo seco y pueden infectar a los pacientes de un hospital (14). En este estudio, de este grupo se encontró únicamente al género *Staphylococcus*, que como se ha señalado, es uno de los más implicados en infecciones nosocomiales (13). Cabe destacar que este género fue el que se encontró con mayor frecuencia, con un 46% de aislamientos, representando un riesgo importante en la contaminación de heridas quirúrgicas (15).

Las bacterias Gram negativas son más lábiles a las condiciones ambientales (16), por lo que se considera que las infecciones nosocomiales por esos agentes son de fácil prevención; sin embargo, es importante resaltar que todas las especies aisladas e identificadas a partir del aire (*Moraxella*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter*) se han asociado a infecciones nosocomiales (17). Cabe destacar que *Staphylococcus* coagulasa positivo y negativo, *Acinetobacter* y *Pseudomonas* se encuentran entre los géneros aislados con más frecuencia de pacientes durante el tiempo del estudio, según el Laboratorio Clínico del Hospital (Tabla 2).

Con respecto a los recuentos bacterianos en las muestras de aire, no se encontraron diferencias significativas entre las estaciones seca y lluviosa, posiblemente porque no hay diferencias marcadas en las condiciones de humedad en estos dos períodos de tiempo.

La transmisión de microorganismos a través de las manos ha sido reconocida como el más importante factor de

diseminación de brotes de infección nosocomial (15,17). Es alarmante que el 75% de las muestras provenientes de las manos del personal estuviera positivo por al menos uno de los parámetros evaluados, siendo de gran preocupación la presencia de coliformes fecales en el 13%, de *Pseudomonas* en el 19% y de *S. aureus* en el 69%. Debido a que *Pseudomonas* puede crecer en el jabón líquido que comúnmente se encuentra junto a los lavados, esto podría explicar su presencia en las manos del personal (18).

A partir de las manos se aislaron además de *Staphylococcus* y *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Varias de estas bacterias han sido implicadas en la contaminación de instrumental estéril e invasivo que tiene contacto con las manos del personal y que posteriormente se utiliza con los pacientes (19). Esto es aún más importante en pacientes con el sistema inmunológico deprimido, pues no se puede evitar que un número pequeño de bacterias que entre al torrente sanguíneo o a un compartimiento corporal estéril se multiplique.

Una higiene apropiada a la hora de lavarse las manos por parte del personal que tiene a su cargo el cuidado de los pacientes, es suficiente para minimizar brotes de infecciones dentro de los hospitales, pues lograría disminuir significativamente la carga bacteriana (15). En el lugar de estudio pudimos notar varias razones por las cuales no es posible poner en práctica adecuadas normas de higiene, entre ellas: falta de equipo de lavado y secado de manos accesible, falta de jabón, asignación de gran cantidad de pacientes a poco personal de salud, falta de campañas de educación dirigidas al personal sobre las consecuencias de malas prácticas de lavado para sus pacientes, entre otros.

En total, a partir de todos los tipos de muestras, se aislaron e identificaron 115 cepas, dentro de las cuales predominan *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (Tabla 2). La mayoría de éstas coincide con los aislamientos identificados de muestras de pacientes durante el mismo período (Tabla 2), entre los que predominan los géneros *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, lo que sugiere la existencia de una interacción entre los microorganismos que se encuentran en los alimentos y el ambiente con los que causan infecciones en los pacientes. Es importante resaltar que los aislamientos identificados coinciden con la mayoría de los patógenos que comúnmente se aíslan en pacientes granulocitopénicos (20), lo cual refuerza la importancia de tener un mejor sistema de vigilancia de los microorganismos ambientales.

REFERENCIAS

1. Crooke S & Prestayko A. Cancer and Chemotherapy volume II. USA. Academic Pres, 1981.
2. Baron E, Peterson L & Finegold S. Diagnostic Microbiology. 9 Ed. USA. Mosby, 1994.
3. Alfred S, Evans V, Philip S & Brachman P. Bacterial Infections of Humans Epidemiology and Control. 3 Ed. USA. Plenum Publishing Co., 1998.
4. Oreamuno LS. Presencia de *Listeria monocytogenes* y su relación con el nivel de coliformes fecales durante la manufacturación de queso blanco en plantas de la zona de Santa Cruz, Turrialba. Costa Rica: Universidad de Costa Rica, 1994.
5. Vanderzant C & Splittstoesser D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. APHA. Washington DC., 1995.
6. Arias M, Monge R, Antillón F & Chávez C. Microbiological contamination of enteral feeding solutions used in Costa Rican hospitals. Arch Latinoamer Nutr. 1999;49:363-366.
7. Schleich, W. Virulence characteristic of *Listeria monocytogenes*. Food Tech. 1988; 42:176-178.
8. Shooter RM., Faiebs M, Cooke A & Breader S. Isolation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella* from food in hospitals, canteens and schools. Lancet. II: 1971;390-392.
9. Mahon C & Manuselis G. Textbook of Diagnostic Microbiology. 2 Ed. USA. Sauder Editions, 2000.
10. Murray P, Baron E, Pfaller M, Tenover F & Tenover R. Manual of Clinical Microbiology. 7 Ed. ASM Press. Washington DC. 1999.
11. Farber JM & Pettekin P. *Listeria monocytogenes* a food-borne pathogen. Rev Biol Trop. 1991;55:474-511.
12. Arias ML & Antillón F. Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años. Rev Biomed. 2000;11:13-122.
13. Volkow P, De la Rosa M, Gordillo P, Vilar D, Lazo S, Aranda G & Sandoval S. Tendencias de infecciones nosocomiales intrahospitalarias en un centro oncológico, 1986-1996. Sal Púb Méx. 2002;42:181-187.
14. Mc Donal LC, Walker M, Carson L, Arduino M, Agüero SM, Gomez P, Mc Neil P & Jarvis W. Outbreaker of *Acinetobacter* spp. Bloodstream infections in nursery associated with contaminated aerosols and air conditioners. Pediatr Infect Dis. 1998;17:716-722, 1998.
15. Evans AS & Brachman P. Bacterial infections of humans. Epidemiology and Control. 3 Ed. New York. Plenum Publishing Co., 1998.
16. Prescott L, Harley J & Klein D. Microbiología. 4 Ed. España. Mc Graw Hill, 1999.
17. Anonymous. Prevention of hospital acquired infections. World Health Organization, Department of Communicable Disease, Surveillance and 2 Edit. <http://www.who.int/emc>. 2002. (consulta octubre 2003).
18. Mc Neil S, Foster C, Hedderwick S & Kauffman C. Effect of hand cleansing with antimicrobial soap or alcohol-based gel on microbial colonization of artificial fingernails worn by health care workers. Clin Inf Dis. 2001;32:367-372.
19. Schaal KP. Medical and microbiological problems arising from airborne infection in hospitals. J Hosp Infect. 1991;18:451.
20. Shulman S, Phail J & Sommer H. Infectious Disease. 4 Ed. México. Sauder. 1992.

Recibido: 16-12-2003

Aceptado: 14-06-2004

Evaluación microbiológica y fisicoquímica de bebidas pasteurizadas fortificadas con extractos de desechos desodorizados de naranja

Mario José Moreno Alvarez, Alexandra Machado, Arelis Padrón, David García y Douglas Rafael Belén Camacho

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

RESUMEN. El objetivo de esta investigación, fue la evaluación microbiológica y de algunos parámetros fisicoquímicos en bebidas pasteurizadas acondicionadas con extractos acuosos de desechos desodorizados de naranja. Las frutas utilizadas para el estudio se seleccionaron con los siguientes criterios: madurez homogénea, sin daño físico y ausencia aparente de clorofila. Las cáscaras fueron sometidas a un secado parcial y posteriormente procesadas para obtener una harina. El jugo extraído se evaluó mediante los parámetros pH = 3,90, °Brix 10, Acidez titulable 0,33 g ácido cítrico/100mL, carotenoides totales de 0,0078 mg/mL. La harina se sometió a dos métodos de desodorización: por arrastre con vapor y en autoclave a temperatura de 121°C. A las cáscaras desodorizadas, se le realizó una extracción de pigmentos usando como solvente agua, con una relación (P/V) 1:50. Posteriormente se prepararon las bebidas cítricas pasteurizadas, sustituyendo el agua de su elaboración por los extractos desodorizados por ambos métodos. Los parámetros analizados: pH, °Brix, Acidez titulable, carotenoides totales, no presentaron diferencias significativas durante las evaluaciones ($P > 0,05$). Los análisis microbiológicos, presentaron valores adecuados para productos pasteurizados. Se realizaron evaluaciones sensoriales mediante la prueba no paramétrica Friedman al 95% de confianza, utilizando un panel no entrenado, donde no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos. Se concluye que los procesos de desodorización fueron eficientes, permitiendo la incorporación de compuestos aquasolubles como flavonoides que presentan actividad antioxidante en las bebidas fortificadas.

Palabras clave: Bebidas cítricas, residuos cítricos, pasteurización, naranja.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de cítricos en Venezuela y en particular el de naranja (*Citrus sinensis* L.) ha tenido un sostenido e importante progreso, después de la década de los 70. Se estima que la producción de naranjas para el año de 2004 sea 742.204 T.M. (1). Cerca del 50% de la biomasa existente es aprovechada, y el otro 50%, constituido por cáscaras y semillas, es catalogado como desechos agroindustriales (2-4).

La utilización de un subproducto como lo es la cáscara de

SUMMARY. Microbiological and physicochemical evaluation of pasteurized beverages fortified with orange deodorized residues extracts. Microbiological and physicochemical parameters of pasteurized beverages conditioned with aqueous extracts from orange deodorized residues were evaluated. The fruits used were selected according to following criterion: homogenous maturity, without physical damage and absence of apparent chlorophyll. Orange peels were dried and transformed to flour. The juice was evaluated by means of these parameters: pH 3.90, °Brix 10, titrable acidity 0.33 g of citric acid/100 mL and total carotenoids 0.0078 mg/mL. Volatil compounds of the flour that may to cause bitterness were separated by means of two methods of deodorization: distillation in current of vapor and in autoclave to 121 °C; then, the flour was extracted with water (relation 1:50 p/v). Pasteurized citric beverages (orange juice) were elaborated adding the deodorized extracts. pH, °Brix, titrable acidity and total carotenoids showed no significant differences ($P > 0.05$). Microbiological results were according to pasteurized products. Sensorial analysis by untrained panel showed no significant differences. In conclusion, the deodorant processes were effectives and permitted the inclusion of aquasoluble compounds as flavonoids with antioxidant activity.

Key words: Citric beverages, citric residues, pasteurization, orange.

naranja representa una alternativa para el país, en la producción de las industrias químicas y en la alimentación animal (4). Las cáscaras de las frutas cítricas son ricas en aceites esenciales y flavonoides, representan una fuente de vitamina A y se ha demostrado que su consumo está ligado a la disminución de la incidencia de cáncer, por lo que son utilizadas como colorantes no tóxicos (3,5). Sin embargo, los desechos agroindustriales de naranja son ricos en metabolitos del tipo terpenoides que producen sabores indeseables a los alimentos (2). Entre las características que producen estos compuestos

se han descrito la sensación de amargor; debido a diversos glucógenos amargos, como la hesperidina que se encuentra en los desechos (6).

Padrón y Moreno-Alvarez (2) realizaron la extracción de colorantes en cáscara de naranja (*Citrus sinensis* L.) Var. Valencia por métodos no convencionales y emplearon estos extractos para fortificar color en naranjadas. Los resultados obtenidos en este estudio arrojaron que los panelistas preferían las formulaciones fortificadas por su color, sin embargo eran rechazadas por su sabor, en este estudio se efectuaron comparaciones con naranjadas sin fortificar y una comercial.

El objetivo de este estudio es la evaluación microbiológica y fisicoquímica de bebidas cítricas fortificadas con desechos desodorizados de naranja que permitan la utilización de un subproducto de bajo costo, rico en minerales y compuestos antioxidantes permitiendo el uso integral del fruto de naranja en el país

MATERIALES Y METODOS

Etapas preliminares

Se recolectó una muestra de 50 kg de frutos de naranjas (*Citrus sinensis* L.) variedad Valencia, en la finca "El Zinc" ubicada en el Municipio Canoabo, el cual se encuentra a 287 msnm., cosecha de Marzo 2002. Los criterios de muestreo para la selección fueron los establecidos por Moreno-Alvarez et al., (3) para frutos cítricos: tamaño uniforme, sin rastros aparentes de clorofila, madurez homogénea y sin daño físico. Los frutos fueron lavados mediante lavador rotatorio marca Dixie con agua corriente con la finalidad de eliminar partículas indeseables adheridas a las frutas. El pelado de los frutos se efectuó manualmente con cuchillos de acero inoxidable, para separar el pericarpio del mesocarpio, y se cortó en trozos pequeños para facilitar la molienda. Seguidamente se realizó el corte en la sección meridional de la fruta con el fin de favorecer la extracción del jugo. La extracción del jugo se efectuó mediante extractor de jugo marca Oster®. Las cáscaras fueron sometidas a un secado parcial en una estufa, marca Memmert, a 60 + 1° C por 48 h a una humedad aproximada del 5%–10%. Después del secado las cáscaras fueron sometidas a una molienda para la obtención de harina, utilizando un molino eléctrico, MLW modelo 214 según procedimiento establecido en otras investigaciones (4).

Caracterización de la materia prima

Cáscaras

Se realizaron evaluaciones de humedad (7) y grasa (8) a los desechos de naranja (*Citrus sinensis* L.) variedad Valencia. Los recuentos en placas de aerobios mesófilos y aerobios psicrófilos se efectuaron mediante norma COVENIN 902 (9). El recuento de mohos y levaduras mediante norma COVENIN 1337 (10).

Jugo

El jugo extraído y empleado en la preparación de las bebidas fue caracterizado mediante: acidez titulable, sólidos solubles (SST) medidos con un refractómetro Baush & Lomb modelo ABBE-3L y expresados en °Brix, pH fue determinado mediante potenciómetro HANNA Instruments, modelo pHep® 1. Para estas determinaciones se aplicaron metodologías de la AOAC (7). Se estableció el índice de madurez mediante la relación SST/acidez. El contenido de carotenoides se evaluó mediante curva de calibración $Y: 0,029 + 38,138 X$ a 440 nm con un espectrofotómetro marca Baush & Lomb, modelo Spectronic 20 mediante la metodología descrita por Hernández y Moreno-Alvarez (11). Se efectuaron determinaciones microbiológicas al jugo mediante análisis de aerobios mesófilos (9), aerobios psicrófilos (9), mohos y levaduras (10) coliformes totales y *Escherichia coli* (12).

Desodorización de las harinas de cáscaras de naranja

Se utilizaron dos métodos para la separación de los compuestos volátiles presentes en la cáscara de la naranja. El método I consistió en la utilización de un equipo de destilación con arrastre de vapor de agua generado de una fuente externa por un tiempo de 30 min. El método II se sometieron las muestras en autoclave vertical modelo 415, marca Fanem, en condiciones de 121°C por 15 min y 15 psia.

Elaboración de los productos

Las harinas desodorizadas se sometieron individualmente a un proceso de extracción utilizando como solvente agua, en una agitación constante, mediante agitador electrónico, marca Fisher a 600 rpm durante 1 hora con una relación de P/V 1:50. El extracto obtenido se filtró a vacío utilizando para ello papel de filtro Whatman número 1, con la finalidad de eliminar partículas coloides en suspensión. Las bebidas se acondicionaron según los requisitos establecidos en la norma COVENIN 1702 (13) para jugos de naranjas. Se elaboraron las siguientes formulaciones: Formulación I (constituida por 100% de Jugo de naranja natural), el cual se utilizó como control, sin la aplicación de ningún extracto desodorizado; Formulación II (98% de jugo de naranja + 2% de extracto de desodorizado obtenido en proceso de autoclave) y Formulación III (98% de jugo de naranja + 2% de extracto desodorizado sometido al proceso de arrastre con vapor). La escogencia de las proporciones utilizadas, estuvo sustentada en una investigación previa realizada por Padrón y Moreno-Alvarez (2). Las bebidas se pasteurizaron por batchs de 8 litros cada una, utilizando un equipo piloto marca Dove, modelo TDB/7-20 de 18 L de capacidad a una temperatura de 60 ± 0,1°C durante 30 min. Los productos finales fueron envasados en botellas de vidrio de 250 ml. Las botellas y las tapas fueron previamente esterilizadas y codificadas. Las muestras obtenidas fueron almacenadas por un tiempo de 21

días bajo condiciones de refrigeración a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ en envases traslucidos.

Caracterización físico química y microbiológica de los productos terminados

Las bebidas cítricas pasteurizadas se caracterizaron mediante los siguientes análisis: sólidos solubles ($^\circ\text{Brix}$), pH acidez titulable, carotenoides totales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras, coliforme totales, *Escherichia coli* y aerobios psicrófilos mediante los mismos métodos y equipos que la caracterización de la materia prima.

Evaluación sensorial

Se evaluaron las bebidas cítricas pasteurizadas mediante un panel no entrenado de 40 panelistas (todos estudiantes de la Escuela Técnica Agropecuaria, Carlos Sanda, municipio, Canoabo, estado Carabobo, Venezuela), mediante una encuesta, estructurada a través de los siguientes parámetros: color, olor y sabor, utilizando una escala hedónica propuesta por el CIEPE (14) durante cuatro semanas consecutivas, con la finalidad de discriminar cual de las bebidas cítricas pasteurizadas resultó con mayor aceptabilidad.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental totalmente aleatorio y los parámetros a evaluar fueron determinados por triplicado, calculando los errores estándares respectivos y utilizando para ello las siguientes hipótesis:

$$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \text{ (al menos uno es diferente)}$$

Los parámetros fisicoquímicos fueron evaluados mediante un análisis de varianza, de una cola mediante el paquete estadístico SAS (15) ($P > 0,05$). La evaluación sensorial se realizó mediante la prueba no paramétrica de Friedman al 95% de confianza utilizando el paquete estadístico SAS (15). En cuanto a los parámetros microbiológicos fueron monitoreados diariamente establecidos los contajes de acuerdo a las normas COVENIN para cada caso.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización físicoquímica y microbiológica de la materia prima

Los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de jugo de naranja se muestran en la Tabla 1. Los valores de acidez titulable (0,33 g ácido cítrico/100 mL de jugo) y de sólidos solubles (10°Brix), presentaron diferencias en comparación con resultados señalados por Moreno-Alvarez et al. (16) cuyos valores de acidez titulable

y sólidos solubles fueron 0,80 g ácido cítrico/100 mL de jugo y $12,5^\circ\text{Brix}$, respectivamente. Estas diferencias están asociadas a las características edafoclimáticas del cultivo y a la época de recolección del fruto.

TABLA 1
Caracterización fisicoquímica del jugo y cáscaras de naranja (*Citrus sinensis* L.)*

Parámetro	Jugo	Cáscara
Sólido solubles ($^\circ\text{Brix}$)	$10,0 \pm 0,2$	N
Acidez iónica (pH)	$3,90 \pm 0,10$	N
Acidez titulable (g ácido cítrico/100)	$0,33 \pm 0,01$	N
Carotenoides totales (mg/mL jugo)	$0,0078 \pm 0,0002$	$0,014 \pm 0,002$
Relación $^\circ\text{Brix}$ /Acidez	$15,15 \pm 0,06$	N
Grasa (%)	N	$3,06 \pm 0,20$
Humedad (%)	N	$56,39 \pm 0,30$

* Valores promedios de tres réplicas \pm ds

N: Valores no determinados

El valor obtenido de acidez iónica fue de 3,9 no presentó gran diferencia con respecto al resultado indicado por Moreno - Alvarez et al., (3), el cual fue de 3,5. En cuanto a los carotenoides totales cuantificados se obtuvo un valor promedio de $7,75 \times 10^{-3}$ mg/mL de jugo, siendo inferior el reportado por Padrón y Moreno-Alvarez (2) el cual fue de $8,29 \times 10^{-3}$ mg/mL de jugo. Se infiere que ésta variación es ocasionada por el índice de madurez de los frutos empleados en este estudio, ya que el mismo presentó un valor de 15,15, el cual difiere ligeramente de los obtenidos por Moreno-Alvarez et al., (3) y Padrón y Moreno-Alvarez (2), de 13,80 y 11,14 respectivamente.

Los resultados de la evaluación de la cáscara de naranja también se presentan en la Tabla 1. La humedad arrojó un valor de 5,6% siendo cercano a los resultados determinados por otros autores (3,4) que señalan un valor de 4,8%. En cuanto al porcentaje de grasa obtenido (3,06%) es superior al señalado por Moreno-Alvarez et al., (4) de 2,63%. De igual manera, este valor se encuentra en el rango establecido en la norma COVENIN (17) que indica un porcentaje mínimo de 3% en materia grasa para harinas elaboradas con residuos cítricos. El contenido de carotenoides totales (CCT) determinado fue de 0,014 mg CCT/mL siendo inferior al obtenido por Moreno-Alvarez et al., (3), quienes determinaron un límite mínimo de 0,016 mg/mL de carotenoides totales en cáscaras de naranjas.

La evaluación microbiológica del jugo y la cáscara de naranja, se encuentra sintetizada en la Tabla 2. En relación al jugo los resultados obtenidos cumplen con la norma COVENIN (18), para jugo de naranja pasteurizado. Por su parte Muller et al., (19) señala que debido a los bajos valores de pH en las frutas, la flora microbiana presente está

constituida principalmente por mohos y levaduras. Los valores obtenidos para la cáscara están dentro de los rangos permitidos por Splittstoesser (20) para verduras y hortalizas 4×10^3 a $2,8 \times 10^7$ UFC/g. La carga de estos organismos es procedente del suelo y el aire, que pueden ser incorporados por la manipulación de las frutas o insectos (19).

TABLA 2
Caracterización microbiológica de las cáscaras de naranja y del jugo de naranja

Análisis	Cáscaras	Jugo
Aerobios mesófilos UFC/mL	$4,3 \times 10^1$	$5,6 \times 10^3$
Mohos UFC/mL	$5,3 \times 10^1$	$7,3 \times 10^2$
Levaduras UFC/mL	$6,4 \times 10^1$	$3,8 \times 10^3$
Aerobios psicrófilos UFC/mL	<10	N
NMP/mL. Coliformes totales	<3	N
<i>Escherichia coli</i>	ND	N

ND: Valores no detectados

N: Evaluación no determinadas

Caracterización físicoquímica, microbiológica y sensorial de los productos

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la evaluación de pH para las diferentes bebidas cítricas pasteurizadas. No se determinaron diferencias estadísticamente significativas en relación a este parámetro durante la evaluación ($P > 0,05$). Moreno-Alvarez et al., (3) y Padrón y Moreno-Alvarez et al., (2) determinaron valores similares de pH (3,5) para jugo de naranja y 3,9 para naranjadas fortificadas respectivamente. No se determinaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en relación a los sólidos solubles lo cual indica una importante estabilidad de los productos y una nula interferencia de los tratamientos a estos parámetros. Los valores de acidez titulable expresados como g de ácido cítrico/100 mL de jugo no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$) lo cual sugiere una importante estabilidad química de los productos y un adecuado proceso de pasteurización. El valor obtenido en todos los casos fue de 0,90 g/100 mL de ácido cítrico estando este resultado dentro los estándares establecidos para naranjadas COVENIN 1702 (13). No se determinaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en relación al contenido de carotenoides totales durante los 21 días de evaluación. Lo cual sugiere que el proceso de almacenamiento y embotellado fue eficiente, permitiendo una importante estabilidad química de estos metabolitos que son fácilmente oxidados por la presencia de oxígeno, iones metálicos o radicales libres (21).

TABLA 3
Evaluación físicoquímica y de carotenoides de las bebidas pasteurizadas

Tratamientos	pH				SS				AT				CCT			
	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3	T0	T1	T2	T3
I	3,5 ^a	3,5 ^a	3,4 ^a	3,4 ^a	15,0 ^a	15,0 ^a	15,0 ^a	15,0 ^a	0,90 ^a	0,90 ^a	0,90 ^a	0,90 ^a	0,016 ^a	0,015 ^a	0,014 ^a	0,012 ^a
II	3,7 ^a	3,7 ^a	3,6 ^a	3,6 ^a	15,0 ^a	15,0 ^a	15,0 ^a	15,0 ^a	0,90 ^a	0,90 ^a	0,90 ^a	0,90 ^a	0,017 ^a	0,016 ^a	0,015 ^a	0,014 ^a
III	3,7 ^a	3,7 ^a	3,6 ^a	3,6 ^a	15,0 ^a	15,0 ^a	15,0 ^a	15,0 ^a	0,90 ^a	0,90 ^a	0,90 ^a	0,90 ^a	0,021 ^a	0,019 ^a	0,017 ^a	0,016 ^a

Valores promedios de tres réplicas

T0: Día 1; T1: Día 7; T2: Día 14; T3: Día 21

I = Jugo de naranja pasteurizada

II = Bebida cítrica desodorizada obtenida utilizando método de autoclave

III = Bebida cítrica desodorizada obtenida utilizando destilación

SS = Sólidos solubles (°Brix)

AT = Acidez titulable (g ácido cítrico/100 mL de jugo)

CCT = Carotenoides totales (mg/mL)

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

La cantidad de carotenoides totales en la bebida II fue menor comparada con la bebida III, durante el tiempo de evaluación, pudiéndose observar en el mismo cuadro. Se infiere, que el proceso de destilación por arrastre con vapor fue más eficiente, debido a que este método se realizó a presiones reducidas para disminuir el punto de ebullición. Baduí, (6) afirman que uno de los factores que contribuye a la destrucción de los carotenoides son las altas temperaturas.

Los análisis microbiológicos realizados a las bebidas cítricas pasteurizadas se presentan en las Tablas 4, 5 y 6. Todos los tratamientos evaluados cumplieron con la norma COVENIN 1702 (13) para naranjadas pasteurizadas. La cual establece valores máximos de 200 UFC/mL de aerobios mesófilos para el primer día de pasteurización. En relación a los aerobios psicrófilos en todos los casos presentaron valores menores de 10 UFC/mL a lo largo de las evaluaciones, cumpliendo con los requisitos propuestos por la norma COVENIN 1699 (18). Los coliformes totales estuvieron dentro de los rangos óptimos de bebidas pasteurizadas tipo naranjadas y en ningún caso se logró detectar la presencia de *Escherichia coli*, evidenciando que el proceso de pasteurización fue eficiente. En cuanto a los mohos y levaduras, arrojaron valores dentro de los rangos permitidos por COVENIN 1337 (10).

TABLA 4
Evaluación microbiológica de la formulación I

Microorganismo	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
Aerobios mesófilos UFC/mL	<10	<10	<10	55
Aerobios psicrófilos UFC/mL	<10	<10	<10	<10
Mohos UFC/mL	<10	<10	<10	<10
Levaduras UFC/mL	<10	<10	<10	<10
NMP/mL coliformes totales	<3	<3	<3	<3
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	ND

ND: Valores no detectados

TABLA 5
Evaluación microbiológica de la formulación II

Microorganismo	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
Aerobios mesófilos UFC/mL	<10	<10	<10	60
Aerobios psicrófilos UFC/mL	<10	<10	<10	<10
Mohos UFC/mL	<10	<10	<10	<10
Levaduras UFC/mL	<10	<10	<10	<10
NMP/mL coliformes totales	<3	<3	<3	<3
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	ND

ND: Valores no detectados

TABLA 6
Evaluación microbiológica de la formulación III

Microorganismo	Día 1	Día 7	Día 14	Día 21
Aerobios mesófilos UFC/mL	<10	<10	<10	48
Aerobios psicrófilos UFC/mL	<10	<10	<10	<10
Mohos UFC/mL	<10	<10	<10	<10
Levaduras UFC/mL	<10	<10	<10	<10
NMP/mL coliformes totales	<3	<3	<3	<3
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	ND

ND: Valores no detectados

La Tabla 7 presenta los resultados de la evaluación de los parámetros sensoriales, a través del método no paramétrico de Friedman. En dicha tabla se establecen los valores del estadístico de Friedman (F) y el valor de la probabilidad (P) utilizando los la aproximación de χ^2 para los diferentes atributos evaluados. En esta prueba no se detectaron diferencias significativas con respecto a las variables (color, olor y sabor). Lo que indica que las pruebas no fueron instrumento de juicio para evaluar la preferencia de los consumidores. Sin embargo se infiere, de acuerdo a los resultados obtenidos (valores de ranqueo), que la bebida II resultó con mayor aceptación con respecto al sabor.

TABLA 7
Resultados de la Prueba de Friedman en la evaluación sensorial

Variable	Día 1		Día 7		Día 14		Día 21	
	F	P>F	F	P>F	F	P>F	F	P>F
Color	0,01	0,99	4,76	0,10	0,95	0,70	4,06	0,10
	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Aroma	2,71	0,30	0,94	0,70	3,35	0,70	0,46	0,80
	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Sabor	1,21	0,70	2,41	0,30	0,95	0,70	1,46	0,50
	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

F: Estadístico de Friedman

P: Valor de la probabilidad utilizando la aproximación de χ^2

NS: No significativo al 95% de confianza

Cabe destacar que esta prueba sensorial demuestra que los métodos aplicados para la desodorización de las cáscaras fueron efectivos ya que el panel no percibió el sabor amargo característico de los terpenos coincidiendo con lo expuesto por Baduí (6) quien sostiene, que los terpenoides distribuidos en el flavedo y el mesocarpio contribuyen al amargor y el aroma de los cítricos. Por su parte Arthey (22), coincide en que a los productos cítricos, se les puede eliminar el sabor amargo reduciendo el contenido de los terpenos por medio

de una desodorización con el propósito de no dañar otros componentes como los flavonoides que presentan una importante actividad antioxidante dentro de la célula.

CONCLUSIONES

La materia prima utilizada (cáscara y jugo de naranja) se encontraba entre los rasgos permitidos de acuerdo a sus características fisicoquímicas y microbiológicas, siendo apta para la elaboración de las bebidas. Los resultados obtenidos de los análisis a la materia prima presentaron similitudes a otras investigaciones realizadas, lo que permitió adecuadas comparaciones. Los métodos de desodorización cumplieron con su finalidad de eliminar los terpenos presentes en el albedo de las cáscaras ya que aumentaron la aceptabilidad en relación al sabor. Las evaluaciones fisicoquímicas y microbiológicas realizadas a las bebidas durante el tiempo, no presentaron modificaciones considerables, evidenciando un proceso de pasteurización eficiente. La bebida cítrica que se elaboró con el extracto desodorizado por destilación, presentó mayor concentración de carotenoides totales (0,021 mg/mL) que la obtenida con extractos por el método de autoclave (0,017 mg/mL). En la evaluación sensorial se comprobó que no existen diferencias significativas entre los atributos olor, color y sabor, del mismo modo se determinó que existía mayor aceptación entre los panelistas por la bebida II. Se concluye que los desechos desodorizados de naranja presentan una alternativa en la fortificación de bebidas cítricas, de una adecuada calidad microbiológica, permitiendo la incorporación de metabolitos como flavonoides que presentan importante actividad antioxidante dentro de la célula.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Proyecto UNESR-FONACIT Pem-2001002271.

REFERENCIAS

- Moreno-Alvarez, MJ. Algunas experiencias en la utilización de cáscaras de naranja *Citrus sinensis* L. variedad Valencia [Trabajo de ascenso para optar la categoría de Profesor Titular]. Canoabo: Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez.:2003.
- Padrón C, Moreno-Alvarez MJ. Extracción de colorantes en cáscara de naranja (*Citrus sinensis* L.) Var. Valencia por métodos no convencionales y su utilización para fortificar color en naranjadas. Rev Unell Cien Tecn. 1999; 17:125-140.
- Moreno-Alvarez MJ, Gómez C, Mendoza J, Belén D. Carotenoides en cáscara de naranja (*Citrus sinensis* L.) Var. Valencia. Rev Unell Cien Tecn. 1999; 17:92-99.
- Moreno-Alvarez M, Hernández J, Rovero R, Tablante A, Rangel L. Alimentación de tilapias con raciones parciales de cáscaras de naranja. Ciec Tecn Aliment. 2000; 3:29-33.
- Martínez B, Periago M, Ros T. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch Latinoamer Nutr. 2000; 50:5-17.
- Baduí S, Química de los Alimentos. Mexico: Longman; 1997.
- AOAC. Official Methods of Analysis. Ass. Agric. Chem. 15 th . Washington, D.C.1990.1298 p.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 1162. Alimento para Animales. Determinación de Grasa Cruda.1979: 8p.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 902. Método para el recuento de microorganismos aeróbicos en placa de petri. 1978: 5 p.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1337. Método para el recuento de hongos y levaduras. 1978: 6 p.
- Hernández G, Moreno-Alvarez MJ. Efecto del Secado y del Acido Cítrico sobre la Cuantificación de los Carotenoides en *Cyphomandra betacea* Sendt. Cien Tecn Alimen. (España). 2000; 2 (5) 228-233.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1104. Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y *Escherichia coli*. 1984: 21 p.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 1702. Bebida a base de naranja. 1981: 6 p.
- Fundación Centro de Investigación del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (CIEPE). Evaluación Sensorial de los Alimentos. Serie Manuales No. 2, Segunda edición, CIEPE, San Felipe.1984.
- SAS. SAS User's Guide: Statistics. Cary, N.C.: SAS Institute. 1990.
- Moreno-Alvarez, MJ, Rodríguez G, Aponte H, Belén D. Cambios fisicoquímicos en dos aguardientes dulces aromatizados con cáscaras de mandarina y naranja. Rev. Fac. Agro. (LUZ) 2004; 21 (1): en prensa
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1605 Alimentos para animales. Pulpa cítrica. 1980: 4 p.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) Norma Venezolana COVENIN: 1699 Jugos de naranja pasteurizados requisitos. 1981:7 p.
- Muller G, Lietz P, Munch H. Microbiología de los alimentos Vegetales. Zaragoza, España: Acribia; 1981.
- Splitstoeser D. Predominant microorganism raw plant foods. J Milk Food Techn. 1970; 33: 500-505.
- Moreno-Alvarez MJ, Torrez V, Belén DR. Degradación cinética de carotenoides obtenidos de frutos de lechosa *Carica papaya* L Rev Fac Agron. (LUZ) 2003; 20(2):232-237.
- Arthey D. Procesados de frutas. Zaragoza, España: Acribia; 1997.

Recibido:25-02-2004

Aceptado:05-08-2004

Desarrollo de un producto de panificación apto para el adulto mayor a base de harina de trigo y harina de arroz

María José Reyes Aguilar¹, Patricia de Palomo¹, Ricardo Bressani²

Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos, Universidad del Valle de Guatemala ¹,
Centro de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala ²

RESUMEN. Como un aporte a la nutrición / alimentación de la creciente población de adultos mayores en Guatemala, se desarrolló el presente trabajo cuyo objetivo fue evaluar la calidad química, nutritiva y sensorial de pan preparado de la sustitución parcial de harina de trigo por harina de arroz. Se evaluaron sustituciones de 15, 20, 30, 40, 50 y 60 % de harina de trigo por harina de arroz. Se encontraron diferencias con el pan control (100% harina de trigo) en el proceso de preparación, en la textura, volumen, altura, peso y volumen específico. Se notaron efectos importantes en el manejo de las masas en particular con los de 40, 50 y 60% de harina de arroz. Así mismo, a mayor nivel de arroz se encontró una textura harinosa. La calidad de la proteína del pan aumentó con el nivel de sustitución, sin embargo la diferencia en calidad proteínica entre el pan de trigo y el de 60% de arroz no alcanzó significancia estadística. En base a un análisis estadístico de las características físicas se seleccionó el pan con 30 y 40% de harina arroz y a través de una prueba de preferencia se seleccionó el pan con 30% de harina de arroz como el más adecuado para los fines del estudio. Este pan no fue diferente al pan de trigo en varios parámetros nutricionales y en algunos fue superior. Cada porción de pan tiene un peso de 80 gramos (2 rebanadas) que aporta cantidades adecuadas de calorías, proteína y sodio aunque un poco menos en fibra dietética que el pan de 100% trigo.

Palabras clave: Adultos, pan de trigo/arroz, características físicas, químicas, sensoriales, sustitución parcial de harinas.

SUMMARY. Development of bakery products for greater adult consumption based on wheat and rice flour. The present investigation was developed as a contribution to Guatemalan's elderly food and nutrition. Its main objective was to evaluate the chemical, nutritional and sensory quality of bread prepared from the partial substitution of wheat flour with rice flour. Wheat flour substitutions with rice flour in the order of 15, 20, 30, 40, 50 and 60 % were evaluated. Differences with the control (100% wheat bread) were found during the process of preparation, as well as texture, volume, height, weight and specific volume. Important effects in dough handling were noted specifically in the 40, 50 and 60% rice bread. Thus, a sandy texture was found in breads of higher rice levels. The bread protein quality increased with the level of substitution; however the protein quality difference between the wheat bread and the bread with 60% rice flour did not achieve statistical significance. Based on a statistical analysis of the physical properties the bread with 30 and 40% rice flour was selected, and through a preference test between these last two, the 30% rice flour bread was selected as the sample best suited to the present study's purposes. This bread was not different to wheat bread in many nutritional parameters, although in others it showed to be superior. Each serving size of bread has a weight of 80 grams (2 slices) that contributes adequate quantity of calories, protein and sodium, although a little less dietary fiber than 100% wheat bread.

Key words: Elder people, wheat / rice bread, physical, chemical and sensory properties, partial flour substitution.

INTRODUCCION

Los datos de población de América Latina (1) indican que en todos los países ha habido un aumento continuo en el número total de personas con un aumento en la población de 65 años y más que fluctúan entre 3% al 13%. Para el año 2020 más de 1000 millones de personas de 60 años y más vivirán en el mundo y alrededor de 700 millones en los países en desarrollo.

En Guatemala, las proyecciones para el año 2002 basadas en el censo de 1994, estimaron que habría 317,510 adultos mayores y en el año 2005 serían 467,364 (2,3). Este grupo creciente de la población merece un rol participativo dentro de la sociedad y una forma de lograrlo es tener ancianos sanos y bien alimentados.

Se sabe que los problemas de salud de los adultos mayores, se encuentran asociados a los procesos de cambios fisiológicos que experimenta el organismo y cuyas expresiones latentes son lentitud de reacciones, modificaciones en las funciones motoras y de los sentidos, pérdida de la energía y disminución de las defensas frente a las enfermedades. Estos cambios hacen que las personas mayores sean más vulnerables al medio y que tengan una mayor propensión a las enfermedades y accidentes, con consecuencias físicas, psicológicas y sociales. Todos estos cambios influyen sobre la calidad de vida de los ancianos y pueden afectar también su estado nutricional (4).

Las áreas que están relacionadas a nutrición son la boca y su condición para masticar; así mismo, está la percepción sensorial que por lo general se pierde con la dificultad de recono-

cer el color, olor, aroma y sabor del alimento. Además están los problemas que resultan por mal funcionamiento del aparato digestivo en lo que es la movilidad del esófago, en la menor movilidad gastrointestinal y vaciamiento gástrico disminuido. Existe también una reducción en la secreción de ácido clorhídrico. Otros factores son el sistema muscular y del esqueleto que interfieren con funcionalidad, aumento en deposición de grasa y menor densidad ósea. Finalmente están los problemas mentales y habilidades cognitivas que pueden interferir en el estado nutricional del individuo (4).

Los ancianos necesitan alimentos de valor nutritivo concentrado y prefieren alimentos fáciles de preparar y comer. Les gustan los productos de panadería, especialmente de buen sabor, ya que son los más accesibles, no requieren de mayor preparación y son fáciles de comer. Los requerimientos de proteína son relativamente altos entre 0.8 - 1.0 g/kg de peso, y preferiblemente proteína de alta calidad. Los de fibra se recomiendan entre 20 - 35 g/día y de carbohidratos alrededor del 50% - 55% de las calorías totales. Otro nutriente importante es la ingestión de sodio que debe ser reducida (250 a 2000 mg diarios), con ingestión adecuada de vitaminas, minerales y de agua (5,6). El desarrollo de alimentos para la población de la tercera edad se ha venido ejecutando en el tiempo. Morales de León y col. (8) desarrollaron y evaluaron una pasta para sopa a base amaranto, trigo y frijol que resultó ser apropiada para la alimentación de personas adultas. Otros estudios corresponden a pan fortificado (9), alimentos de repostería (10,11), pastas enriquecidas (12) y alimentos de humedad intermedia (13,14).

Como un aporte a la nutrición/alimentación del adulto, se decidió desarrollar un pan con sustitución parcial de la harina de trigo con harina de arroz. Se evaluaron diferentes proporciones de sustitución de harina de trigo por la de arroz para encontrar la óptima en la elaboración del pan. Así mismo, se considero de vital importancia la determinación del grado de aceptación del producto fabricado. Se realizaron pruebas físicas y sensoriales con el objeto de seleccionar el producto con mejores preferencias, tomando en cuenta sus dimensiones así como su apariencia, sabor y textura; propiedades determinantes para la aceptación del producto por la población de la tercera edad, a quien es orientado el producto. Finalmente los panes de los diversos mercados de harina de trigo y de arroz fueron evaluados por su calidad proteínica.

MATERIALES Y METODOS

Materia prima

Para la elaboración del pan se utilizó harina de trigo duro enriquecida con tiamina, riboflavina, niacina y hierro, adquirida en el mercado. El arroz fue de una marca comercial que fue molido a 80 mesh en un molino de martillos. Además, se utilizó levadura de panadería (5%), sal (2%), aceite (2%) y agua (la cantidad necesaria).

Metodología

Formulación del producto

Se elaboraron muestras de pan blanco con las composiciones porcentuales de harina de trigo: harina de arroz siguientes: 100:0, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 y 40:60.

Panificación

Se elaboraron las muestras siguiendo los pasos esenciales que se siguen en la fabricación de pan blanco por método de masa directa (15), que consiste en el pesado de los ingredientes y seguido del mezclado manual como se describe a continuación.

Se disolvió la levadura en agua tibia con azúcar hasta obtener una pasta espesa que se dejó reposar a una temperatura de 35°C durante 10 minutos. Luego se colocó sobre la mesa la mezcla de las harinas formando una corona. En el centro se distribuyó la sal, la grasa y la levadura disuelta. Se trabajó con las manos de manera que se integraran los ingredientes. Luego se procedió al amasado por 20 minutos hasta formar una masa lisa, la cual se dejó reposar para su maduración aproximadamente por una hora a 35°C hasta que aumentó el doble de su volumen.

La masa, se volvió a trabajar con las manos durante 10 minutos para quitar el aire. Luego se distribuyó en moldes rectangulares para pan, engrasados y enharinados, dejándolos reposar nuevamente por 10 minutos. El pan permaneció en el horno de 20 a 25 minutos a una temperatura de 227 - 246°C (hasta que la masa estaba dorada y cocida). Al salir del horno, el pan se sacó de los moldes (18x8x5cm) y se dejó enfriar antes de empacarlo.

Análisis físicos

Se realizó una evaluación de las características físicas del pan control y de los sustituidos por harina de arroz, midiendo con una regla graduada las dimensiones de altura, ancho y largo de las hogazas, y con una balanza su peso. Los datos de dichas mediciones, consideradas como las más importantes en un pan a base de harinas compuestas, fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza.

Se determinó la firmeza o dureza del pan usando el método estándar de la AACC 74-09 utilizando el texturómetro TA-XT2 marca Stable Micro Systems (16).

Análisis químico

Se realizó un análisis proximal tanto de las harinas de arroz y trigo, así como de las muestras de pan 100% trigo y las que fueron seleccionadas por la prueba sensorial de preferencia, cuantificando con los siguientes métodos de la AOAC (17):

- Humedad, Método No. 14.004, horno de aire
- Cenizas, Método No. 14.006, método directo
- Grasa, Método No. 14.018, extracto etéreo

- d. Proteína, Método No. 14.026, Kjeldahl
- e. Fibra dietética, Método No. 45.4.07
- f. Carbohidratos por diferencia
- g. Calorías por calorimetría, usando el equipo marca Parr No. 1901
- h. Sodio por fotometría de llama

Los panes de trigo y trigo/arroz se analizaron también por:

- a. Lisina disponible, Método de Hurrell y col (18)
- b. Contenido de amilosa, Método de Juliano (19)
- c. Digestibilidad de la proteína in vitro, Método de Mertz y col (20)

Los análisis fueron hechos en triplicado para cada muestra.

Evaluación sensorial

Las formulaciones que no fueron significativamente diferentes de acuerdo al análisis de varianza fueron evaluadas con un panel de treinta personas de la tercera edad con un rango de edad entre 65 y 78 años y de ambos sexos. Era importante que las personas que evaluaran este producto fueran mayores de 65 años pues hacia ellas está dirigido el producto específicamente. Para este ensayo se utilizó el test discriminatorio pareado de preferencia. En ésta prueba los panelistas seleccionaron entre las muestras, indicando si preferían una muestra sobre otra. El uso de la opción de «no prefiero ninguna» o «las dos me desagradan igual» no se utilizó ya que reduciría el poder estadístico de la prueba pues se haría necesaria una mayor diferencia en las preferencias para poder obtener significancia estadística.

Las muestras (A) y (B) se presentaron en recipientes idénticos codificados con números aleatorios de 3 dígitos, en dos posibles órdenes de presentación: A y B ó B y A. Las muestras se presentaron en ambos órdenes el mismo número de veces.

El pan blanco preferido según la prueba de preferencia realizada se evaluó por medio de una prueba hedónica (21). En ésta prueba se le pidió al mismo panel que aplicó el test de preferencia que evaluara la aceptabilidad del pan que resultó seleccionado. En éste ensayo se le pidió al panel que luego de su primera impresión respondiera cuánto le gustó o disgustó el producto, de acuerdo a la escala verbal - numérica presentada en la boleta de evaluación. Para esta prueba se utilizó una escala hedónica de 5 puntos, en la cual cada panelista eligió entre las siguientes opciones:

- Me gusta mucho
- Me gusta
- No me gusta ni me disgusta
- Me disgusta
- Me disgusta mucho

Cada panelista recibió una muestra codificada del producto junto con la hoja de respuestas. A cada uno de los incisos (me gusta, no me gusta, etc.) que describen cada característica (sabor, textura, etc.) se le asignó un valor en escala de peor a mejor (0 para la peor y 4 para la mejor). La suma de todos los valores, de todos los incisos divididos en el número total de personas entrevistadas, nos dió la cantidad que mejor describe cada cualidad.

Los panes para los paneles sensoriales fueron almacenados en bolsas de plástico durante una noche a temperatura ambiente. La hogaza de pan fue cortada en rebanadas de 1 cm de grosor. Para prevenir que se secaran las muestras fueron cubiertas con un material plástico antes de servir las.

Con ésta prueba se midió agrado o desagradó del pan blanco desarrollado en la población de la tercera edad.

Evaluación biológica

Muestras de panes de todas las formulaciones se rebanaron y se pusieron a secar a una temperatura no mayor de 60°C. Luego se molieron. Esto se repitió dos veces. Las harinas resultantes se analizaron por humedad y proteína como ya fuera indicado.

Las harinas se incorporaron en la siguiente dieta basal: harina de pan 90%, minerales 4% AIN 93M (22), aceite vegetal 5%, vitaminas 1% AIN 76A (22). Además de estas dietas experimentales se preparó una dieta de caseína para dar 10% de proteína y una dieta aptoteica para ser utilizada en el método de NPR. Se utilizaron 72 ratas (36 hembras y 36 machos) de 22 - 24 días de edad y se distribuyeron por peso entre 9 grupos, con 8 ratas/grupo. La alimentación fue ad libitum por un período de 21 días. Las ratas disponían de agua todo el tiempo y la T° del laboratorio se mantuvo a 25°C con 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Se pesaron cada 7 días.

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis químico proximal de ingredientes

La Tabla 1 resume los datos de composición química de las harinas utilizadas en el estudio.

TABLA 1
Composición química proximal (%) de la materia prima
(base natural)

Componente	Harina de trigo	Harina de arroz
Carbohidratos	77.32 ± 0.26	85.96 ± 0.39
Proteína	10.62 ± 0.06	5.91 ± 0.58
Grasa	1.38 ± 0.11	0.65 ± 0.05
Humedad	10.09 ± 0.20	7.63 ± 0.56
Cenizas	0.59 ± 0.02	0.36 ± 0.03
Energía cal/100 g	362	373

Como se puede observar, la harina de trigo es superior a la harina de arroz en su contenido de proteína, grasa y cenizas, mientras que la harina de arroz contenía cantidades similares de carbohidratos y energía en base seca. Los valores son similares a los indicados en las Tablas de Composición de Alimentos (23).

Análisis físico del pan

Se inició el presente trabajo con un diseño experimental en el que la variable independiente para el desarrollo del producto final fue el nivel de sustitución de harina de trigo por harina de arroz en porcentajes de 0, 15, 20, 30, 40, 50 y 60% por peso.

En la evaluación de la preparación del pan vale la pena indicar que hubo diferencias muy notables en el manejo de las masas, principalmente las de los panes hechos con mayor sustitución de harina de trigo (40, 50 y 60% de sustitución).

Estas diferencias fueron básicamente: la textura de la masa, un tanto arenosa, así como una notable absorción del agua de dichas formulaciones que dieron como resultado masas pegajosas y un poco difíciles de manejar. Esto se pudo evitar en buena medida al realizar la mezcla de ingredientes con un 90% de la mezcla de harinas y luego en la fase de amasado se agregó el 10% restante en la mesa de trabajo y a las manos para evitar lo pegajoso. Con los panes hechos con sustitución de 15, 20 y 30% casi no hubo problemas de este tipo por la menor cantidad de harina de arroz añadida a la harina de trigo.

En el análisis físico cada uno de los 18 panes resultantes (6 niveles x 3 repeticiones) fueron evaluados por su volumen, textura y apariencia en general y luego comparados contra un pan control de 100% de trigo (ver Figura 1 y Tabla 2).

FIGURA 1
Efectos de la sustitución de la harina de trigo por harina de arroz a diferentes porcentajes

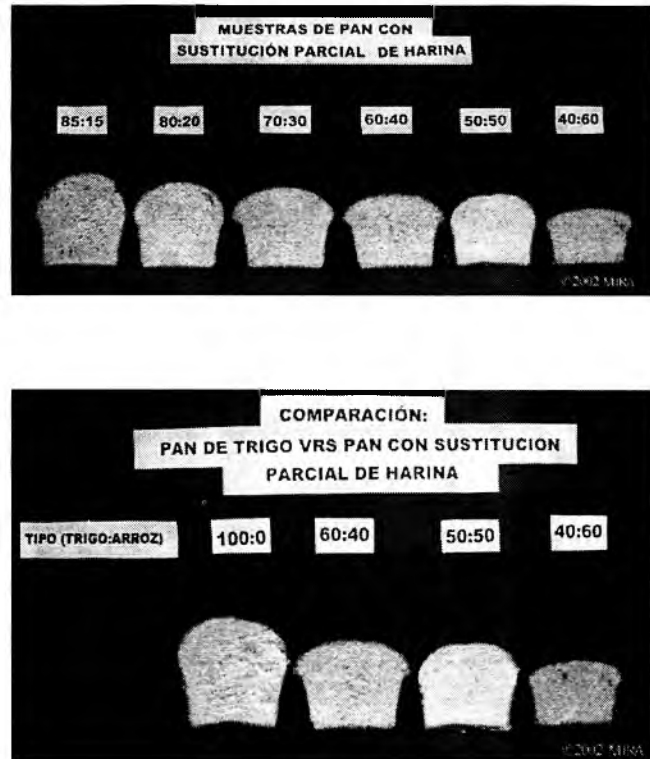


TABLA 2

Dimensiones de los panes con diferentes porcentajes de sustitución de harina de trigo por harina de arroz

% Sustitución		Altura (cm)	Volumen (cm ³)	Volumen específico (cm ³ /g)	Peso (g)
Trigo	Arroz				
100	0	9.23 ± 1.17	1126.84 ± 94.58	2.46 ± 0.19	458.3 ± 10.4
85	15	8.95 ± 0.37	1110.15 ± 63.28	2.43 ± 0.16	458.7 ± 8.5
80	20	8.60 ± 0.18	1053.30 ± 11.76	2.33 ± 0.02	451.0 ± 2.9
70	30	8.63 ± 0.39	1079.42 ± 58.31	2.33 ± 0.10	467.5 ± 10.4
60	40	7.65 ± 0.97	916.39 ± 139.65	1.89 ± 0.27	461.2 ± 13.8
50	50	7.45 ± 0.13	914.10 ± 19.10	2.01 ± 0.04	455.0 ± 4.1
40	60	5.93 ± 0.67	702.30 ± 89.54	1.58 ± 0.20	445.0 ± 5.0

La evaluación visual de los panes con sustitución de más de 50% de harina detectó un menor tamaño de poros y hogazas más compactas. El pan con 60% de sustitución produjo hogazas con casi el mismo tamaño que la masa original que se colocó en el molde, lo que indica que no se produjo una retención de gas durante la maduración. Por lo que se puede afirmar que a mayor porcentaje de sustitución de harina se obtiene un menor tamaño de hogaza de pan.

Con respecto a la evaluación de las características físicas del pan, las medidas de ancho y largo de los diferentes tratamientos de sustitución permanecieron más o menos constantes, se presentan en la Figura 2a y 2b.

Por otra parte las medidas de altura, volumen y peso que se resumen en la Tabla 2 presentaron mayor diferencia entre sí, notándose un decremento en magnitud de las mismas al aumentar el porcentaje de sustitución de harina de trigo por harina de arroz.

FIGURA 2a

Comparación de promedios de las mediciones de alto, ancho y largo de las formulaciones

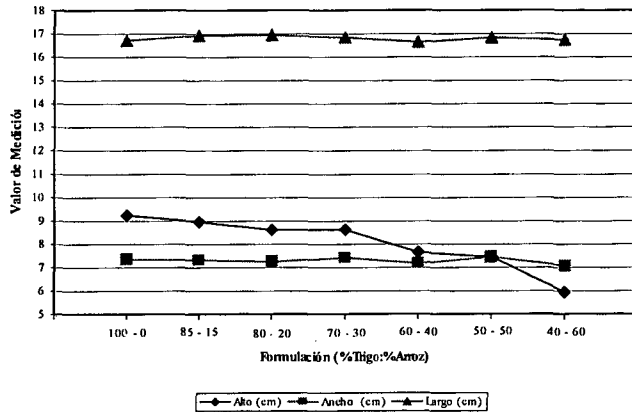
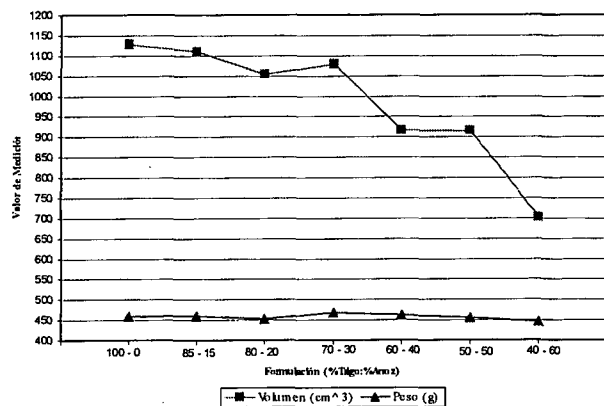


FIGURA 2b

Comparación entre las mediciones de volumen y peso de las formulaciones



Los anteriores resultados fueron analizados estadísticamente con la prueba de análisis de varianza para determinar si había diferencia significativa entre las muestras como se muestra a continuación.

TABLA 3

Análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$) entre los panes con diferentes porcentajes de sustitución de harina respecto al control (100% trigo)

Dimensión	F experimental	F crítica	Resultado
Altura	10.06	> 2.85	Si hay diferencia significativa
Volumen	12.98	> 2.85	Si hay diferencia significativa
Peso	4.14	> 2.85	Si hay diferencia significativa

En la Tabla 3 se puede observar que sí hubo diferencias significativas en todas las características entre los panes con harina de arroz y el pan control. Por consiguiente el pan control es significativamente diferente a los panes con sustitución de harina de trigo con harina de arroz.

Esta diferencia significativa fue debida a que durante la fabricación de las masas, la sustitución de harina de trigo por harina de arroz redujo la cohesividad y la propiedad de retener el dióxido de carbono producido durante la fermentación dando como resultados panes más compactos.

TABLA 4

Análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$) entre los panes con diferentes porcentajes de sustitución de harina

Dimensión	F experimental	F crítica	Resultado
Altura	15.77	> 3.11	Si hay diferencia significativa
Volumen	14.74	> 3.11	Si hay diferencia significativa
Peso	5.66	> 3.11	Si hay diferencia significativa

El análisis de varianza de las mediciones físicas entre los panes con sustitución parcial de arroz que se presenta en la tabla 4, demostró que si existe una diferencia significativa en cuanto a las tres variables medidas entre los panes con sustitución de harina de trigo con harina de arroz.

De estos resultados se hizo necesario realizar un análisis de varianza por factor para cada pan a manera de compararlos entre si, encontrándose lo siguiente:

- Las formulaciones con 15, 20, 30 y 40% de sustitución de harina de trigo por harina de arroz presentan diferencia significativa sobre el resto de muestras pero no entre si.
- La formulación con 50% de sustitución no difiere significativamente de la formulación con 60% de sustitución, pero si del resto de las muestras en cuanto a sus dimensiones de altura y volumen.
- La formulación con 60% de sustitución difiere significativamente de todas las muestras.

A partir de éstos resultados y de la evaluación visual de las muestras se descartaron las formulaciones con 60 y 50%. También fueron descartadas las formulaciones con 15 y 20% de sustitución puesto que para los fines del trabajo se consideró que no era una sustitución significativa.

Evaluación sensorial

Con las dos formulaciones restantes (30% y 40% de sustitución), se procedió a realizar una evaluación sensorial para detectar la preferencia de los panelistas entre las dos muestras. El total de preferencias obtenidas que fue 22 de 30 se analizó por tablas de distribución binomial del mínimo de juicios para establecer preferencias significativas.

Se determinó que existe una preferencia con un nivel de

5% de significancia entre los resultados obtenidos para la formulación con 30% de sustitución de harina de trigo con harina de arroz. En otras palabras, el panel señaló como producto preferido el elaborado con un 30% de sustitución de harina, con un nivel de significancia del 5%. Estos resultados nos permiten afirmar con certeza que la muestra con 30% de sus-

titución es la preferida, y que solamente 5 de cada 100 preferencias por dicha formulación podría deberse al azar.

La aceptabilidad de la formulación preferida se determinó por el mismo panel sensorial de personas de la tercera edad por medio de una escala hedónica de 5 puntos. Los resultados de la evaluación se presentan en la Tabla 5.

TABLA 5
Prueba hedónica de 5 puntos para la muestra con 30% de harina de arroz

Característica	Apariencia			Sabor			Textura			Aceptabilidad general		
	# Personas	Valor	Total	# Personas	Valor	Total	# Personas	Valor	Total	# Personas	Valor	Total
Me gusta mucho	7	4	28	8	4	32	7	4	28	7	4	28
Me gusta	19	3	57	16	3	48	20	3	60	17	3	51
No me gusta ni me disgusta	4	2	8	3	2	6	3	2	6	6	2	12
Me disgusta	0	1	0	3	1	3	0	1	0	0	1	0
Me disgusta mucho	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			93			89			94			91
Me gusta	3.10 ± 0.22			2.97 ± 0.25			3.13 ± 0.21			3.03 ± 0.24		

Los resultados de la evaluación sensorial indican que la muestra de pan con sustitución parcial de harina de trigo con un 30% de harina de arroz fue calificada en cuanto a su sabor, textura, color y apariencia general como «Me gusta» por la población de la tercera edad. El análisis estadístico de la evaluación sensorial nos confirma con un 95% de confianza que las características calificadas si tienen el valor encontrado con un error menor a 0.25. Esto nos indica que el valor encontrado es ese ± 0.25.

En algunas observaciones anotadas por los encuestadores se encontró un comentario en común, el cual era que el pan era fácil de ensalivar al masticar, comentario positivo puesto que consideran que el pan sándwich que actualmente está en el mercado se apelmaza en el paladar durante la masticación, lo cual dificulta tragarlo.

Análisis químicos

La muestra de harina de arroz analizada presentó un contenido de amilosa de 7.55%, lo que indica que el arroz utilizado para la realización de este trabajo de investigación es de bajo contenido de amilosa, característica que hace a la harina de arroz utilizada, ideal para la producción de pan con una buena textura de miga. Esta afirmación se basa en que el contenido de amilosa es un factor que afecta la textura de los panes leudados, es decir, solo el arroz con bajo contenido de amilosa y baja temperatura de gelatinización resulta en panes suaves sin importar el tamaño del grano. Si alguno de los dos factores es alto la textura del pan se vuelve arenosa.

Los resultados de análisis proximal del pan de trigo vrs. el pan con 30% de arroz se presentan en la Tabla 6.

TABLA 6
Composición química proximal del pan de 100% de trigo y el pan trigo : arroz (70:30)

	Trigo (100%)	Trigo: Arroz (70:30)
Humedad, g/100g	32.44 ± 0.17	31.03 ± 0.32
Proteína, g/100g	13.22 ± 0.17	11.36 ± 0.36
Grasa, g/100g	3.85 ± 0.17	4.48 ± 0.11
Cenizas, g/100g	1.09 ± 0.17	1.98 ± 0.03
Carbohidratos g/100g	49.40 ± 0.17	51.65 ± 0.39
Fibra Dietética Total g/100g	3.28	2.89
Lisina Disponible mg/g	23.32	35.10
Sodio mg/100 g	184	173
Proteína Digerible g/100g	5.29 ± 0.001	5.84 ± 0.004

En el análisis de proteínas se obtuvo un resultado de 11.36% de proteína en el pan desarrollado. Dado que cada porción de pan tiene un peso de 80 g (2 rebanadas), cada porción aporta 9.09 g de proteína. Esto a su vez nos da un contenido de 27.27 g de proteína al ingerir 3 porciones diarias que es el consumo máximo de pan recomendado para personas de tercera edad. Esta cantidad de proteínas obtenidas en el pan aporta 43.25% y 54.54% de la ingesta diaria recomendada de proteínas para un adulto mayor de sexo masculino y femenino respectivamente.

Es de interés discutir el efecto complementario nutricional del arroz como fuente de proteína a las proteínas en la harina de trigo. Esto se detalla en la Tabla 7, en donde se ve que conforme aumenta el nivel de arroz en la formula aumenta la calidad de la proteína de 1.33 a 1.61, aunque la diferencia no

es estadísticamente significativa. A pesar que se ha indicado que el contenido de proteínas del arroz es limitado, su calidad es mejor a la de otros cereales. En comparación con la harina de trigo, el contenido de aminoácidos del arroz (especialmente lisina) es más alto que los aminoácidos del trigo, lo cual hace que las proteínas del arroz sean biológicamente mejores que las del trigo.

TABLA 7
Calidad proteínica de panes elaborados con diferentes proporciones de harina de trigo y de harina de arroz

Dieta		Aumento en peso promedio, g	Alimento ingerido promedio, g	NPR
Trigo	Arroz			
100	0	9 c	120	1.33 ± 0.20 b
85	15	13 bc	141	1.38 ± 0.34 b
80	20	11 bc	125	1.55 ± 0.36 b
70	30	16 bc	141	1.61 ± 0.38 b
60	40	16 bc	141	1.65 ± 0.24 b
50	50	15 bc	124	1.72 ± 0.48 b
40	60	23 b	143	1.97 ± 0.40 b
Caseína		97 b	277	3.59 ± 0.31 a

Esto último se pudo comprobar no solo por la respuesta biológica sino con un análisis de la lisina disponible en el producto con sustitución de harina de trigo con harina de arroz comparado con un pan control. Los resultados de la Tabla 6 confirman que el pan con 30% de sustitución de la harina de trigo con harina de arroz tiene más lisina disponible por gramo de proteína (3.09 mg lisina/g proteína), que el pan elaborado solamente con harina de trigo (1.84 mg lisina/g proteína).

De estos resultados podemos afirmar que una porción de nuestro producto aporta 28.08 mg lisina en comparación de 19.46 mg de lisina que aporta una porción del pan control. Estos resultados demuestran que el arroz es una fuente aceptable de lisina para los productos de panificación ejerciendo un efecto complementario.

Se determinó la calidad de la proteína del producto desarrollado, no solo por su composición en el aminoácido lisina y la respuesta biológica, sino que también por su digestibilidad. Se determinó que el porcentaje de proteína que puede ser absorbido en forma de aminoácidos del pan con sustitución parcial de harina de trigo con harina de arroz (5.84%) es mayor que el del pan control (5.29%). El análisis de éstos hallazgos confirma que las proteínas del producto desarrollado son de mejor calidad que las del pan control así como la ventaja nutricional que tiene la sustitución parcial de la harina de trigo con harina de arroz en productos de panificación.

Como se indica en la Tabla 8, referente al análisis nutricional del pan 70:30 trigo arroz, su consumo aportaría cantidades atractivas de los diferentes nutrientes que fueron analizados.

TABLA 8
Análisis nutricional del pan con 30% de sustitución con harina de arroz

Tamaño por porción		2 rodajas - 80 g	
Porciones por envase		Aproximadamente 6	
Cantidad / Porción			
Calorías		356	
		% del Valor Diario*	
Grasa total	3.58 g	4.11	
Sodio	138.4 mg	6.92	
Carbohidratos	41.32 g	13.24	
Proteínas	9.09 g	14.43	
Fibra dietética	2.31 g	7.70	

* Basados en una dieta de 2,400 calorías

Para la determinación de la vida de anaquel, se evaluaron cada día, desde su elaboración hasta 5 días de almacenamiento, las características de sabor, textura y crecimiento de hongos en rodajas de pan. En el cuarto día se sintieron variaciones leves en la textura por la retrogradación de los almidones y para el día siete se presentó crecimiento de mohos. Para retardar la aparición de hongos, se utilizó un preservante antifúngico, con el cual se logró aumentar la vida de anaquel del producto a tres semanas.

Finalmente, se hizo un análisis de compresibilidad del producto desarrollado comparándolo con el control (Tabla 9). Esto debido a que la dureza o firmeza del pan se relaciona bien con su envejecimiento. Los valores de dureza, expresados en kilogramos de fuerza de compresión del pan con 30% de sustitución de harina y del pan control están en la tabla.

TABLA 9
Evaluación de dureza del pan trigo: arroz (70:30) comparado con el pan de trigo (100%)

Tiempo días	Fuerza de compresión (kg)	
	Pan de trigo (100%)	Pan de trigo/arroz (70:30)
0	3.56	7.67
2	3.46	16.43
5	29.65	19.82

Es claro que la velocidad de endurecimiento del pan con sustitución de harina es mayor que el pan control. El aumento de dureza en el pan con sustitución de harina durante el segundo día a temperatura ambiente sugiere el inicio de la retrogradación del almidón. Además, si se calcula la fuerza media de compresión de ambas muestras, se obtienen 14.64 y 12.22 kg de fuerza para el pan con sustitución parcial de harina y para el pan de trigo respectivamente.

De estas fuerzas medias se puede decir que el producto desarrollado es más firme que el pan control. Sin embargo, el análisis de varianza de todos los valores demostró que la dureza del pan con sustitución de harina no es significativamente diferente que la dureza del pan de trigo ($F_{\text{experimental}} < F_{\text{crítico}}$: $0.07 < 7.71$).

CONCLUSIONES

1. Sí fue posible desarrollar un pan blanco (tipo sándwich) con sustitución parcial de la harina de trigo (70%) por harina de arroz (30%), apto para ser consumido por personas de la tercera edad.
2. Los porcentajes de composición química del pan son apropiados para una dieta de una persona de la tercera edad.
3. El producto final demostró tener un buen grado de aceptabilidad dentro del panel de personas de la tercera edad que lo evaluaron sensorialmente.
4. El pan con 30% de sustitución parcial de harina de trigo con harina de arroz comparado con un pan de trigo tiene menor contenido de proteínas pero de mejor calidad por su digestibilidad y contenido del aminoácido lisina.
5. El producto desarrollado es ideal para pacientes en dietas bajas en sodio y bajas en proteínas.
6. El consumo habitual de arroz se aconseja a toda la población, y especialmente a personas de la tercera edad con hipertensión ya que una característica de este alimento es su bajo contenido en sodio. El pan desarrollado es una excelente opción para aumentar el consumo de arroz en las personas de la tercera edad con efectos positivos en su salud.

REFERENCIAS

1. OPS. Las Condiciones de Salud en las Américas. Vol. 1 Ed. 1990, OPS, Washington, DC Pub. Cient. 524.
2. INE. 1996. República de Guatemala: Características de Población y Habitación, Cifras Definitivas. Instituto Nacional de Estadística, INE, Sistema Estadístico Nacional, SEN. Guatemala. 162 pp.
3. INE. 2001. Guatemala: Proyecciones de Población a Nivel Departamental y Municipal por año Calendario - Período 2000-2005. Instituto Nacional de Estadística 194 pp.
4. BJ Anthony. Nutritional assessment of the Elderly, *Cajanus* 1999;32(4) 201-216.
5. Havel R. et. Al. Recommended dietary allowances. 10ª edición. Food and Nutrition Board Commission on Life Sciences, National Research Council. National Academy Press. EEUU. 1989;285 pp.
6. Buzinci K. Drug therapy in the Elderly. *Cajanus* 1999;32(4) 194-200.
7. Horwitz, A. Guías alimentarias y metas nutricionales en el envejecimiento. *Arch Latinoamer Nutr.* 1988;38:723-749.
8. Morales de León J, M del Pilar Mercado Godínez y P Cecin Salomon. Desarrollo de una pasta para sopa diseñada de acuerdo a los gustos y recomendaciones nutricias para los ancianos. *Arch. Latinoamer Nutr.* 1997;47:152-156.
9. Topp O, E Wittig de Penna, A Bunger, D Soto, L Cariaga, E Cornejo, R Fuenzalida. Desarrollo de alimentos para el adulto mayor pan fortificado. *Alimentos* 1994;19(2):18-27.
10. Wittig de PE, A Bunger, S Acevedo, D Soto, L Cariaga, R Fuenzalida, E Cornejo. Desarrollo y control de un alimento de repostería para el adulto mayor. *Arch Latinoamer Nutr.* 1994;44:95-5.
11. Vera MS, Wittig de Penna E, A Bunger, D Soto, L Cariaga, R Fuenzalida, E Cornejo, L López. Desarrollo de productos para el adulto mayor: Budín enriquecido con vitaminas. *Arch. Latinoamer Nutr.* 1995;41:63-66.
12. Wittig de Penna, EL Serrano, A Bunger, D Soto, L López, N Hernández & J Ruales. Optimización de una formulación de espaguetis enriquecidos con fibra dietética y micronutrientes para el adulto mayor. *Arch Latinoamer Nutr.* 2002;52:91-100.
13. Morales de León J, PC Salmón, ML Crail Chávez. Desarrollo de un picadillo de humedad intermedia para ancianos con base en soya texturizada. *Arch Latinoamer. Nutr.* 1995;45(4):329-335.
14. Del Catillo VC, MA de Román & JC Gotifredi. Alimentos de humedad intermedia para ancianos en base a extrusado de maíz: soya, adicionado con calcio. *Arch Latinoamer Nutr.* 2000;50(3) 296-300.
15. Matz, S. 1992. *Bakery Technology and Engineering*. 3ª Edición. EEUU. 853 pp.
16. AACC 74-09.
17. Association of Official Analytical Chemists. AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis*. 14ª Edición. Arlington, Virginia. EEUU. 1141 pp.
18. Hurrell, R., P. Lerman & K. Carpenter. Reactive lysine in food stuffs as measured by a rapid dye-binding procedure. *J Food Sci.* 1979;44:1221-1231, 1979.
19. Juliano BO. A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Sci Today.* 1971;Vol. 16, No. 10 [334-340] pp.
20. Mertz, E.T., M.M. Hassen, C.C. Whiltern, A. Kirleis, L. Tu and J. Actell. Pepsin digestibility of proteins in sorghum and major cereals. *Pric. Nat. Acid. Sci. U.S.* 81:72, 1984.
21. Wittig de Penna, E. 1981. Evaluación Sensorial. Una metodología actual para tecnología de alimentos. Talleres Gráficos USACH. Chile. 134 pp.
22. Dyets Inc. Products Catalog 1999. 2508 Easton Ave. Bethlehem, Pa. 18017. INCAP. 1993. Valor Nutritivo de los Alimentos de Centro América. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, INCAP/Organización Panamericana de Salud, OPS. Guatemala. 98 pp.

Recibido:17-12-2003

Aceptado:23-08-2004

Caracterización nutricional de los carbohidratos y composición centesimal de raíces y tubérculos tropicales cocidos, cultivados en Costa Rica

Adriana Blanco-Metzler¹, Juscelino Tovar², Mireya Fernández-Piedra¹

Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA)¹, Facultad de Ciencias, Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela²

RESUMEN. Las raíces y tubérculos tropicales (RTT) son alimentos básicos de la dieta de los pobladores de estas zonas; son producidos por pequeños y medianos agricultores y se les ha prestado poca atención. En el presente estudio se caracterizó nutricionalmente los carbohidratos y se determinó la composición centesimal de yuca (*Manihot esculenta*), tiquisque (*Xantosoma sp*) y ñame (*Dioscorea alata*) cocidos. La composición proximal se determinó, en 20 muestras de cada producto, mediante la metodología del AOAC y se caracterizaron los carbohidratos (fibra dietética, almidón disponible, almidón resistente y tasa de amilólisis) por medio de métodos enzimáticos. Las tres RTT cocidas están compuestas fundamentalmente por agua y carbohidratos. Son fuentes moderadas de energía y fibra dietética, bajas en proteína y libres de grasa. Los contenidos de humedad, proteína, cenizas y fibra dietética difieren significativamente ($p \leq 0,01$) según la RTT. La composición centesimal de estas RTT producidas localmente difiere de las producidas en el Pacífico Sur, y es en cierto grado similar a las producidas en otros países de Latinoamérica. Entre 84 y 88% de la fibra dietética es insoluble y el almidón disponible representa 74-84% del peso seco, mientras que el resistente varió entre 0,7 y 1,7%. La tasa de α -amilólisis de la yuca y el tiquisque hervido resultó semejante y mayor que la del ñame ($p \leq 0,01$). La velocidad de hidrólisis de los almidones de las RTT es intermedia con respecto a otros alimentos evaluados en la literatura y resultó menor que la del material de referencia (almidón gelatinizado de papa). Se concluye que en el contexto de una alimentación saludable estas RTT son alimentos valiosos cuyo consumo se puede promover en Costa Rica y otros países con problemática de salud nutricional semejante.

Palabras clave: Raíces y tubérculos tropicales, yuca, tiquisque, ñame, composición química, valor nutritivo, carbohidratos, almidón, fibra dietética, Costa Rica.

SUMMARY. Nutritional characterization of carbohydrates and proximal composition of cooked tropical roots and tubers produced in Costa Rica. Tropical roots and tubers (TRT) are important staple foods in the tropics. TRT are produced by small farmers and have received only limited attention. The objective of this paper was to evaluate nutritionally important carbohydrate fractions and proximal composition of cooked cassava (*Manihot esculenta*), cocoyam or tannia (*Xantosoma sp*) and yam (*Dioscorea alata*) grown in Costa Rica. Twenty boiled samples of each TRT were analyzed for proximal composition, following AOAC protocols. Carbohydrate fractions (dietary fiber, available and resistant starch) and α -amylolysis rate were assessed by enzymatic methods. All TRT analyzed consisted mainly of water and carbohydrates, representing moderate dietary fiber and energy sources. They show a low protein level and contain no fat. Moisture, protein, ashes and dietary fiber contents vary significantly ($p < 0.01$) among the three species. In terms of their proximal composition, these locally grown TRT differ from TRTs cultivated in the South Pacific area, but appear similar to other Latin American varieties. In all samples most of the dietary fiber (84-88%) is insoluble; available starch ranges between 74 and 84% of the dry matter, whereas resistant starch content varied between 0.7 and 1.7%. Amylolysis rate was similar for cassava and cocoyam, whereas a significantly slower digestion ($p < 0.01$) was recorded for yam. Compared to values reported in the literature for other starchy foods and to gelatinized potato starch, used as reference sample, the studied TRT showed intermediate amylolysis rates. It is concluded that consumption of these TRT may be promoted in Costa Rica and other countries with a similar nutritional situation.

Key words: Tropical roots and tubers, cassava, cocoyam, yam, chemical composition, nutritive value, carbohydrates, starch, dietary fiber, Costa Rica.

INTRODUCCION

Las raíces y tubérculos tropicales (RTT) son alimentos básicos de la dieta de los pobladores de América Latina, África y Asia. Son producidos en climas tropicales principalmente por pequeños a medianos agricultores y su valor nominal es escaso (1,2).

Financiado por INCIENSA, Fundación para el fomento y promoción de la investigación y transferencia de tecnología agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica (FITACORI-MAG) y la Red Latinoamericana de Alimentos-International Program in Chemical Sciences de la Universidad de Uppsala, Suecia (LANFOOD-IPICS).

Según la FAO (1), "históricamente, los responsables de las políticas y los investigadores han prestado muy poca atención a las raíces y tubérculos, ya que la mayoría de sus esfuerzos se han centrado en los cultivos comerciales o en los cereales más conocidos". No fue hasta hace poco que en Latinoamérica se comenzó a contar con datos de valor nutritivo de las RTT en cocido (3,4), mientras la caracterización en términos nutricionales de los carbohidratos en material cocido ha avanzado poco, con escasa documentación en estas tablas o en documentos específicos (1-4).

El consumo nacional de raíces y tubérculos se ha reducido en Costa Rica en un 20% en las últimas tres décadas (5,6). De acuerdo a Aráuz y Gómez (7) en la población del área metropolitana nacional esta tendencia se podría atribuir a aspectos culturales y por desconocimiento de formas de preparación y de sus propiedades nutricionales. Del mismo modo que los pobladores del área tropical mundial (1), en Costa Rica las RTT se asocian con alimentos que básicamente proporcionan energía a la dieta humana, en forma de carbohidratos y que se destinan a consumidores de bajos ingresos (1,7). Además, presentan problemas locales de mercadeo debido a la baja calidad del producto ofrecido, a la falta de promoción de su consumo, y al poco desarrollo tecnológico en el producto cosechado, entre otros (7).

El componente que caracteriza a las RTT es los carbohidratos complejos en forma de almidón, cuya digestión y absorción en el intestino delgado puede variar según el producto, e incide en la elevación de la glucemia. Entre los factores determinantes del índice glucémico están los intrínsecos (que dependen de las características de las fracciones que los componen) y los extrínsecos (contenido y tipo de fibra dietética, almidón resistente, así como las condiciones de procesamiento y almacenamiento, entre otros) (8-10).

El consumo de carbohidratos complejos se está promoviendo en países donde las enfermedades crónicas no transmisibles constituyen un problema de salud pública (8,9) y constituye una meta para mejorar el estado nutricional, así como para el manejo de la diabetes mellitus y la obesidad (9,11).

El presente estudio tuvo como propósito caracterizar nutricionalmente los carbohidratos y determinar la composición centesimal de las raíces y tubérculos tropicales cocidas y cultivadas en Costa Rica, mediante análisis químicos y enzimáticos, con el objetivo final de transferir el conocimiento para promover su consumo y comercialización, la orientación nutricional de la población y su incorporación en las tablas y sistemas de información en composición de alimentos locales y regionales, tales como el Sistema Latinoamericano de Datos de Alimentos (LATINFOODS).

MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron RTT de importancia en alimentación y/o comercial en Costa Rica y pertenecientes a tres familias diferentes: yuca (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae), tiquisque (*Xantosoma sp*, Araceae) y ñame (*Dioscorea alata*, Dioscoreaceae). De cada RTT se recolectaron 20 muestras de primera calidad y de 3 a 5 kg, en plantas empacadoras ubicadas en las regiones de mayor producción de estos productos y concentración de las empacadoras. La yuca recolectada fue de la variedad Valencia, que es la producida en mayor volumen en el país (alrededor del 80% de la producción) y se recolectó en forma parafinada. El parafinado es un proceso de manejo poscosecha utilizado para conservar los alimentos frescos (naturales). Parte de la yuca que Costa Rica comercializa en forma fresca, se distribuye en forma parafinada.

Con la ayuda de los Ingenieros Agrónomos del Departamento Fitosanitario de Exportación del Ministerio de Agricultura de Costa Rica, se seleccionaron aleatoriamente por producto cuatro plantas empacadoras con alto volumen de procesamiento y estabilidad en la producción a lo largo del año. Se recolectaron cinco muestras por planta empacadora en forma espaciada en el tiempo, que fue de alrededor de seis meses. La yuca se muestreó en empacadoras ubicadas en los distritos Fortuna y Pital, que presentan condiciones de suelo muy diferentes, por lo que la inclusión de las dos zonas permitirá obtener una situación más cercana al promedio del Cantón de San Carlos, Región Huetar Norte. Se muestreó el tiquisque en Pital de San Carlos y el ñame en el distrito de La Rita de Guápiles, Región Huetar Atlántica.

La muestra recién recolectada se trasladó al laboratorio a fin de realizar los análisis. Se determinó el peso unitario en una balanza granataria, para ello se pesó de cinco a diez unidades por muestra fresca y cruda.

Todas las unidades de cada muestra fueron peladas en forma manual y se partieron en rodajas de aproximadamente 1 cm de ancho. Cada rodaja fue cortada en forma de x en cuatro partes iguales y cada una se utilizó para conformar una muestra compuesta que se almacenó en refrigeración un máximo de cuatro días. Las muestras incluyeron las secciones de todas las rodajas de cada raíz o tubérculo, tomando en cuenta que existen variaciones en el tiempo de cocción dentro y entre raíces de una misma planta (12). El método de cocción elegido fue la ebullición (hervido) que es el proceso culinario comúnmente empleado en Costa Rica. Se preparó diariamente la muestra cocida a fin de obviar posibles efectos de las condiciones de almacenamiento y refrigeración en los almidones de la muestra cocida. Las muestras se cocinaron en agua destilada en ebullición en una olla tapada, hasta que tuvieran una textura apetecible para el gusto local. El tiempo neto de cocción se estableció mediante pruebas preliminares; para yuca fue de 20 minutos, tiquisque 18 minutos y ñame 15 mi-

nutos. Se escurrió el producto cocido durante 10 minutos y se enfrió 14 minutos adicionales, luego se homogenizó manualmente en un molino de maíz para su análisis inmediato.

En la muestra recién cocida y molida se determinó por triplicado humedad por el método convencional de secado en horno de vacío a 95-97 °C, N° 925.09 del AOAC (13). La muestra restante se secó en un horno de convección a 70°C durante 14 horas, se molió a un tamaño de partícula menor a 850 µm y se almacenó a temperatura ambiente por un máximo de 30 días antes de su análisis.

Siguiendo los métodos oficiales del AOAC números 920.87, 920.39 y 923.03 (13) se determinó por triplicado en la muestra seca proteína, grasa y ceniza, respectivamente. Se estimó los carbohidratos totales por diferencia y los carbohidratos disponibles restando a los carbohidratos totales la fibra dietética total. Se estimó las calorías por medio de los factores de conversión de Atwater.

Los análisis de carbohidratos complejos empleados y el número de repeticiones efectuadas fueron: fibra dietética según método 985.29 del AOAC por cuadruplicado (13); almidón disponible por triplicado (14); almidón resistente retrogradado por triplicado (15) y la tasa de α -amilólisis por duplicado, empleando amilasa pancreática porcina (16). Todos ellos, excepto la fibra, se analizaron en muestras recién cocidas y molidas en fresco. La fibra se determinó en muestra cocida seca tamizada a un tamaño de partícula menor a 300 µm. El almidón total se estimó como la suma del almidón disponible y el resistente (17).

Se emplearon en calidad de material de referencia de los métodos de laboratorio: almidón de papa pregelatinizado por ebullición (Fecola di patate, Asborno 3 Gobetti) para las determinaciones de almidón disponible y tasa de amilólisis; para la cuantificación de almidón resistente se utilizó hojuelas de maíz (Corn Flakes de Kellogg's). Se verificó la calidad de los análisis de los macronutrientes con la obtención de resultados aceptables en el programa de las rondas interlaboratorio de análisis de alimentos de Costa Rica (18).

Se analizaron los datos con el programa estadístico SPSS versión 10.0 y se estimó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. Se realizó análisis de varianza de los resultados entre los tres productos estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se indica el peso unitario promedio de las muestras en estudio. Por unidad, el ñame resultó significativamente ($p \leq 0,01$) el material de mayor peso, la yuca intermedio y el tiquisque el menor. La variabilidad en el peso de un mismo producto resultó amplia, hasta en un 38%. Los pesos unitarios encontrados se encuentran comprendidos en los rangos o por encima de los mínimos reportados en las normas internacionales de calidad para yuca y tiquisque (19,20).

TABLA 1
Peso unitario de yuca, ñame y tiquisque de Costa Rica¹

Estadísticos	Yuca	Ñame	Tiquisque
Promedio	609 ^b	827 ^c	265 ^{a2}
Desviación estándar	190	211	101
Coefficiente de variación	31	26	38
Número de muestras (n)	98	115	329

1 gramos de producto crudo

2 Letras diferentes en una misma línea indican diferencia significativa ($p \leq 0,01$)

El contenido de macronutrientes de los tres productos cocidos se resume en la Tabla 2. Se confirma que estos alimentos están compuestos en mayor proporción por agua y carbohidratos (1-4), y se pueden considerar como fuentes moderadas de energía. El contenido de proteína es bajo y sólo de detectaron niveles traza de grasa, tal y como se ha reportado anteriormente en la literatura (1-4). Los contenidos de humedad, proteína y cenizas difieren significativamente ($p \leq 0,01$) según el producto. Además, se observa que el ñame cocido resultó el producto con mayor contenido tanto de agua como de proteína, siendo intermedio en cenizas.

TABLA 2
Composición centesimal de raíces y tubérculos cocidos y cultivados en Costa Rica¹

Producto cocido	Yuca	Ñame	Tiquisque
Humedad, g	71,2 ± 3,6 ^{a2}	77,0 ± 1,1 ^c	74,5 ± 1,9 ^b
Proteína, g	0,5 ± 0,1 ^a	2,3 ± 0,7 ^c	1,3 ± 0,3 ^b
Grasa, g	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
Cenizas, g	0,5 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,0 ^b	0,9 ± 0,1 ^c
Carbohidratos totales ³ , g	27,7	19,9	23,2
Carbohidratos disponibles ⁴ , g	25,8	17,6	20,7
Energía, kcal	114,1	97,8	98,9

1 Promedio ± desviación estándar, % en base fresca (n=20)

2 Letras diferentes en una misma línea indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$)

3 Carbohidratos totales = 100 - (humedad + proteína + grasa + cenizas)

4 Carbohidratos disponibles = carbohidratos totales - fibra dietética total

Una vez cocida, la variedad de yuca nacional contiene hasta un 8% más de agua (71,2% vs. 63,0%), 9% menos de almidón (24,3% vs. 33,4%) y 0,2% menos de cenizas (0,5% vs. 0,7%) que las provenientes de los países del Pacífico Sur (2); sin embargo, el contenido en base fresca de grasa, proteína y fibra dietética registrado aquí resultó semejante al de aquellas. Por otra parte, la composición centesimal de la yuca producida en Brasil, cocida durante 15 minutos (4), resultó casi idéntica a la encontrada para la variedad cultivada en Costa Rica. Valores para yuca cocida reportados en la Tabla

de Composición de Alimentos de América Latina (3) difieren a los aquí analizados, básicamente por contener menos humedad y por lo tanto se concentran los sólidos y se incrementa su valor energético.

Bradbury y Holloway (2) presentan el valor nutritivo para *D. alata*, cuyo contenido de proteína es menor (1,7% vs. 2,3%) y los de almidón (18,0% vs. 17,1%) y fibra dietética (3,2% vs. 2,3) son mayores que el del ñame cultivado en Costa Rica; sin embargo con respecto al contenido de humedad, grasa y ceniza, los valores concuerdan. El valor nutritivo de ñame cocido procedente de Venezuela aparece en la Tabla de Composición de Alimentos de América Latina (3) con valores semejantes a los nacionales. La Tabla brasileña de composición de alimentos no reporta resultados de composición centesimal de ñame (4), conocido en portugués como inhame-da-china; cará o inhame-da-índia (21).

En el caso de *Xanthosoma sp.*, el documento base del ACIAR (Australia) (2), recoge datos únicamente para material crudo, donde se encuentran diferencias importantes con respecto al material producido en Costa Rica para el contenido de almidón (27,6% vs. 19,4%) y fibra dietética (1,0% vs. 2,5%). La Tabla de Composición de Alimentos de América Latina (3) reporta el valor nutritivo de ocumo, o tiquisque (21), cocido; los datos proceden de Venezuela con ligeras diferencias a los aquí reportados.

Por lo tanto, la composición centesimal de las RTT producidas localmente difieren de los producidos en el Pacífico Sur (2) y es, en cierto grado, similar a las producidas en otros países de Latinoamérica (3,4).

El contenido de fibra dietética aparece en la Tabla 3. Se observa que la yuca presentó el menor contenido de fibra dietética total, y el tiquisque el mayor; encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tres materiales. Prevalece la fibra dietética insoluble sobre la soluble en los tres materiales. El contenido de fibra dietética total reportado para yuca cocida de Brasil (4) resultó semejante al de los materiales de Costa Rica (1,99 vs. 1,90 g%, base fresca). Considerando que el tamaño de porción para estos productos es alrededor de 100 g, éstos representan fuentes intermedias de fibra dietética.

TABLE 3
Fibra dietética en raíces y tubérculos cocidos y cultivados en Costa Rica¹

Producto cocido	Yuca	Ñame	Tiquisque
Fibra dietética total, g	1,9 ± 0,3 ^{a2}	2,3 ± 0,2 ^b	2,5 ± 0,3 ^c
Fibra dietética insoluble, g	1,6 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,2 ^b	2,2 ± 0,3 ^c
Fibra dietética soluble, g	0,4 ± 0,2 ^b	0,2 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,1 ^a

¹ Promedio ± desviación estándar, % en base fresca (n=20)

² Letras diferentes en una misma línea indican diferencias significativas (p ≤ 0,01)

El almidón de las RTT fundamentalmente es disponible o digerible (ver Tabla 4) y el contenido de almidón resistente retrogradado es muy bajo, tal y como era de esperar en producto recién cocido proveniente de materiales amiláceos generalmente bajos en amilosa (17), y es similar (0,20% vs. 0,31 g%) al reportado en la Tabla brasileña de composición de alimentos (4). Los valores aquí registrados se asemejan a los encontrados anteriormente en Venezuela para yuca cocida (17).

TABLE 4
Fracciones de almidón en raíces y tubérculos cocidos y cultivados en Costa Rica¹

Producto cocido	Yuca	Ñame	Tiquisque	Control
Almidón total, g	24,3	17,5	19,4	—
Almidón disponible, g	24,1 ± 2,9 ^b	17,1 ± 1,5 ^{a2}	19,0 ± 2,4 ^b	83,8 ± 3,5 ^c
Almidón r esistente, g	0,2 ± 0,2 ^a	0,4 ± 0,2 ^b	0,4 ± 0,0 ^b	1,3 ± 0,5 ^c

¹ Promedio ± desviación estándar, % en base fresca (n=20)

² Letras diferentes en una misma línea indican diferencias significativas (p ≤ 0,01)

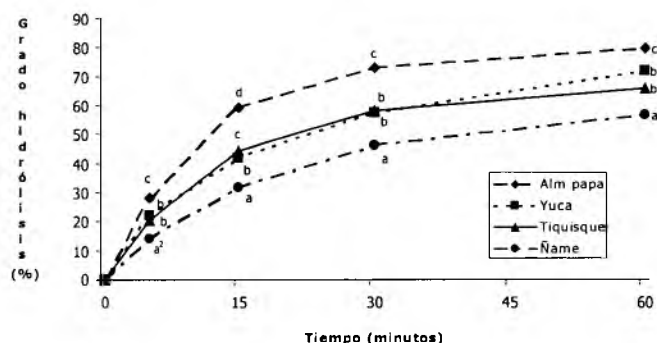
La tasa o velocidad de hidrólisis enzimática del almidón disponible aparece en la Figura 1. La velocidad de hidrólisis promedio del almidón de las tres RTT es menor que la exhibida por la muestra de rápida digestión (almidón de papa gelatinizado); dicho parámetro resultó semejante para la yuca y el tiquisque (72% y 66% respectivamente a los 60 minutos), mientras que el ñame presentó el menor índice de hidrólisis (57%). De acuerdo con esos resultados, los almidones presentes en las RTT cocidas y preparadas en esta investigación, se pueden clasificar como alimentos cuya velocidad de hidrólisis es intermedia, tal y como el grupo de Wenzel de Menezes (22,23) sugirió para la yuca.

La tasa de amilólisis de la yuca y el tiquisque hervidos resultó semejante, mientras que el almidón del ñame presentó un comportamiento diferente y siempre mucho menor (p ≤ 0,01) que el de los dos otros productos. Llama la atención este resultado pues concuerda con lo encontrado anteriormente, que la composición centesimal del ñame difiere de la de la yuca y el tiquisque. Desde el punto de vista de manejo dietético, el ñame es muy interesante porque resultó el material estudiado con menor contenido energético, al contener más agua, y cuyo almidón es el de menor velocidad de digestión y por ello, posiblemente, con un índice glucémico menor (10). Dicha posibilidad debe ser corroborada en estudios *in vivo*.

Se concluye que el ñame, la yuca, y el tiquisque son alimentos cuyo consumo se puede promover en el ámbito nacional e internacional considerando aspectos de salud y nutrición. Con base en su valor nutricional y las propiedades de sus carbohidratos se le pueden considerar a las RTT en ali-

mentos saludables, o como lo indica Lunven, Director de la Política de Alimentación y Nutrición de la FAO (1), son valiosos componentes de una dieta equilibrada, actualmente conocida como alimentación saludable (24). Se recomienda proseguir el estudio con la evaluación del índice glucémico de estas RTT.

FIGURA 1
Tasa de α -amilólisis¹ en raíces y tubérculos cocidos, cultivados en Costa Rica



1 Los ensayos de hidrólisis se realizaron en 20 muestras de cada alimento con α -amilasa pancreática porcina, empleando en cada caso la cantidad de muestra cocida que aporta 500 mg de almidón disponible (16). Se empleó como muestra de referencia al almidón de papa gelatinizado por ebullición durante 20 min.

2 Letras diferentes en una misma línea indican diferencias significativas ($p \leq 0,01$)

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero del INCIENSA y de la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica-Ministerio de Agricultura y Ganadería (FITACORI-MAG) y la Red Latinoamericana de Alimentos-International Program in Chemical Sciences de la Universidad de Uppsala, Suecia (LANFOOD-IPICS). Se agradece la colaboración técnica de los Ingenieros Agrónomos del Departamento Fitosanitario de Exportación del Ministerio de Agricultura de Costa Rica y de la Sección de Raíces y Tubérculos del Instituto Agronómico de Campinas (Brasil), así como al personal de Laboratorio de Tecnología Nutricional del INCIENSA.

REFERENCIAS

1. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Raíces, tubérculos, plátanos y bananas en la nutrición humana. Roma, Italia: Colección FAO: Alimentación y nutrición humana, N 24. 196 p.; 1991.

- Bradbury JH, Holloway WD. Chemistry of Tropical Root Crops: Significance for Nutrition and Agriculture in the Pacific.) Canberra, Australia: The Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR) Monograph N°. 6, 201p; 1998.
- FAO/LATINFOODS. Tabla de Composición de Alimentos de América Latina. Red latinoamericana de Composición de Alimentos. (<http://www.inta.cl/latinfoods>). 2002.
- Universidade de São Paulo-USP-Brasil. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. (<http://www.fcf.usp.br/tabela/>), 2001.
- Instituto de Centro América y Panamá. Oficina de Investigaciones Internacionales de los Institutos Nacionales de Salud. Ministerio de Salubridad Pública. Evaluación nutricional de la población de Centro América y Panamá. Costa Rica. INCAP V-28. Guatemala, 1969.
- Ministerio de Salud-INCIENSA (Costa Rica). Encuesta Nacional de Nutrición. "Fascículo 3. Consumo aparente". San José: Ministerio de Salud; 1997.
- Aráuz AG, Gómez J, Blanco A. Conocimientos y hábitos de consumo de raíces y tubérculos tropicales en el área metropolitana de Costa Rica. En: Memoria II Simposio Latinoamericano de Raíces y Tubérculos (SLART II) Lima, Perú, 2001. Univ. Nacional Agraria La Molina y Centro Internacional de la Papa, 2001.
- Danone Vitapole/ FAO. Glycemic Index and Health: the Quality of the Evidence. Danone Vitapole/ FAO, Nutrition and Health Collections. Éditions John Libbey Eurotext, France, 48p.; 2001.
- Jenkins DJA, Wolever TMS, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, Bowling AC, Newman HC, Jenkins AL, Goff DV. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. Am J Clin Nutr. 1981;34: 362-366.
- Björck I. Starch: nutritional aspects. En: Eliasson AC editor. Carbohydrates in foods. Marcel Dekker Inc., New York, 1996; p. 505-553.
- Hill J. Los carbohidratos en el control de peso. Boletín Dieta y Salud, Órgano Informativo de Alimentos Kellogg's sobre la Relación entre la Nutrición y la Salud. Año 7, No. 1- 8 p.; 2000.
- Lorenzi JO. Variação na qualidade culinária das raízes de mandioca. Bragantia. Campinas, 1994;53(2): 237-245.
- Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC. 16th ed. USA, Washington, 1995.
- Holm J, Björck I, Drews A, Asp NG. A rapid method for the analysis of starch. Starch/Stärke 1986;38:224-226.
- Saura-Calixto F, Goñi I, Bravo L, Mañas E. Resistant starch in foods: modified method for dietary fiber residues. J Food Sci 1993; 58: 642-643.
- Holm J, Björck I, Asp NG, Sjöberg LB, Lundquist I. Starch availability in vitro and in vivo after flaking, steam-cooking and popping of wheat. J Cereal Sci. 1985;3:193-206.
- Tovar J, Velasco Z. Available and resistant starch content in some Venezuelan Foods. Acta Cient Venez. 1995;46:208-209.
- Lois M, Blanco A, Fernández M, Fournier A, Montero L, Montero A. Evaluación de la calidad analítica en los Laboratorios de Composición de Alimentos. Memorias I Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos "Tecnologías sostenibles en la industria alimentaria". Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 19-21 julio, 1999.

19. Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del *Codex Alimentarius*. Proyecto de Norma del Codex para la yuca (mandioca) dulce. Informe de la décima reunión del Comité del Codex sobre frutas y hortalizas frescas. Informe N° Alinorm 03/35 (CL2002/27-FFV), 2002.
20. Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. Codex standard for Tannia. Codex STAN 224-2001.
21. Chávez JF, Dutra de Oliveira JE, Marchini JS. Nomenclatura de alimentos y nutrición. Caracas: Editorial Ex Libris. Segunda Edición. 1988, 242p.
22. Menezes EW, Lajolo FM, Seravalli EAG, Vannucchi H, Moreira EA. Starch availability in Brazilian foods. "In vivo" and "in vitro" assays. *Nutr Res.* 1996;16 (8) 1425-1436.
23. Menezes EW, Lajolo F. Índice glicémico como criterio de selección de alimentos. En: Memoria. Seminario: Índice glicémico en salud y alimentación humana. 12 de setiembre del 2002. Compilado por Adriana Blanco. Tres Ríos, Costa Rica. INCIENSA, 2003. (CD ROM)
24. Ministerio de Salud. Guías alimentarias para la educación nutricional en Costa Rica. 1° edición. San José, Costa Rica: Ministerio de Salud, 1997; p. 14-27.

Recibido: 18-02-2004

Aceptado:16-06-2004

Perfil lipídico de 25 pescados marinos mexicanos con especial énfasis en sus ácidos grasos n-3 como componentes nutraceuticos

María Isabel Castro-González¹, Anayté Ojeda¹, José Luis Silencio¹, Lorena Cassis¹,
Héctor Ledesma², Fernando Pérez-Gil¹

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán¹. México, D.F. México.
Escuela de Ciencias Químicas. Universidad La Salle²

RESUMEN. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar y evaluar la composición lipídica de pescados marinos mexicanos con especial énfasis en sus ácidos grasos n-3 como componentes nutraceuticos. Se analizó la porción comestible de 25 especies: humedad, proteína cruda (PC), lípidos totales (LT) y ácidos grasos (AG). En promedio, la PC fue de 18.40, la humedad 75.20 y los LT 3.60 g/100g parte comestible, respectivamente. En todas las muestras se identificaron los siguientes ácidos grasos n-3 por orden de abundancia (mg/100g parte comestible): C22:6n-3 (DHA) (229.60), C20:5 n-3 (EPA)(52.10), C18:3 n-3 (ALA)(11.80) y C20:3 n-3 (2.25). Por su distribución geográfica y distribución general no presentaron una diferencia relevante en sus distintas categorías. Por su clasificación biológica, los pescados óseos presentaron mayor contenido de n-3 que los cartilagosos, 307.82 y 74.8 mg/100g parte comestible, respectivamente. Se detectó una relación proporcional entre el contenido de lípidos totales y la concentración de AG de n-3. De acuerdo a la ubicación ecótica se observó una mayor presencia de EPA y DHA (mg/100g parte comestible) en las especies pelágicas (114.40, 420.70, respectivamente), que en las bentopelágicas (31.2, 125.3) y demersales (40.30, 225.40, respectivamente). Las especies grasas presentaron mayor contenido de EPA y DHA (mg/100g parte comestible) (109.27 y 552.70) que las semigrasas (56.12 y 226.29) y las magras (15.95 y 96.52). Los pescados óseos, grasos y pelágicos presentaron un contenido mayor de EPA+DHA. De acuerdo a los valores recomendados internacionalmente (200 a 650 mg de EPA + DHA / día), el 44% de las especies analizadas se pueden considerar como alimentos funcionales, ya que las concentraciones de EPA + DHA se encontraron en un intervalo de 220 - 1300 mg/100g.

Palabras clave: Pescados marinos, ácidos grasos, omega 3, nutraceuticos, México.

SUMMARY. Lipidic pattern of 25 Mexican marine fishes with special emphasis in their n-3 fatty acids as nutraceuticals components. The aim of this study was to characterize and to evaluate the lipidic composition of mexican marine fishes with special emphasis in n-3 fatty acids as nutraceuticals. The edible portion of 25 species: humidity (H), crude protein (CP), total lipids (TL) and fatty acids (FA). The average content (g/100g edible portion) of H was 75.20, PC was 18.40, TL was 3.60. Four n-3 FA were identified in all the samples and they were found in the next abundance order (mg/100g edible portion): C22:6n-3 (DHA)(229.60), C20:5 n-3 (EPA)(52.10), C18:3 n-3 (ALA)(11.80) and C20:3 n-3 (2.25). By their origin and climate there were no difference. By their biological classification, n-3 FA content was higher in bony fishes than cartilaginous fishes. It was detected a proportional relation with the n-3 FA concentration and total lipid content. According to their ecotic distribution there were numerical differences in DHA content (mg/100g edible portion) between pelagics (420.70), benthopelagics (125.30) and demersals fishes (225.40). Fatty fishes had higher content of EPA and DHA (mg/100g edible portion) (109.27 and 552.72) than semifatty fishes (56.12 and 226.29) and leanness (15.95 and 96.52), respectively. Bony, fatty and pelagic fishes had a higher content of EPA+DHA. According with the international recommendation values (200 to 600 mg EPA+DHA/day) the 44% of the analyzed species could be considered as functional foods due to their high content of EPA + DHA in a range of 220 to 1300 mg/100g.

Key words: Marine fishes, n-3 fatty acids, nutraceuticals, Mexico.

INTRODUCCION

Las encuestas de alimentación y nutrición de los años 1995, 1997 y 2000 en la República Mexicana revelaron datos sumamente preocupantes sobre el bajo consumo de pescado por la población mexicana: 1.9 - 12.7 g/per cápita, en la zona metropolitana de la Ciudad de México donde el 71% de los estratos bajos refirió nunca consumirlo; y de 16.2 g/per cápita a nivel

nacional, en éste sólo 18.7% de las familias los consumen de una a dos veces por semana (1-3); todo esto a pesar de ser un país con casi 10,000 Km. de litorales con una gran diversidad y producción de recursos marinos (4). Debido a esto, y como un modo de apoyar el incremento del consumo de pescado, es necesario dar a conocer los beneficios que este tipo de alimento aporta para una buena salud, entre los cuales se encuentra el contenido lipídico, principalmente los ácidos

grasos n-3, además de la ya conocida calidad de su proteína.

Los ácidos grasos esenciales linoleico (n-6) y α -linolénico (n-3) se deben obtener a partir de la dieta ya que el organismo humano no los puede sintetizar; una proporción recomendada de éstos dos tipos de ácidos grasos es de 1:1 o 1:2, sin embargo, en la dieta occidental actual ésta llega a ser hasta de 12:1, debido al elevado consumo de aceites vegetales y bajo consumo de productos marinos (5,6). Estos últimos son ricos en ácidos grasos n-3, principalmente los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (7).

Según numerosas investigaciones, los ácidos grasos n-3 y sus metabolitos proporcionan múltiples efectos benéficos a la salud, tanto en el tratamiento como en la prevención de numerosas enfermedades, tales como: padecimientos de corazón por su efecto hipocolesterolémico e hipotensivo (8,9), en forma directa y como coadyuvante en tratamiento de artritis y cáncer por su efecto anti inflamatorio (10,11), en la diabetes (12), en enfermedades renales ayudando a la normalización del metabolismo de lípidos (13); en desórdenes mentales, como la pérdida de memoria, pues son uno de los componentes principales de las células del cerebro (14); en el tratamiento de la depresión (15) y en el mejoramiento del desarrollo pre y post natal (16).

Actualmente no existe una definición universalmente aceptada sobre el concepto de "alimento funcional"; con base a las definiciones emitidas por diferentes autores se sugiere que: "Un alimento funcional es cualquier alimento que en forma natural o procesada contiene sustancias seguras e inocuas ("componentes nutraceuticos") que promueven beneficios a la salud, la capacidad física y estado mental, además de cumplir con las necesidades nutricias de crecimiento y mantenimiento, y que deben estar incluidos en la dieta" (17-19).

Con base en lo anterior, algunas de las especies de pescados, pueden llegar a considerarse como alimentos funcionales, dependiendo su cantidad y tipo de componentes nutraceuticos, por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar el perfil lipídico de 25 pescados marinos mexicanos de amplio consumo y caracterizar y evaluar sus ácidos grasos n-3 como componentes nutraceuticos.

MATERIALES Y METODOS

Obtención e identificación de las muestras.

Con información existente sobre la producción y oferta-demanda de las especies de pescado marino fresco para consumo directo, a nivel nacional, se identificaron y seleccionaron las 25 especies con mayor demanda. Todas las muestras fueron proporcionadas por la Sociedad Nacional de Productores y Distribuidores de pescados y mariscos "La Nueva Viga", en la Ciudad de México. En este centro de acopio 425 bodegas comercializan diariamente más de 420 ton de productos

marinos, Por lo que se considera el punto de distribución más importante del país (20). Las muestras de pescado obtenidas se identificaron hasta especie con la ayuda de fotografías y organismos frescos en donde se tomaron en cuenta las características morfológicas principalmente, así como el empleo de claves taxonómicas y libros especializados.

Muestreo

A través de un muestreo aleatorio simple se obtuvieron triplicados de la porción comestible (filete), de diferentes organismos de cada una de las especies seleccionadas, el mismo día que llegaban de las diferentes zonas de captura (muestra); de cada muestra se obtuvieron 100 g de filete, mediante un muestreo por cuarteo (submuestra), y cada una de éstas se analizó por duplicado, previa molienda y homogeneización (21). Se agregó BHT Sigma (USA) al 0.1% como antioxidante.

Ensayos analíticos

La humedad se determinó de acuerdo al método 925.09 y la proteína según el método 976.04/920.05/977.14, descritos en el AOAC (22).

Extracción y análisis de lípidos totales.- se obtuvieron según la técnica descrita por Castro y cols. (23) para muestras de pescado. Cada muestra de pescado se pesó por triplicado (1 ± 0.01 g). Se añadieron 20 mL de una solución de cloroformo:metanol (2:1, v/v) y se dejó extraer en agitación por 12 hrs. Después de filtrarse se agregaron 2 mL de agua, e centrifugó a 3000rpm/10 min. Se extrajo la fase acuosa y la fase orgánica se evaporó en atmósfera de nitrógeno. El contenido de los lípidos totales se determina gravimétricamente.

Saponificación, metilación y composición de los ácidos grasos.- los ésteres metílicos de los ácidos grasos, se obtuvieron según la técnica de Castro y cols. (23) para muestras de pescado. Una vez obtenidos los lípidos totales se procede a una saponificación con potasa metanólica saturada para la obtención de los ácidos grasos libres, los cuales se esterifican y metilan con una solución de trifluoruro de boro-metanol. Se evaporaron a sequedad en atmósfera de N_2 . Para la identificación y cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos, se utilizó una mezcla de estándares Supelco 37 Fame Mix (USA), comparando con los tiempos de retención y áreas correspondientes entre éstos y la muestra. Se utilizó un cromatógrafo de gases Varian 3400CX, con una columna capilar de 100m x 0.25mm Supelco SP2560 (USA). La detección de los ácidos grasos fue por ionización de flama. El volumen de inyección fue de 1 μ L (split 1:100) por duplicado en cada muestra y se utilizó como estándar interno el éster metílico del ácido cis-vaccénico. Los resultados de los ácidos grasos se presentan en mg/100 g de la porción comestible.

Análisis estadísticos

Los resultados de cada una de las especies se sometieron

a un análisis estadístico descriptivo (25,26). Los resultados de los ácidos grasos n-3 se agruparon, para su evaluación como componentes nutraceuticos, dependiendo de su clasificación biológica (óseos y cartilagosos), ubicación ecótica (demersales, bentopelágicos y pelágicos), distribución general (tropical y subtropical), distribución geográfica (golfo y pacífico) y clasificación de la carne por el contenido de grasa (magros, semigrasos y grasos).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el Tabla 1 se presentan los nombres de las 25 especies de pescados marinos de amplia oferta y demanda, identificados en el mercado de pescados y mariscos "La Nueva Viga" de la Ciudad de México; de éstos, 23 pertenecen al grupo de los

peces óseos y 2 a los cartilaginosos (aleta de mantarraya y cazón), el 80% de las muestras fueron procedentes del Golfo de México. En esta misma Tabla se presenta el contenido de humedad, el cual fue semejante entre muestras, con un valor promedio de 75.16 g/100g de parte comestible. La proteína cruda (g/100g de parte comestible) se observó con una concentración desde 14.30 (cojinuda) hasta 28.00 (lisa Golfo) con un promedio de 18.41, valores semejantes a los informados en la Tabla de Valor Nutritivo de los Alimentos del 2002 (27). El contenido de proteína en el músculo del pescado generalmente no sufre grandes cambios en las diferentes épocas de pesca, sin embargo, se han reportado cambios en el contenido proteico del músculo blanco entre pescado silvestre y cultivado (28).

TABLA 1

Humedad, proteína cruda y lípidos totales en 25 especies de pescados marinos mexicanos de amplio consumo en México¹.
(g / 100g parte comestible)

Nombre común	Nombre científico	Humedad	Proteína Cruda	Lípidos Totales
Albacora	<i>Thunnus alalunga</i>	76.31 ± 0.08	18.68 ± 0.01	4.94 ± 0.11
Aleta Mantarraya.	<i>Gymnura marmorata</i>	72.74 ± 0.05	22.82 ± 0.01	1.64 ± 0.39
Atún	<i>Thunnus thynnus</i>	73.2 ± 0.05	22.90 ± 0.05	1.20 ± 0.01
Bagre	<i>Bagre marinus</i>	79.8 ± 0.08	17.00 ± 0.02	2.65 ± 0.27
Baqueta	<i>Epinephelus acanthistius</i>	76.43 ± 0.08	15.72 ± 0.04	2.80 ± 0.13
Besugo	<i>Rhomboplites aurorubens</i>	76.23 ± 0.05	18.24 ± 0.01	3.13 ± 0.14
Cabrilla	<i>Mycteroperca xenarcha</i>	70.34 ± 0.16	17.62 ± 0.02	1.12 ± 0.05
Cazón	<i>Carcharhinus porosus</i>	72.89 ± 0.16	21.15 ± 0.03	2.37 ± 0.25
Cintilla	<i>Trichiurus lepturus</i>	79.64 ± 0.18	16.56 ± 0.02	2.82 ± 0.20
Cojinuda	<i>Caranx crysos</i>	79.94 ± 0.05	14.27 ± 0.22	3.58 ± 0.03
Huachinango Golfo	<i>Lutjanus campechanus</i>	73.6 ± 0.20	20.00 ± 0.09	2.82 ± 0.35
Huachinango Pacífico	<i>Lutjanus peru</i>	81.46 ± 0.05	15.40 ± 0.21	2.78 ± 0.17
Jurel	<i>Caranx hippos</i>	74.1 ± 0.08	21.30 ± 0.14	2.52 ± 0.25
Lisa G	<i>Mugil cephalus</i>	75.5 ± 0.01	28.00 ± 0.01	2.91 ± 0.13
Lisa P	<i>Mugil cephalus</i>	68.2 ± 0.01	17.10 ± 0.04	1.47 ± 0.09
Mero	<i>Epinephelus morio</i>	79.5 ± 0.01	15.10 ± 0.07	2.98 ± 0.28
Mojarra	<i>Diapterus rhombeus</i>	79.6 ± 0.01	15.80 ± 0.04	4.06 ± 0.05
Pámpano	<i>Trachinotus carolinus</i>	64.1 ± 0.20	15.00 ± 0.11	14.85 ± 0.04
Pargo habanero	<i>Lutjanus analis</i>	82.1 ± 0.01	14.60 ± 0.21	1.23 ± 0.11
Peto Carito	<i>Scomberomorus cavalla</i>	74.8 ± 0.05	17.80 ± 0.03	4.21 ± 0.25
Robalo	<i>Centropomus undecimalis</i>	78.5 ± 0.01	20.00 ± 0.01	3.28 ± 0.19
Sierra	<i>Scomberomorus maculatus</i>	67.4 ± 0.20	18.80 ± 0.08	4.60 ± 0.22
Trucha	<i>Cynoscion nebulosus</i>	73.8 ± 0.01	17.90 ± 0.01	5.01 ± 0.23
Villajaiba	<i>Lutjanus synagris</i>	76.3 ± 0.08	18.50 ± 0.01	2.65 ± 0.35
Jorobado	<i>Selene vomer</i>	72.4 ± 0.01	19.90 ± 0.06	7.29 ± 0.38

¹ Se presenta la media ± DS de cada una de las muestras por triplicado.

Se observa que de la composición lipídica analizada (Tabla 1), la concentración de lípidos totales (g/100g de parte comestible) (LT), presenta variaciones entre los diferentes pescados con intervalos desde 1.00 (cabrilla y atún) hasta 14.85 encontrado en el pámpano. El valor promedio de los lípidos

totales fue de 3.57; el 68% de las especies analizadas presentó valores de 2.5 a 5. A diferencia de lo observado con la proteína cruda, los lípidos totales presentaron valores diferentes a lo informado en las tablas de valor nutritivo (27), por ejemplo, en el presente trabajo la sierra, el cazón y la cabrilla tuvieron

4.50, 2.40, 1.10 g/100g de LT en la parte comestible, mientras que las Tablas de valor nutritivo de alimentos mexicanos se reportaron 13.90, 10.20, 0.10 g/100g parte comestible de LT, respectivamente. El pámpano, independientemente de la fuente de información, presenta valores elevados en comparación con las demás especies (14.80 g/100g parte comestible en el presente trabajo y 9.50 g/100g parte comestible en tablas (27). El contenido de grasa en el músculo de los pescados varia considerablemente en las diferentes épocas del año y de un lugar a otro (23, 28).

En el Tabla 4 se muestra el contenido de LT de las especies según su clasificación: encontrándose que la concentración de LT de los pescados óseos fue dos veces mayor que la de los cartilagosos; los LT de los magros comparado con los semigrasos y grasos aumentaron en una proporción de 1:3. El contenido de LT en las especies clasificadas por su distribución general fue muy similar entre sí; sin embargo, en la clasificación por su distribución geográfica, los pescados del Golfo presentaron 1.5 veces más grasa que los del Pacífico. Tampoco se observó diferencia numérica en los resultados según la clasificación por su ubicación ecótica. De acuerdo a lo antes mencionado, se puede decir que los pescados óseos, grasos y del Golfo contienen una mayor cantidad de LT en comparación con las otras categorías.

En el Tabla 2 se reporta el contenido de los ácidos grasos en los pescados analizados de acuerdo a su tipología. Los ácidos grasos saturados (AGS) identificados en la mayoría de las especies fueron: C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C23:0 y C24:0. El C6:0 se identificó en la cabrilla, lisa del Pacífico, mojarra marina, pámpano, peto carito, robalo y trucha; el C8:0 se identificó solo en el cazón y la cintilla; el C10:0 en albacora, bagre, baqueta, cazón y cintilla y el C11:0 en el albacora, cazón, cintilla y huachinango de Pacífico, los valores encontrados fueron variables, desde 0.02 mg/100g parte comestible de C11:0 en el huachinango hasta 1192.00 mg/100g parte comestible de C6:0 en la cabrilla.

Los AGS totales fueron los más abundantes en la mayoría de los pescados, con un valor promedio de 490.10 ± 498.72 mg/100g parte comestible (Tabla 2). La desviación estándar observada se debe a que en alguna de las especies el valor mínimo fue de 29.05 mg/100g parte comestible y en otra alcanzó una concentración de 1662.40 mg/100g parte comestible. Los pescados con concentraciones mayores a 1g de éstos AGS totales fueron: cabrilla, cojinuda, mojarra, pámpano y lisa del Pacífico, ésta última con valores hasta 10 veces mayores a los del la lisa del Golfo (1197.27 y 86.47 mg/100g parte comestible, respectivamente). El ácido palmítico fue el AGS más abundante, con valores hasta de 1055.00 y 964.00 mg/100g parte comestible en la cintilla y pámpano, respectivamente.

Los ácidos grasos monoinsaturados (AGM) identificados en la mayoría de las especies fueron: C14:1, C15:1, C16:1,

C17:1, C18:1n9, C20:1, C22:1n9 y C24:1.

En general, los AGM fueron los menos abundantes (Tabla 2), con una media de 281.80 ± 327.00 mg/100g parte comestible, la desviación estándar observada se debe precisamente a la gran variabilidad existente entre los AGM de las especies, ya que se observó un valor mínimo de 29.67 y uno máximo de 1319.59 mg/100g parte comestible. La cojinuda, el pámpano y el jorobado presentaron hasta mas de tres veces la concentración de AGM en comparación con el 50% de los pescados que tuvieron menos de 75.30 mg/100g parte comestible. El AGM más abundante en algunas especies fue el oleico con valores de 991.00, 862.00. y 602.00 mg/100g parte comestible en la cojinuda, el pámpano y el jorobado, respectivamente.

TABLA 2

Acidos grasos totales en 25 especies de pescado marino mexicano según tipología (mg/ 100g parte comestible)

Pescado	AGS ¹	AGM ²	AGP ³	n-3	n-6	n-3/n-6
Albacora	425.42	381.56	1050.41	1330.25	73.22	0.06
Aleta Mantarraya	99.30	61.55	162.40	139.05	53.66	0.39
Atún	112.17	75.30	226.59	171.77	48.01	0.28
Bagre	404.55	332.04	537.04	382.18	141.49	0.37
Baqueta	129.03	152.90	268.56	341.56	35.33	0.10
Besugo	139.00	61.98	250.93	234.29	42.15	0.18
Cabrilla	1293.84	66.63	166.16	100.33	39.27	0.39
Cazón	100.09	53.87	94.27	23.44	27.20	1.16
Cintilla	196.26	110.74	315.58	230.10	34.36	0.15
Cojinuda	1662.42	1312.86	267.33	543.28	84.03	0.15
Huachinango G	75.36	64.37	48.11	23.88	21.44	0.90
HuachinangoP	64.42	37.09	97.28	93.05	19.08	0.21
Jurel	99.34	69.61	127.58	123.85	30.56	0.25
Lisa G	87.35	66.99	87.84	95.75	26.00	0.27
Lisa P	1198.41	116.77	172.12	106.23	70.24	0.66
Mero	115.54	73.81	93.87	74.86	28.85	0.39
Mojarra	1089.54	611.25	397.21	237.20	126.46	0.53
Pámpano	1398.57	929.76	385.08	280.53	89.36	0.32
Pargo habanero	49.93	29.05	61.16	50.63	15.02	0.30
Peto Carito	726.62	243.54	761.12	639.98	93.81	0.15
Robalo	341.52	452.95	382.55	157.28	204.76	1.30
Sierra	438.22	257.05	650.72	611.06	57.76	0.09
Trucha	854.47	476.78	598.98	623.42	80.31	0.13
Villajaiba	233.26	204.33	293.97	226.09	70.29	0.31
Jorobado	916.62	802.39	966.36	828.65	112.20	0.14

¹AGS = Σ ácidos grasos saturados

²AGM = Σ ácidos grasos monoinsaturados

³AGP = Σ ácidos grasos poliinsaturados

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGP) identificados en todas las muestras analizadas fueron: C18:2n-6c, C18:3n-3, C18:3n-6, C20:2, C20:3n-3, C20:3n-6, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:2, y C22:6n-3.

Los AGP totales (Tabla 2) de todas las especies tuvieron una media de 338.50 ± 278.30 mg/100g parte comestible,

TABLA 3
Acidos grasos n-3 en 25 especies de pescado marino mexicano de amplio consumo en México
(mg /100g parte comestible) ¹

Pescado	C18:3 n-3	C20:3 n-3		C20:5 n-5		C22:6 n-3		
Albacora	28.60	3.79	1.65	0.03	339.15	3.24	962.50	34.31
Aleta Mantarraya	1.75	1.06	0.95	0.09	10.66	3.75	126.63	23.19
Atún	2.16	1.76	2.69	0.07	13.37	1.82	156.24	16.32
Bagre	11.00	0.06	1.03	0.18	27.38	3.24	343.80	13.91
Baqueta	1.74	0.83	nd	nd	13.56	4.10	326.27	8.60
Besugo	3.88	1.28	2.48	0.29	22.60	0.01	207.81	4.58
Cabrilla	1.29	0.41	Nd	nd	13.90	1.39	85.14	0.74
Cazón	1.20	0.90	10.01	0.91	1.53	0.93	20.72	0.92
Cintilla	3.18	2.85	7.36	0.39	16.62	2.53	210.30	4.19
Cojinuda	8.43	2.95	1.24	0.30	68.00	1.00	466.85	0.73
Huachinango G	0.58	0.39	Nd	nd	4.71	0.74	18.59	1.86
HuachinangoP	1.22	0.37	0.69	0.21	6.07	2.82	85.76	4.49
Jurel	2.17	1.80	0.61	0.08	4.01	0.50	117.67	0.48
Lisa G	4.26	0.63	0.41	0.00	33.97	3.02	57.52	1.56
Lisa P	4.20	0.35	2.93	0.11	27.64	2.12	74.39	0.55
Mero	1.62	0.13	0.15	0.00	9.87	3.09	63.38	2.37
Mojarra	90.74	0.92	1.03	0.30	31.93	1.07	114.53	2.67
Pámpano	14.17	0.09	3.34	0.23	34.59	2.95	231.77	1.26
Pargo habanero	0.77	0.13	nd	nd	4.65	0.84	45.21	2.71
Peto Carito	12.14	2.16	1.55	0.29	106.10	3.56	521.74	0.15
Robalo	22.24	0.48	1.48	0.36	22.56	3.52	112.48	6.52
Sierra	8.05	0.90	2.01	0.16	77.47	2.24	525.54	6.20
Trucha	10.57	2.20	1.47	0.35	106.15	4.73	506.70	2.08
Villajaiba	3.69	0.71	0.72	0.11	40.10	2.20	182.30	0.06
Jorobado	15.01	2.08	3.55	0.20	127.68	0.92	685.96	4.57

¹Se presentan los datos de la media ± DS de cada una de las muestras por triplicado. nd= no detectado

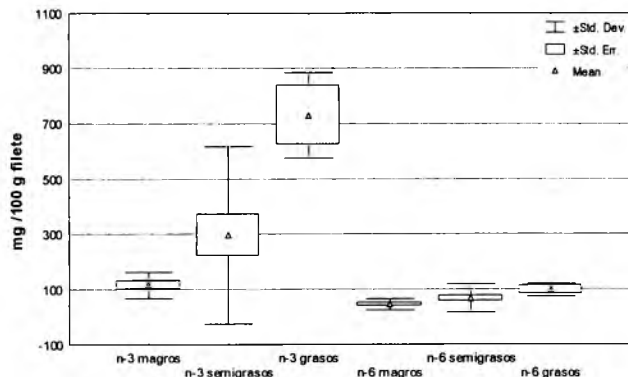
TABLA 4
Acidos grasos n- 3 en 25 especies de pescado marino mexicano de acuerdo a diferentes clasificaciones ¹
(mg/100g parte comestible)

Clasificación	N	Lip. Totales g/100g parte comestible	C18:3 n-3	C20:3 n-3	C20:5 n-3	C22:6 n-3	Total
Biológica							
Óseos	23	3.72	14.29 ± 22.73	5.48 ± 6.41	55.49 ± 78.79	238.05 ± 243.36	307.82 ± 318.98
Cartilagosos	2	1.96	1.22 ± 0.76	1.91 ± 1.65	5.90 ± 6.73	67.68 ± 76.31	74.80 ± 83.8
Grasa en carne							
Magros	5	1.31	2.03 ± 1.32	2.19 ± 1.08	15.95 ± 10.57	96.52 ± 46.96	114.50 ± 47.02
Semi- grasos	17	3.2	14.48 ± 24.66	2.23 ± 2.86	56.12 ± 88.05	226.29 ± 244.01	296.88 ± 330.96
Grasos	3	9.09	13.48 ± 2.43	2.79 ± 1.15	109.27 ± 20.52	552.72 ± 122.29	675.48 ± 143.7
Distribución general							
Subtropical	22	3.56	9.73 ± 14.27	2.45 ± 2.52	49.23 ± 78.64	215.06 ± 240.90	274.02 ± 318.15
Tropical	3	3.68	36.62 ± 43.83	1.09 ± 0.43	51.99 ± 52.01	221.86 ± 210.91	310.47 ± 253.74
Distribución geográfica							
Golfo	20	3.87	14.64 ± 133.51	2.40 ± 2.68	42.71 ± 79.64	216.30 ± 167.44	273.65 ± 81.51
Pacífico	5	2.39	7.64 ± 150.25	1.78 ± 1.01	86.75 ± 91.71	256.91 ± 194.33	351.30 ± 155.58
Ubicación ecótica							
Pelágicos	5	3.34	9.88 ± 10.89	1.64 ± 0.78	114.43 ± 149.14	420.70±333.33	545.01 ± 485.78
Bentopelágicos	10	3.91	8.08 ± 14.73	2.14 ± 2.41	31.25 ± 34.98	125.26±152.76	164.59 ± 188.21
Demersales	10	3.36	20.07 ± 30.66	2.75 ± 3.07	40.34 ± 42.18	225.44±215.18	285.85 ± 258.22

¹Se presentan los datos de media ± DS de cada una de las muestras por triplicado

FIGURA 2

Acidos grasos totales n-3 y n-6 en de 25 pescados marinos mexicanos de acuerdo a su clasificación por el contenido de grasa en carne



±Std. Dev- = desviación estándar

±Std. Err. = error estándar

Mean = media

De los resultados de acuerdo a la clasificación biológica se observa, una mayor concentración de ALA, EPA y DHA en los pescados óseos con respecto a los cartilaginosos, esto está relacionado con el tipo de proteínas de las especies cartilaginosas que son más magras que las óseas (29).

En la clasificación de la distribución general (subtropical/tropical), se encontraron resultados semejantes en las concentraciones de EPA y DHA de las especies tropicales y subtropicales (Tabla 4), pero el contenido de ALA fue 4 veces más alto en las especies tropicales, debido probablemente al tipo de alimento que existe en estos lugares (30).

Por lo que respecta a la clasificación dada por su distribución geográfica (Golfo/Pacífico), las especies del Golfo presentaron mayor contenido de LT que las especies del Pacífico. Un comportamiento similar se observa con el C:18 de los pescados del Golfo que fue mayor que los del Pacífico. Sin embargo, el contenido de EPA y DHA fue menor en las especies del Golfo, por lo que pudiera sugerirse que las especies analizadas procedentes del Pacífico mexicano serían una mejor fuente de AG n-3 (Tabla 4).

De acuerdo a la clasificación por su distribución ecótica (Tabla 4), las especies pelágicas fueron más ricas en EPA y DHA que las bentopelágicas y demersales, lo cual se deba probablemente al tipo de alimentación (fitoplancton) a la que tienen acceso este tipo de peces en la columna de agua (30).

Las elevadas desviaciones estándar obtenidas (Tabla 4) se deben a que la clasificación engloba distintas especies, conformando grupos muy heterogéneos, que además dependen para su composición química de factores bióticos y abióticos (7, 23, 31); sin embargo, con estas clasificaciones se pretende

dar una visión general de aquellos grupos de pescados que pueden proporcionar valores más altos de ciertos compuestos nutraceuticos.

Evaluación de las especies como alimentos funcionales

Actualmente, no existe un consenso mundial sobre el contenido de ácidos grasos n-3 que se recomienda consumir diariamente para la obtención de los numerosos beneficios que éstos micro nutrientes proporcionan, sin embargo, y con base en los numerosos estudios clínicos que se han llevado a cabo en todo el mundo, algunos países sugieren los siguientes valores de consumo diario de EPA+DHA: Estados Unidos 0.65 g/día, el Comité de Aspectos Médicos y Política Alimenticia de Canadá sugiere 0.20 g/día, el Reino Unido propone que el 0.50% de la energía consumida provenga del EPA y DHA combinados; los japoneses recomiendan una importante ingesta de DHA para mujeres embarazadas (0.50 g de DHA/día) para mejorar el desarrollo pre y postnatal, así como para evitar el nacimiento de niños prematuros (7).

A continuación se enlistan aquellas especies de las 25 analizadas en el presente estudio y que presentaron un contenido total de EPA + DHA (g/100g filete) mayor a 0.20, que es el valor mínimo dado en las recomendaciones mundiales para la obtención de los beneficios que éstos ácidos grasos otorgan y por lo cual son considerados como compuestos nutraceuticos: albacora (1.30), bagre (0.37), besugo (0.23), cintilla (0.22), cojinuda (0.53), jorobado (0.81), pámpano (0.27), peto (0.63), sierra (0.60), trucha marina (0.61) y villajaiba (0.22).

Si se toma en cuenta que algunos suplementos derivados de aceites marinos encapsulados contienen 0.30 g de EPA + DHA (7) y así son considerados como nutraceuticos (17,18), tenemos entonces que la mayoría de las especies antes mencionadas sobrepasan estos niveles, por lo cual se pueden entonces considerar como alimentos funcionales.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se concluye, que de las especies analizadas, los pescados óseos, grasos y pelágicos presentaron un contenido mayor de EPA + DHA, independientemente de su distribución general y geográfica. Por otro lado y dada la cantidad de EPA + DHA cuantificada, el 44% de las especies analizadas se pueden considerar como alimentos funcionales, ya que éstas se encontraron en los intervalos de las recomendaciones mundiales dadas por diferentes países. Es muy importante no olvidar que estas conclusiones se plantean para las especies analizadas bajo determinadas condiciones bióticas y abióticas y que el patrón general del contenido lipídico de los pescados está fuertemente relacionado e influenciado por los lípidos de la dieta, la zona geográfica, la época del año, su ubicación en la columna de agua y por fe-

nómenos climatológicos como “El Niño “ y “La Niña” (31).

Actualmente, cierto nivel de la población mexicana se ha interesado en los suplementos alimenticios de aceites de pescado, dejando a un lado el consumo de cualesquiera de las numerosas especies mexicanas ricas en ácidos grasos n-3, ya que hasta el momento se desconocía la cantidad e importancia de los ácidos grasos de estos pescados, lo cual, por lo mismo les confiere un papel como alimento funcional, además del valor nutritivo ya conocido. Sin embargo, un alimento funcional, independientemente de su contenido nutraceutico, será útil siempre y cuando su consumo sea regular y dentro de una dieta equilibrada.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de los señores Blanca Gutierrez Ambriz y Roberto Gutierrez así como del Lic. Carlos Arteaga de la Soc. Nal. de Introdutores y Distribuidores de Pescados y Mariscos de la Cd. de México, por la materia prima y el apoyo otorgado durante la realización del presente estudio. De manera muy especial agradecemos la colaboración del Dr. José Luis Castro-Aguirre del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-IPN, eminente ictiólogo mexicano quien amablemente colaboró en la identificación de algunas de las especies, además de proporcionarnos información muy importante.

REFERENCIAS

- Avila CA, Shamah T, Chávez A. Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México 1994-95. Subdirección General de Nutrición de Comunidad. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. 1995
- Avila CA, Shamah T, Chávez A, Galindo GC. Encuesta Urbana de Alimentación y Nutrición en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México 2002. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. (En prensa).
- Avila CA, Shamah T, Chávez A. Encuesta Nacional de Alimentación y Nutrición en el Medio Rural 1996. Subdirección General de Nutrición de Comunidad. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. 1997
- Ruíz DMF. Recursos pesqueros de las costas de México. México (México): Limusa; 1993.
- Simopoulos AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999;70:560s-569s.
- Simopoulos AP. Symposium: Role of poultry products in enriching the human diet with n-3 PUFA. Human requirement for n-3 of polyunsaturated fatty acids. *Poultry Sci* 2000;79:961-970.
- Castro-González MI. Ácidos grasos omega 3: Beneficios y Fuentes. *Interciencia* 2002;27(3):128-136.
- Lemaitre NR, King BI, Mozaffarian D, Kuller HL, Tracy PR, Siscovick D. N-3 polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and non fatal myocardial infarction in older adults: the cardiovascular health study. *Am J Clin Nutr*;2003; 77:319-25.
- Harris WS. n-3 Long- chain polyunsaturated fatty acids reduce risk of coronary heart disease death: extending the evidence to the elderly. *Am J Clin Nutr* 2003;77:279-80.
- Cleland L, James M, Proudman S. The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs* 2003; 63 (9):845-53.
- Terry P, Rohan TE, Wolk A, Maehle-Schmidt M, Magnusson C. Fish consumption and breast cancer risk. *Nutr Cancer* 2002; 44(1):1-6.
- Hu FB, Cho E, Rexrode KM, Albert CM, Manson JE. Fish and long-chain omega-3 fatty acid intake and risk of coronary Herat disease and totalmortality in diabetic women. *Circulation* 2003, 107 (14):1852-7.
- Cerkauskiene R, Kaminskas A, Kaltenis P, Vitkus D. Influence of omega-3 fatty acids on lipid metabolism in children with steroid sensitive nephritic syndrome. *Medicina (Kaunas)* 2003; 39 Suppl 1:87-7.
- Tully AM, Roche HM, Doyle R, Fallon C, Bruce I, Lawlor B, Coakley D, Gibney MJ. Low serum cholesteryl ester-docosahexaenoic acid levels in Alzheimer's disease: a case-control study. *Br J Nutr* Apr 2003; 89(4):483-9.
- Colin A, Reggers J, Castronovo V, Anseau M. Lipids, depression and suicide. *Encephale* 2003. 29(Pt 1):49-58.
- Chen WJ, Yeh SL. Effects of fish oil in parental nutrition. *Nutrition* 2003; 19(3):275-9.
- Wildman CER. Handbook of Nutraceuticals and Funcional Foods. U.S.A.: CRC Press. 2001.
- Roberfroid MB. Concepts and strategy of funcional food science: The European perspective. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(6):1664-1669.
- Shibamoto T, Terao J, Osawa T. Functional Food for Disease Prevention. Washington (DC):American Chemical Society;1998.
- Secretaría de Economía. Informe de producción de pescado en México del Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. Informe anual. [publicación periódica en línea] 2002. Se consigue en <http://www.sniim.gob.mx>.
- Pérez C. Técnicas de muestreo estadístico. Teoría, práctica y aplicaciones informáticas. España.: Alfaomega- Rama, 2000.
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International . 17th Edition, 1st Revision, 2002.
- Castro GMI, Montañó BS, PerezGil RF. Ácidos grasos del atún de diferentes zonas pesqueras del Pacífico mexicano, en aceite y agua. *Arch Lat Nutr* 2001;51(4):407-413.
- Hubbard WD, Sheppard AJ, Newrick DR, Osgood T. Comparison of various methods for the extraction of total lipids, fatty acids, cholesterol and other sterols from food products. *J Am Oil Chem Soc* 1997;54:81-83.
- Hair FJ, Anderson ER, Tatham LR, Black CW. Analisis Multivariante. Madrid (España): Prentice Hall, 2000.
- StatSoft, Inc. Statistica for Windows (Computer program Manual). Tulsa, OK: StatSoft Inc., 2325 East 13th Street, Tulsa OK 74104, (918) 583-41-49, Fax: (918)583-4376. 1995.
- Muñoz CM, Ledesma SJA, Chavez VA, Pérez-Gil RF, Mendoza ME, Calvo C, Castro GMI, Sánchez CC, Avila CA. Los Alimentos y sus Nutrientes. Tablas de Valor Nutritivo de

- Alimentos. México (México): McGraw-Hil Interamericana;2002.
28. Haard NF. Compositon and Nutritive Value of Fish Proteins. En: Ruiter A, editor. Fish and fishery products. United Kingdom: Cab International;1995. p.77-115.
 29. Pigott MG, Turker WB. Seafood Effects of Technology on Nutrition. Marcel Dekker. New York, U.S.A.;1990.
 30. Bone Q, Marshall NB, Blaxter JHS. Biology of Fishes. New York (USA). Blackie Academic & Professiona; 1997.
 31. Love M. The Chemical Biology of Fishes. Vol. 2. New York (USA). Academic Press; 1980.

Recibido: 05-10-2003

Aceptado: 21-06-2004

Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible *Monostroma undulatum*, Wittrock

Adriana Alicia Gallardo, Susana Risso, María Angélica Fajardo, Silvia Estevao Belchior

Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Patagonia San Juan Bosco. Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina

RESUMEN. Se evaluó la calidad microbiológica del alga *Monostroma undulatum*, Wittrock que se desarrolla en la costa patagónica, para el consumo humano y se analizó la diversidad y el rol de la población bacteriana que la coloniza naturalmente. Las muestras de algas fueron recolectadas en las costas de Puerto Deseado Provincia de Santa Cruz, Patagonia Argentina (47° 45' L.S., 65° 55' L.O.). Se investigaron bacterias heterótrofas psicrótrofas, heterótrofas marinas, bacterias de bajo requerimiento nutricional (BBRN), bacterias de bajo requerimiento nutricional marinas (BBRN marinas), Vibrios sp, coliformes totales, coliformes termotolerantes, bacterias anaerobias sulfito reductoras de esporas, hongos y levaduras. Se seleccionaron cepas que fueron caracterizadas de acuerdo a su morfología, tinción de Gram, fisiología y metabolismo. Las mismas se identificaron presuntivamente como: *Vibrio* (20%), *E. coli inactiva* (18%), *Flavobacterium* (11%), *Flexibacter* (9%), *Moraxella* (9%), grupo *Alcaligenes/Pseudomonas* (9%), *Aeromonas* (2%), *Acinetobacter* (2%), *Cotophaga* (2%), *Photobacterium* (2%), grupo *Ps/Caulobacter/Alteromonas/Spirillum* (2%). Entre los microorganismos Gram positivos se destacó el género *Staphylococcus*. Entre las cepas estudiadas, no se detectaron especies patógenas para el hombre. En algas frescas como así también en el agua de mar, no se detectó la presencia de microorganismos indicadores de contaminación fecal. Estos resultados indicarían una calidad microbiológica del alga aceptable para la alimentación humana. La población bacteriana asociada a *Monostroma undulatum* estuvo compuesta principalmente por microorganismos Gram negativos, psicrótrofos, marinos y comprendió una gran variedad de géneros, predominando los vibrios y las enterobacterias. Asimismo las bacterias identificadas presentaron una gran capacidad de hidrolizar diferentes sustratos y así podrían contribuir en la cadena trófica marina de este ecosistema marino al que pertenecen las algas.

Palabras clave: Recurso alimenticio, poblaciones microbianas, *Monostroma undulatum*.

INTRODUCCION

Las algas son utilizadas como potencial recurso para el consumo humano (1,2). En países orientales como Japón, China y Corea se adicionan como ingredientes en distintas preparaciones culinarias, por ejemplo el Ao Nori que es una mezcla de algas verdes compuesta por *Ulva*, *Enteromorpha* y

SUMMARY. Characterization of microbial population present in the edible seaweed, *Monostroma undulatum*, Wittrock. The microbiological quality of *Monostroma undulatum*, Wittrock from the Southern Argentinean coast, was studied for its application for human food. Also the diversity and function of the native bacterial population to this green seaweed was analyzed. Samples were collected in Puerto Deseado, province of Santa Cruz, Southern Argentina (47° 45' L.S., 65° 55' L.W). The samples were analyzed for the presence of psychotrophic heterotrophic bacteria, marine heterotrophic bacteria, low nutritional request bacteria (LNRB), marine low nutritional request bacteria (LNRB marine), *Vibrio* spp, total and thermotolerant coliform bacteria, anaerobic sulfite reducing bacteria, yeasts and moulds. The isolates were identified using standard techniques based on morphologic, physiologic and metabolic characteristics. Among the gram-negative bacteria isolated, the predominant genera belonged to *Vibrio* (20%), *E. coli inactiva* (18%), *Flavobacterium* (11%), *Flexibacter* (9%), *Moraxella* (9%), *Alcaligenes/Pseudomonas* group (9%), *Aeromonas* (2%), *Acinetobacter* (2%), *Cotophaga* (2%), *Photobacterium* (2%), *Ps/Caulobacter/Alteromonas/Spirillum* group (2). The main genus of gram-positive bacteria was *Staphylococcus*. Human pathogenic bacteria were not detected. Fecal contamination indicator bacteria were not isolated from fresh seaweed and seawater. These results showed an adequate microbiological quality of seaweed acceptable for human food. The bacterial population associated to *Monostroma undulatum*, consisted of gram-negative, marine and psychotrophic microorganisms, including vibrios and enterobacteria as their main components. Also the identified bacteria showed a great capacity to hydrolyze different substrates and so they might contribute to the balance of this marine ecosystem.

Key words: Nutritional resource, microbial population, *Monostroma undulatum*.

Monostroma (2,3).

Desde el punto de vista nutricional, las algas son apreciadas por su composición química rica en proteínas, minerales, vitaminas, hidratos de carbono y fibra dietaria (4). Actualmente han sido consideradas a nivel mundial como una fuente importante de nutrientes esenciales, siendo creciente su incorporación en las dietas occidentales (1,5).

Entre las algas que tienen potencial aprovechamiento económico para la industria alimenticia se encuentran las pertenecientes al género *Monostroma* presentada por la especie *undulatum* (4). La misma se desarrolla en el mesolitoral marítimo de la Patagonia Argentina y su distribución geográfica es amplia, abarca desde Bahía Camarones hasta Tierra de Fuego (4). Teniendo en cuenta, su abundancia en las costas patagónicas, su potencial valor económico y su contenido en nutrientes se han considerado como un recurso alimenticio que debiera ser explotado (4). Esta especie se podría consumir en fresco, en tortillas o molida seca como condimento.

Además las algas marinas tienen una importancia fundamental como alimento natural para los organismos acuáticos explotados por el hombre, incluyendo peces y bivalvos. Las mismas son colonizadas por bacterias procedentes del ambiente marino donde se desarrollan. Estos micronichos, participan activamente de la degradación de las algas mediante la acción de enzimas hidrolíticas (6). Por este motivo, constituyen un eslabón importante en la cadena trófica, no solo por su participación en la degradación de la materia orgánica y liberación de los elementos minerales, sino también por su participación en los ciclos del carbono y del nitrógeno en los ecosistemas marinos (7). La microbiología marina sufre constantes modificaciones en función de la propia evolución de la degradación de la materia orgánica (7).

Actualmente no se ha publicado información sobre la microbiología de este recurso, por ello se plantearon como objetivos, (i) evaluar la calidad microbiológica del alga verde *Monostroma undulatum* para el consumo humano y (ii) estudiar la biodiversidad, en base a las características fisiológicas y metabólicas, de la población bacteriana que coloniza naturalmente a la microalga.

MATERIAL Y METODOS

Descripción de alga

Monostroma undulatum es un alga verde (*Chlorophyta*), se presenta como talos laminares de textura sedosa que se une a la restinga rocosa mediante un grampón. Esta forma corresponde a la fase macroscópica del alga, tiene un aspecto similar a la lechuga y se desarrolla en los meses de primavera. Al final de este período se observa un cambio de textura, se diferencia en tejido fértil, transformándose en una masa mucosa de color verde brillante, con liberación de zoospora. Este proceso conduce a la desintegración de alga, desde el borde externo de la lámina hacia el centro, culminando con la aparente desaparición cuando pasa totalmente a la fase microscópica (8).

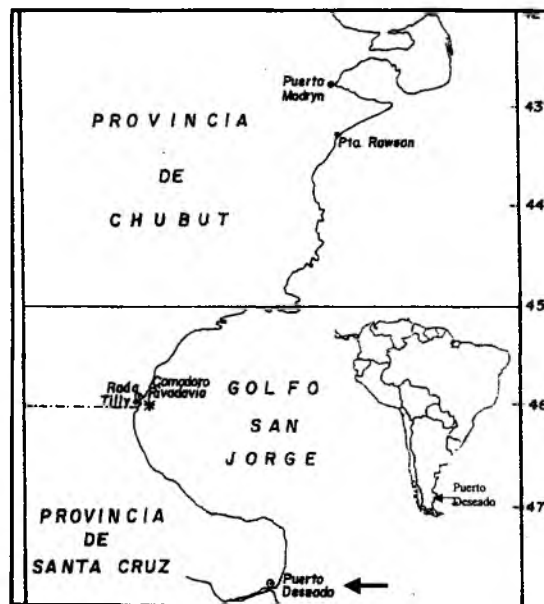
Lugar del muestreo

Las muestras se extrajeron manualmente del sustrato rocoso del intermareal de Puerto Deseado, provincia de Santa Cruz,

Argentina (47° 45' L.S., 65° 55' L.O.), donde se encuentra la colonia más importante de algas de la Patagonia Argentina (Figura 1).

El período de muestreo comprendió el mes de noviembre del 2000 y los meses de octubre y noviembre del 2001.

FIGURA 1
Ubicación geográfica del sitio de muestreo



Toma de muestra

Se recolectaron al azar y en forma manual muestras de algas frescas de *Monostroma undulatum*, las mismas se recogieron en bolsas de polietileno asépticas. Simultáneamente, se registraron los datos de temperatura y pH en el agua de mar y se recolectaron muestras superficiales en recipientes estériles, para análisis bacteriológico.

Para el procedimiento las muestras fueron trasladadas al laboratorio de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (Comodoro Rivadavia, provincia de Chubut), en condiciones de refrigeración (4-8°C). Las algas se analizaron dentro de las 24 h, desde su cosecha.

Procesamiento de las muestras

En el laboratorio se procedió a la separación de unidades muestrales de 10g de algas. Cada una de ellas se colocó en un recipiente de vidrio, conteniendo como diluyente agua de mar adicionada con 0,1% de peptona de carne, esterilizada. Se homogeneizó durante un minuto con una trituradora de cuchillas de acero inoxidable, previamente desinfectada con alcohol al 70%.

Posteriormente se efectuaron diluciones seriadas con agua de mar estéril (1/10 y 1/100) u se realizaron las siembras para recuentos.

Recuentos bacterianos, método de siembra e incubación

Se realizaron recuentos para bacterias heterótrofas psicrótrofas y mesófilas, heterótrofas marinas, bacterias de bajos requerimientos nutricionales (B.B.R.N.), bacterias de bajos requerimientos nutricionales marinas (B.B.R.N. marinas), *Vibrios* sp, hongos y levaduras, utilizando el método estándar de diseminación en superficie (9,10).

Para coliformes totales, coliformes fecales se empleó el método de recuento de número más probable (N.M.P) (10).

Bacterias heterótrofas psicrótrofas y mesófila: en agar para recuento en placa (g/lt: peptona de caseína 5,0; extracto de levadura 2,5; D (+) glucosa 1,0; agar-agar 14,0-pH 7,0 + 0,1) se incubó a 22°C y 35°C respectivamente, durante 4 días.

Bacterias heterótrofas marinas: en agar Zobell (g/100 ml: peptona de carne 0,5; agar 0,3; agua de mar filtrada 75 ml; agua destilada 25 ml-pH 7,5) a 22°C, durante 4 días.

Bacterias de bajos requerimientos nutricionales (B.B.R.N.). Se utilizó agar R2A (g/lt: extracto de levadura 0,5; peptona proteasa 0,5; casamino ácido 0,5; glucosa 0,5; almidón 0,5; piruvato de sodio 0,3; K₂PO₄H 0,3; MgSO₄·7H₂O 5,0; agar-agar 14,0-pH 7), se incubó a 22°C durante un período de 4 días.

Bacterias de bajos requerimientos nutricionales marinas (B.B.R.N. marinas): se sembró en agar R2A adicionados con 2% de NaCl, se incubó a 22°C, durante un período de 4 días.

Vibrios sp, en agar tiosulfato, citrato bilis, sacarosa (TCBS), a 22°C, durante 48 horas.

Coliformes totales y termotolerantes: en caldo Mc. Conkey, a 37,5 y 44,5°C respectivamente durante 48 horas.

Hongos y levaduras: en agar Sabouraud a 30°C, durante 7 días.

Bacterias anaerobias sulfito reductoras formadoras de esporas: se realizaron recuentos en medio diferencial para clostridios (DRCM), con agregado de un 0,3% de agar, distribuidos en tubos con 9 ml y esterilizados. Una vez sembrados los medios con 1 ml de homogeneizado de la muestra y de diluciones sucesivas, se colocaron durante 30 minutos a 70°C y posteriormente se incubaron durante 7 días a 35°C.

Expresión de los resultados y análisis estadístico

Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias (u.f.c) y en número más probable (N.M.P), por gramo de alga.

Para el análisis, los datos se transformaron a logaritmo en base a 10. Los mismos fueron expresados como promedio ± desviación estándar. Para evaluar las diferencias entre los promedios de los recuentos de los distintos grupos bacterianos, se utilizaron el método de Kruskal-Wallis y el de comparaciones múltiples de Dunn's como prueba post-test (11).

Análisis bacteriológico del agua de mar

Los parámetros bacteriológicos examinados fueron: coliformes totales, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Enterococcus* sp. y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). El análisis se realizó según las técnicas normalizadas (9).

Caracterización fenotípica

De los distintos grupos bacterianos se selecciono al azar colonias morfológicamente diferentes y se registraron sus características distintivas (morfología, tamaño, pigmentos, consistencia). Las cepas se purificaron mediante el método de siembra por estrías en placas de agar ZoBell, y se repicaron en pico de flauta del mismo medio.

Las mismas fueron identificadas presuntivamente hasta género de acuerdo al esquema para bacterias marinas descrito por Oliver (12) y el manual Bergey's (13). Para la clasificación de las cepas se seleccionaron distintas pruebas (Figura 2) para determinar las características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y de sensibilidad de antimicrobianos según se detalla a continuación (14,15).

FIGURA 2

Pruebas realizadas para caracterizar las cepas aisladas

-
- A) Morfología
- Forma bacteriana
 - Tinción de Gram
 - Movilidad
 - Pigmentación
- B) Fisiología
- Características térmicas
 - Tolerancia a distintos valores de pH
 - Requerimientos salinos
- C) Bioquímica
- Prueba de oxidación-fermentación (Medio O/F glucosa)
 - Producción de Índol
 - Ferm Gluc-Lac/Sac-Producción de gas y SH₂
 - Presencia de enzimas: catalasa, oxidasa, DNAasa, gelatinasa, amilasa, lipasa, caseínasa, agarasa, lecitinasa, hemolisina
 - Producción de pigmentos: melánicos, piorrubina, fluoresceína/piocianina
 - Crecimiento en medio de citrato de Simmons
 - Reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻
 - Denitrificación
 - Fermentación de manitol
- D) Sensibilidad a antimicrobianos
- Penicilina (10U)
 - Polimixina B (300U)
 - Vibriostático O/129 (150 µg)
-

Gluc: glucosa, Lac: lactosa, Sac: sacarosa.

Tinción de Gram; movilidad en medio SIM adicionado con 2% de NaCl; requerimiento de O₂ en medio tiolglicolato adicionado con 2% de NaCl.

La tolerancia a distintas concentraciones de NaCl, fue ensayada en agar ZoBell preparado con agua destilada, variando el porcentaje de NaCl en el medio a las concentraciones 0%, 0,5%, 1%, 3%, 5%, 7% y 10%. Cada una de las cepas fue sembrada e incubada a 22°C por 48 horas, luego se registró la presencia o ausencia de desarrollo bacteriano en la placa. Se descartaron a los 15 días de incubación.

Se evaluó el crecimiento a distintas temperaturas de cada cepa, sembrándolas en agar ZoBell e incubándolas a las siguientes temperaturas: 4°C, 7°C, 22°C, 30°C, 37°C, 42°C, por período de 7 días.

El desarrollo a distintos valores de pH se realizó en caldo Zobell y el gradiente de pH ensayado fue: 5,6,7,8,9. La incubación se realizó en todos los casos a 22°C por 48 a 72 horas. Luego se registró la presencia o ausencia de desarrollo, por la turbidez en el caldo.

Las cepas fueron analizadas con el fin de determinar sus características metabólicas y lograr una identificación presuntiva al nivel de género. Para ello se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: prueba de oxidación-fermentación (OF), oxidas, prueba catalasa, indol, reducción de nitrato, producción de enzimas: DNAasa, amilasa, lipasa, caseinasa, gelatinasa, agarasa, lecitinasa, ureasa, hemolisina, predicción de pigmentos: melánicos, piorrubina, fluoresceína/piocianina.

Se ensayó la susceptibilidad al agente vibriostático O/129 (150 µg), y a los antibióticos penicilina (monodiscos de 10U)

y polimixina B (monodiscos de 300U).

Los medios de cultivo se prepararon siguiendo la metodología estándar (14,15), siendo modificados por la adición de NaCl en una concentración de 2% (p/v).

Las pruebas de identificación se incubaron a la temperatura ambiente (22-25°C) por 48 horas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Recuentos bacterianos en agua de mar y en algas frescas

En el agua de mar, en el sitio donde se cosechó el alga *Monostroma undulatum*, se registraron temperaturas entre 8-9°C y valores promedios de pH y salinidad de 8,6 y 33,2g/l respectivamente. El análisis bacteriológico, no reveló la presencia de coliformes totales ni termotolerantes en ninguna de las muestras analizadas. Solamente, en una de las misma se detectó la presencia de *Enterococcus sp.* Con un valor de 2 N.M.P. por 100 mil. En concordancia con lo informado por otros autores en zonas cercanas a los sitios de muestreo de este trabajo (16), los resultados se hallaron por debajo de los límites establecidos por normas internacionales (17) para su uso con fines recreacionales, pesca, navegación y vida acuática.

Los recuentos de los distintos grupos bacterianos que se encontraron naturalmente asociados a las algas, recolectadas durante los dos años de muestreo, se presentan en la Tabla 1 (expresados como promedios). Para el tratamiento los datos fueron transformados a logaritmo en base 10 (log).

No se obtuvo desarrollo de coliformes totales, termotolerantes, *Escherichia coli*, hongos, levaduras y bacterias anaerobias sulfito reductoras formadoras de esporas.

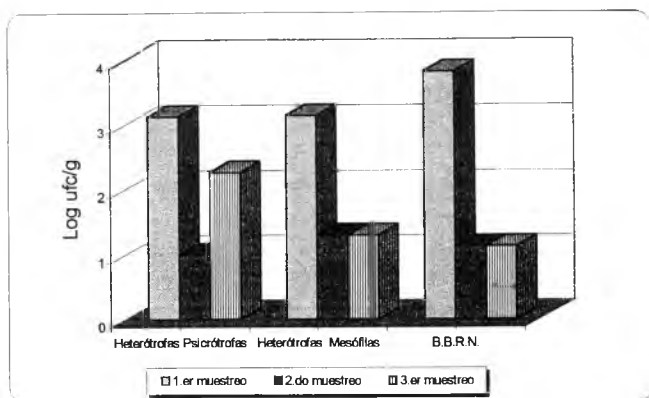
TABLA 1
Valores promedios de recuentos bacterianos (expresados en log de u.f.c./g ± desviación estándar)

Fecha	psicrótrofa	Heterótrofas		B.B.R.N.*	B.B.R.N.** marina	<i>Vibrios sp.</i>
		mesófilas	marinas			
			Condiciones de incubación			
	22°C-96 h	37°C-96h	22°C-96h	22°C-96h	22°C-96h	22°C-48h
Primer muestreo (noviembre 2000)	3,14±1,24	3,14±1,22	3,92±0,39	3,82±0,57	3,94±0,21	3,06±0,41
Segundo muestreo (octubre 2001)	1±0	1,3±0,40	4,04±0,41	1,13±0,41	No determinado	2,97±0,86
Tercer muestreo (noviembre 2001)	2,27±0,80	1,3±0,40	4,56±0,42	1,13±0,41	3,32±0,79	2,74±0,72
Promedio total (n=30)	2,13±1,07	1,9±1,06	4,17±0,34	2,02±1,55	3,63±0,44	2,92±0,16

n: número de muestras procesadas, (*) B.B.R.N: bacterias de bajos requerimientos nutricionales (aisladas en R2A), (**) B.B.R.N. marinas: aisladas en R2A con 2% de NaCl.

Estadísticamente se demostró que los recuentos de bacterias psicrótrofas, mesófilas y B.B.R.N., resultaron significativamente mayores ($p < 0,05$) en la primera campaña de muestreo a comparación de los obtenidos en los dos siguientes. En la Figura 3 se puede observar las diferencias entre los promedios de los recuentos bacterianos obtenidos en las tres campañas de muestreo realizadas. Este resultado podría ser consecuencia de la acción de una variedad de factores no controlables como por ejemplo: la afluencia de aves, diferencia en los horarios de bajar, la incidencia directa de vientos, que de acuerdo al período de exposición de las algas podrían favorecer la desecación de este ecosistema durante las horas de bajar, provocando situaciones de stress bacteriano con bajos recuentos.

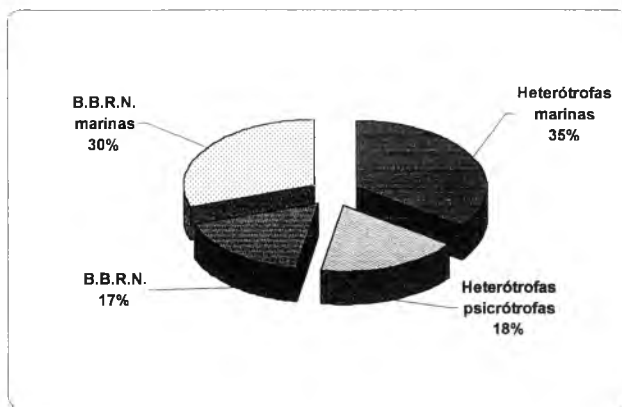
FIGURA 3
Promedios de recuentos bacterianos



Por otra parte, en el aislamiento de los microorganismos influyen variables que dependen de las características del medio de cultivo utilizado inicialmente (la salinidad, el pH y la presencia de compuestos que cubran los requerimientos nutricionales de distintos tipos de bacterias) y de las condiciones de incubación (atmósfera, tiempo y temperatura) (18). La distribución en porcentaje (%) de los distintos grupos bacterianos se presentó en la Figura 4. En la misma se observó el predominio de las bacterias marinas, tanto heterótrofas como las de bajo requerimientos nutricionales (B.B.R.N. que desarrollaron en R2A adicionado con NaCl). Estadísticamente, se comprobaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los recuentos de ambos tipos de bacterias marinas y sus homólogos que desarrollaron en medios sin NaCl.

Por el contrario, al comparar los resultados entre los recuentos de bacterias que desarrollaron en medios nutricionales diferentes (heterótrofas psicrótrofas y B.B.R.N. desarrollados en R2A) no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). Por lo tanto, la concentración de los nutrientes del medio no sería un factor tan influyente como la salinidad, para lograr una mayor recuperación de los microorganismos autóctonos asociados a esta macroalga.

FIGURA 4
Distribución en porcentaje de las distintas poblaciones bacterianas aisladas: heterótrofas psicrótrofas, heterótrofas psicrótrofas marinas, B.B.R.N. y B.B.R.N. marinas



Caracterización fenotípica de las cepas estudiadas

Se seleccionaron y estudiaron 55 cepas aisladas en los distintos medios de cultivo. Las colonias se caracterizaron en general por ser circulares con bordes lisos y elevadas con un tamaño de 2 a 3 mm y de aspecto mucoso. En menor número, se aislaron colonias medianas, planas con bordes irregulares, rugosas y consistencia friable y otras grandes y extendidas sobre la superficie del agar.

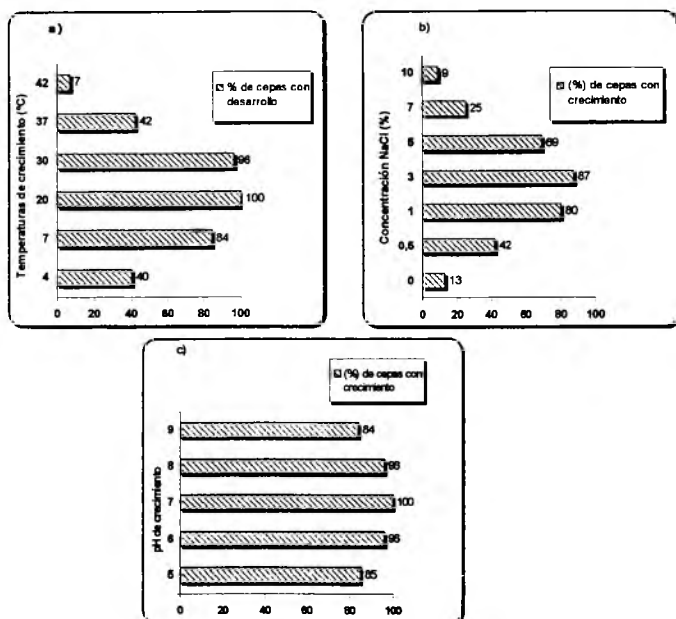
El 49% de las colonias seleccionadas manifestaron la producción de pigmentos de distintas gamas de colores rojos, anaranjados y amarillos. La síntesis de pigmentos es usual en bacterias que se desarrollan en ambientes acuáticos. Estos actúan en forma protectora frente a la acción fotodinámica de la luz solar, a la que suelen estar expuestos principalmente aquellos microorganismos que permanecen en la superficie (19).

Con respecto a la morfología bacteriana se destacó la dominancia de bacilos Gram negativo (89%). Las restantes resultaron bacilos y cocos no agrupados Gram positivos. Este resultado se correlacionó con estudios previos realizados por otros investigadores (19-24), que demostraron que el 90% de la biota de los ecosistemas acuáticos se compone mayormente de bacterias Gram negativas. Estos últimos, mantienen ligadas a su pared celular y/o excretan numerosas enzimas hidrolíticas y por ello son capaces de digerir sustratos exógenos rápidamente. En cambio, los Gram positivos son competidores pobres por los nutrientes en ecosistemas marinos fríos y desarrollan, preferentemente, en hábitat donde existe una alta concentración de materia orgánica como por ejemplo en los sedimentos marinos (7).

Los resultados de los ensayos realizados, para evaluar el crecimiento de cada una de las cepas, bajo diferentes condiciones de temperaturas, pH y salinidad se registraron en la Figura 5.

FIGURA 5

Distribución de las 55 cepas analizadas según el crecimiento de diferentes (a) temperaturas, (b) concentraciones de NaCl y (c) pH, (expresado en porcentaje)



Con respecto al desarrollo a distintas temperaturas, los microorganismos estudiados desarrollaron en mayor porcentaje entre 7 y 30°C, correspondiéndose por ello con el grupo térmico de bacteria psicrótrofos (Figura 5 a). Según Morita (25) las bacterias psicrótrofos pueden desarrollar de 0 a 5°C y hasta temperaturas superiores a 30°C, exhibiendo un crecimiento óptimo a temperaturas mayores a 15°C. A 37°C solamente desarrollo el 42% de las cepas y a 42°C el crecimiento fue muy reducido (7%). Esto podría atribuirse a que en los microorganismos psicrótrofos, que han adaptado su metabolismo para poder sobrevivir y desarrollar en ambiente fríos, las temperaturas superiores a 30°C provocan alteraciones como por ejemplo: desorganización intracelular con inactivación de enzimas o complejos enzimáticos, la aceleración del uso del pool de aminoácidos, el incremento de la saturación de lípidos y/o la pérdida de la permeabilidad de la pared celular. Estos cambios conducen a la lisis bacteriana inducida térmicamente (19,25).

Con respecto a los requerimientos salinos, la población en estudio podría clasificarse como bacterias marinas, según el criterio establecido en Stainer y cols. (26), debido a que el 87% de las cepas mostraron requerimientos salinos para su desarrollo y en su mayoría (64%) crecieron en un rango de concentraciones de NaCl entre 1% y 5%. Solamente, un reducido porcentaje (13%) desarrolló en ausencia de la sal, indi-

cando que este grupo, probablemente, serían bacterias del tipo terrestre adaptadas al ambiente marino (26). EL 25% y 9% de las bacterias toleraron hasta concentraciones del 7% y 10% de NaCl, respectivamente (Figura 5 b).

Cuando el Na⁺, fue reemplazado por K⁺, desarrollaron un alto porcentaje de cepas (67%). El rol fisiológico del sodio aún no está bien claro, este ión sería necesario para la estabilidad de las membranas, actividad enzimática, transporte activo y el funcionamiento de una bomba de sodio que está acoplada a la cadena respiratoria (27). Se ha postulado que las bacterias marinas no requieren exclusivamente sodio para su desarrollo, sino también cloruros, bromuros y otros iones (7).

En relación con las variaciones de pH del medio de cultivo, los microorganismo desarrollaron en el rango comprendido entre valores 5 y 9, con un óptimo entre 6 y 8 (Figura 5 c). Este resultado podría ser atribuido a la habilidad de las bacterias marinas a adaptarse a distintas condiciones ambientales de pH (24),

Conforme a los resultados obtenidos de los ensayos de crecimiento a distintas temperaturas, pH y concentraciones de salinas, entre el 80% y 90% de las cepas seleccionadas, autóctonas de algas frescas *Monostroma undulatum*, estarían fisiológicamente adaptadas a las condiciones ambientales del ecosistema acuático de procedencia, donde la temperatura media es de 9°C, la salinidad media de 3,3 % (p/v) y el pH 8,6.

Entre las cepas seleccionadas, de los diferentes medios de cultivo, se destacaron los microorganismos Gram negativos anaerobios facultativos (69%).

El 60% de las cepas mostró la capacidad de reducir nitratos a nitritos. Este resultado podría estar indicando la participación de estos microorganismos en el ciclo del nitrógeno. Sin embargo la capacidad de desnitrificación, fue francamente baja. La producción de nitritos unida a la ausencia de desnitrificación, sugeriría que otros microorganismos no aerobios o no heterótrofos, posiblemente sean los responsables del consumo de nitritos que continuaría con el ciclo del nitrógeno (28).

En la Tabla 2 se indican los porcentajes de resultados positivos de las pruebas metabólicas realizadas.

Las cepas estudiadas en este trabajo, mostraron la capacidad de sintetizar un variado espectro enzimático: ureasa, proteasa (gelatinasa y caseínasa), lipasa, lecitinasa, hemolisina y otras enzimas capaces de degradar macromoléculas como agar, polisacáridos de reserva (almidón) y DNA. La síntesis y liberación de enzimas hidrolíticas bacterianas resulta ser ventajosa para el micronicho al que pertenecen dichas bacterias marinas. Esto es debido a que todos los organismos que lo conforman se benefician utilizando los productos de hidrólisis de las enzimas, que liberan al medio las bacterias marinas (6).

Sobre la base de las pruebas de identificación realizadas,

la caracterización en géneros de las cepas seleccionadas fue dificultosa. Las determinaciones bioquímicas y fisiológicas deberían complementarse con la información que proveen los métodos moleculares que se utilizan en estudios filogenéticos de las poblaciones marinas, como por ejemplo el análisis de secuencias de 16S rDNA (29,30).

TABLA 2
Distribución porcentual en función de las de características fenotípicas de las cepas

Pruebas	Porcentajes de cepas positivas (N=55)	Pruebas	Porcentajes de cepas positivas (N=55)
Gram negativo	89	Indol	27
Gram positivo	11	ADNasa	40
Movilidad	49	Ureasa	7
Catalasa	91	Agarasa	11
Oxidasa	49	Gelatinasa	74
Red. de NO ₃	60	Caseína	67
Desnitrificación	2	Lecitinasa	71
Catabolismo glucosa		Amilasa	65
Fermentativo	42	Lipasa	38
Oxidativo	11	Hemolisina	49
Inerte	47	Pigmentos melánicos	34
Producción H ₂ S	11	Otros pigmentos	9

Si bien existen algunos esquemas taxonómicos para identificar los microorganismos aislados de ecosistemas marinos (12), se han clasificado nuevos géneros y especies en este ambiente (31-33) que solamente pueden diferenciarse mediante métodos moleculares. Por ello, los resultados se informaron como identificación presuntiva.

De acuerdo al esquema propuesto por Oliver (12) y a criterios de diferenciación bioquímica entre géneros propuestos en el Manual Bergey's (13), los géneros identificados fueron: **Vibrio sp.* caracterizados en base a las pruebas de identificación, la sensibilidad al agente vibriostático O/129 y desarrollo en agar T.C.B.S. Las cepas fermentadoras de glucosa, oxidasa positiva, que desarrollaron en T.C.B.S. y fueron sensibles al agente O/129, se evaluaron bioquímicamente para diferenciarlas de especies de *Vibrio* de importancia clínica. Para ello se consideraron los resultados de las pruebas de fermentación de lactosa, sacarosa y manitol, rojo de metilo, Vorges-Proskauer, reducción de nitritos, producción de indol, hidrólisis de urea, producción de lisina decarboxilasa, ornitina decarboxilasa, arginina dihidrolasa, lipasa, gelatinasa, amilasa y DNasa, pruebas de halofiliismo, desarrollo a distintas temperaturas y producción de pigmentos. De acuerdo a los resultados obtenidos no se estableció relación con especies de *Vibrio* patógenas para el hombre. Por ese motivo, estas cepas fueron clasificadas presuntivamente como *Vibrio sp.*

Enterobacterias, en segundo término de importancia, identificadas como *Escherichia coli* inactiva debido a la incapacidad de fermentar la lactosa y/o hacerlo en forma retardada (prueba de β-galactosidasa +), inmovilidad y por no producir gas por fermentación de hidratos de carbono. *Además, se identificó un bajo porcentaje de cepas compatibles con los géneros *Aeromonas* y *Photobacterium*. **** Las cepas restantes (no fermentadoras), mostraron una amplia distribución de géneros. Las mismas se identificaron presuntivamente como: *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Moraxella*, *Citophaga*, *Acinetobacter*, grupo *Alcaligenes/Pseudomonas (Ps)*, grupo *Xanthomonas/Flavobacterium*, grupo *Pseudomonas/Caulobacter/Alteromonas* y *Spirillum*.

Estos géneros fueron recuperados como miembros de distintos nichos marinos por otros investigadores y se especializan en la degradación de macromoléculas muy complejas (30,34,35).

Los porcentajes de prevalencia de organismos compatibles con cada género se detallaron en la Tabla 3.

TABLA 3
Géneros presuntivamente identificados (expresado en porcentajes)

Géneros	(%) de cepas (N=55)
Bacilos Gram negativos	
<i>Vibrios</i>	20
<i>Escherichia</i>	18
<i>Flavobacterium</i>	11
<i>Flexibacter</i>	9
<i>Moraxella</i>	9
Grupo <i>Alcaligenes/Pseudomonas (Ps)*</i>	9
<i>Citophaga</i>	2
<i>Photobacterium</i>	2
<i>Aeromonas</i>	2
<i>Acinetobacter</i>	4
Grupo <i>Xanthomonas/Flavobacterium*</i>	2
Grupo <i>Ps/Caulobacter/Alteromonas/Spirillum*</i>	2
Gram positivos	
<i>Staphylococcus</i>	7
Bacilos no identificados	3

* En estos grupos se encuentran cepas de características fenotípicas compartidas entre los géneros.

CONCLUSIONES

Los análisis bacteriológicos del agua de mar y de las algas frescas demostraron que la especie *Monostroma undulatum*, obtenida en las costa de Puerto Deseado (Provincia de Santa Cruz), podría considerarse de buena calidad microbiológica

para el consumo humano y su hábitat natural sería bacteriológicamente propicio para su desarrollo.

La población bacteriana autóctona de *Monostroma undulatum* se caracterizó por un amplio predominio de bacilos Gram negativos con requerimientos salinos para poder desarrollar. Crecieron dentro del rango de temperatura de los microorganismos psicrótrofos. Presentaron gran versatilidad para multiplicarse tanto a valores de pH levemente ácidos como alcalinos. Las características fisiológicas de las bacterias se relacionan con las condiciones ambientales del ecosistema de procedencia.

En la población bacteriana estudiada se destacó un amplio potencial hidrolítico de macromoléculas, sugiriendo que podrían contribuir en la cadena trófica marina de este ecosistema.

Si bien se identificó una amplia variedad de géneros, predominaron los *Vibrios sp.* y enterobacterias. Entre las cepas pertenecientes a ambos géneros no se detectaron especies patógenas para el hombre.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración en este trabajo al técnico de laboratorio de la Facultad de Ciencias Naturales de la U.N.P.S.J.B. Emilio Escobar.

REFERENCIAS

- Camilo Domínguez S, Casas Valdez M, Ramos Ramos F, Pérez-Gil F, Sánchez Rodríguez I. Algas marinas de Baja California S, México: Valor Nutricional. Arch Latinoamer Nutr. 2002;52:400-405.
- Segovia Alfaro D. Una novedosa alternativa alimenticia. Énfasis alimentación. 2003;4:90-94.
- McHugh DJ (ed). Production and utilization of products from commercial seaweeds. Fao Fish Tech Pap. 1987;288:158-161.
- Risso SJ, Escudero CA, Estevao Belchior S, Portela ML, Fajardo MA. Contenido en algunos nutrientes del alga marina comestible *Monostroma undulatum*, Wittrock, de la costa patagónica. Arch Latinoamer Nutr. 2003;53:306-311.
- Jiménez-Escrig A y Goñi Cambrón I. Evaluación nutricional y efectos fisiológicos de microalgas marinas comestibles. Arch Latinoamer Nutr. 1999;49:114-120.
- Albertson N, Nyström T and Kjellberg S. Exoprotease Activity of Two Marine Bacteria during Starvation. Appl Environ Microbiol. 1990;49:114-120.
- Dawes CJ. Marine Botany. Edited by Wiley J. & sons, Inc. New York, U.S.A. 1981;23-55,587-607.
- Boraso AL. Reproducción de Ulvales de Puerto Deseado (provincia de Santa Cruz, República Argentina) II *Monostroma undulatum* Wittrock. Phycis sec A. 1977;36:1-7.
- APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the examination of water and wastewater. Franson MA. (ed), American Public Health Assoc., Washington, D.C. 1994.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (I.C.M. S.F.). Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológicos, (Vol. I). Acirbia, Zaragoza, España 1980.
- Dowson-Saunders B y Trapp R. Bioestadística médica. Ira. Ed, El manual moderno, México. 1994.
- Oliver J. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. Deep-sea Res. 1982;29:795-798.
- Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. Edited by N.R. Krieg and J.G. Holt. Williams and Wilkins Co., Baltimore. 1984.
- Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook, Vol. 1, sección 1. 19-1.20 y sección 5., American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1992.
- Smibert RM and Krieg RN. General characterization. In: Manual of methods for general bacteriology. Edited by Gerhardt P, Murray REG, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg RN and Phillips GB. American Society for Microbiology. Washington D.C. U.S.A., 1981;409-443.
- Estevez JL, Gil M, Commendatore M, Santinelli N, Sastre V, Solis M, Ocariz H y González Raies C. Evaluación de la contaminación urbana de la ría de Deseado (Prov. De Santa Cruz). Informe técnico del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica – Fundación Patagonia Natural (Puerto Madryn, Argentina). 1997;(36):1-1-50.
- Salas HJ. Historia y aplicación de normas microbiológicas de calidad de agua en el medio marino. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente (CEPIS). OPS-OMS. 2000. Hojas de divulgación técnica 29.
- Nickelson R and Finne G. Fish, crustaceans, and precooked seafoods. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2° ed. Edited by M. Speck. Am. Public. Health Assoc. Washington, D.C. 1984;573-589.
- Iañez Pareja E. En curso de microbiología general. 1998; <http://www.ucm.es/info/micro3/bact>.
- Bowman JP, McCammon S, Brown M, Nichols D and McMeekin T. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. Appl Environ Microbiol. 1997;63:3068-3078.
- Baumann L, Baumann P, Mandel M and Allen RD. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. J Bacteriol. 1972;110:402-429.
- Caria MA. Investigación de la flora bacteriana de peces marinos y la correlación con su ambiente. Incidencia de *Vibrio/beneckea spp.* En flora bacteriana intestinal. Rev Museo Arg Ccias Nat. B. Rivadavia. 1981;313:317.
- Elena B y Monticelli L. Estudio taxonómico y ecológico de las bacterias marinas de la Antártica. Publ Com Téc Mix Fr Mar. 1998;17:97-106.
- Estevao Belchior SG. Actividad Proteolítica de Bacterias psicrótrofas y/o psicrófilas aisladas de muestras de merluza (*Merluccius Hubbsi*). Tesis doctoral de la Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de la Patagonia San Juan Bosco. 2003.
- Morita R. Psychrophilic Bacteria. Bacterial Rev. 1975;39:144-167.
- Stainer RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. In: Microbiología. Ed. Reverté S.A., Barcelona, España. 1988;218-219.

27. Oh S, Kogure K, Ohwada K and Simidu U. Correlation between possession of a respiration-dependent Na⁺ pump and Na⁺ requirement for growth of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57:1844-1846.
28. Caria MA y Casellas JM. Bacterias marinas heterótrofas aerobias aisladas del Mar Argentino. I. Distribución y grupos fisiológicos. *Asociación Argentina de Microbiología.* 1971;3:36-45.
29. Feller G, Narinx E, Arpigny JL, Aittaleb M, Baise E, Genicot S and Gerdy Ch. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol Rev.* 1996;18:189-202.
30. Lobet-Brossa E, Rosselló-Mora R and Amann R. Microbial community composition of wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64:2691-2696.
31. Gauthier MJ, Lafay B, Christen R, Fernandez L, Acquaviva M, Bonin P and Bertrand JC. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. Nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol.* 1992;42:568-576.
32. Holmström C, James S, Neilan B, White D and Kjelleberg S. *Pseudoalteromonas tunicate* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48:1205-1212.
33. Sawabe T, Makino H, Tatsumi M, Nakano K, Tajima K, Mahbub Iqbal M, Yumoto I, Ezura Y and Christen R. *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp nov., a marine bacterium that is the causative agent of red disease of *Laminaria japonica*. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48:769-774.
34. Monticelli L y Costagliola M. Estudio bacteriológico de la merluza (*Merluccius hubbsi*) capturada en la zona común de pesca Argentino-Uruguay y de su ambiente. *Publ Com Téc Mex Fr Mar.* 1989;5:87-94.
35. Tejero A, Esteves E, Vallespinos F. Estudios bacteriológicos de la zona de afloramiento del NW de Africa (Campaña Atlor VII) I. Técnicas de identificación taxonómica y resultados. *Res Exp Cient B/O Comide.* 1978;7:59-76.

Recibido:21-01-2004

Aceptado: 14-06-2004

Mineral content of the honey produced in Zulia state. Venezuela

Betzabé Sulbarán de Ferrer, Graciela Ojeda de Rodríguez, Jorge Peña, Janeth Martínez y María Morán

Laboratorio de Alimentos. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

SUMMARY. The mineral content of the honey produced in five zones of the Zulia state, Venezuela, during dry and rainy seasons was determined. The analyzed elements were: sodium, potassium (by emission spectroscopy), calcium, magnesium, copper, iron, manganese (by atomic absorption spectroscopy), phosphorus (phosphate ions, by colorimetric method), and ash content of raw honey samples directly collected from different beekeepers. The mean values for Na, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, and P were 353+84; 1774+138; 237+66; 52+24; 0.76+0.43; 13.5+10.23; 0.92+0.42 and 1642+323 mg/kg respectively. The mean ash content was 0.431+0.15%. Potassium was the most abundant of the elements determined. This results confirm that Zulian honey can be considered a good source of minerals.

Key words: Honey, mineral content, Zulia state, AAS.

RESUMEN. Contenido de minerales en las mieles producidas en el estado Zulia. Venezuela. El contenido mineral de la miel producida en cinco zonas del estado Zulia, Venezuela, durante las estaciones de sequía y de lluvia, fue determinado. Los elementos analizados en las muestras de miel cruda, recogidas directamente de varios apicultores fueron: sodio, potasio (por espectroscopía de emisión), calcio, magnesio, cobre, hierro, manganeso (por espectroscopía de absorción atómica), fósforo (iones de fosfato, determinado por colorimetría). Los valores promedios para el Na, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn y P fueron: 353+84; 1774+138; 237+66; 52+24; 0,76+0,43; 13,5+10,23; 0,92+0,42 y 1642+323 mg/kg respectivamente. El contenido promedio de cenizas fue de 0,431+0,15%. El contenido de potasio fue el mas abundante de los elementos determinados. Estos resultados confirman que las mieles producidas en el estado Zulia pueden ser consideradas una buena fuente de minerales.

Palabras clave: Miel, contenido mineral, estado Zulia, absorción atómica.

INTRODUCTION

The Zulia state is a region of 63.355 km². It is located in the north-western part of Venezuela, surrounded by the Venezuelan gulf on its north side. The total annual precipitation exceeds 501.7 mm. The average temperature is 28.5°C during the year.

The greatest part of the honey comes from the dry and wet tropical forests, where *Citrullus vulgaris*, *Curcubita maxima*, *Achras sapota*, *Passiflora sp*, *Annona muricata*, and *Persea americana* are the predominant species. Honey annual production, year 2001, in Venezuela was 296 ton. (1).

Mineral content in honey has been widely studied in several countries: Spain, Saudi Arabia, Poland and Italy (2-5). There are some profiles of components which could probably be used for the detection of the geographical origin (e.g. aroma compounds, oligosaccharides, amino acids, minerals and trace elements, etc.), as well as an indication of environmental pollution (minerals and trace elements), and the combination of methods could be an approach to prove authentic. (4, 6, 7).

Previous research (8) has been made to establish the mineral content of honey in ten of the twenty two Venezuelan states, but the mineral content has not been studied in the Zulia state, the North-west part of the country. Therefore, the objective of this work was to determine this parameter in Zulian honeys.

MATERIALS AND METHODS

Samples

The samples were 30 raw, strained, liquid honeys collected from different beekeepers in five zones of the Zulia state, during dry and rainy seasons, in the North-western region of Venezuela. See Figure 1.

Ash determination

The ash content was determined by heating 10 g of honey until sample was completely black. Foaming was prevented by adding a few drops of olive oil, and calcination was obtained at 600°C. This method is suggested in the Venezuelan regulations for honey quality (9).

Mineral analysis

Solutions containing sodium, potassium, calcium, magnesium, copper, iron, and manganese, were obtained by dis-

solution of the ash in 10 ml of hydrochloric acid (0.1 N) and subsequent dilution to 100 ml with distilled water. The analyzed elements were: sodium, potassium (by emission spectroscopy), calcium, magnesium, copper, iron, manganese (by atomic absorption spectroscopy), using a Perkin Elmer 3110 equipment (Table 1). Phosphorus (phosphate ions) was determined by measuring the yellow color developed by the reaction in acid medium of phosphates with molybdate-vanadate reagent at 465 nm (AOAC, 1980). All determinations were made by triplicates.

FIGURE 1

Zulia State map. North-west region of Venezuela



TABLE 1

Standard operation conditions for spectroscopy analysis

Minerals	Flame	λ nm	Standard, ppm
Ca	Air-acetilene	422.7	500
Mg	Air-acetilene	285.2	1000
Na	Air-acetilene	589.0	1000
K	Air-acetilene	766.5	1000
Fe	Air-acetilene	248.3	1000
Cu	Air-acetilene	324.8	1000
Mn	Air-acetilene	279.5	1000

RESULTS AND DISCUSSION

Data from results of the seven minerals determined in honey samples are summarized in Table 2. The variability of results for all minerals is large, reflecting the wide variation in the composition of honey samples. The ash content is near the maximum value (0.5%) established for Venezuelan standard (11), which is lower than Italian and Saudi Arabian standards (12,13). Honey normally has low ash content and this value depends on the floral type used by bees during foraging (3).

Table 2
Mineral content (mg/kg) and ash content (g/100g) of the Zulian honeys

Minerals	Number of samples	Mean	Range	S.D.	C.V.
Na	30	353	155-444	84	0.24
K	30	1774	379-5071	138	0.78
Ca	30	237	144-367	66	0.28
Mg	30	52	26-120	24	0.47
Cu	30	0.76	0.3-1.67	0.43	0.57
Fe	30	13.5	3.5-39.0	10.23	0.76
Mn	30	0.92	0.4-1.84	0.42	0.46
P	30	1642	1304-2274	323	0.20
Ash	30	0.431	0.352-0.643	0.15	0.46

S.D.: Standard deviation, C.V.: Coefficient of variation

The ash content for Zulian honey was similar to the one reported for north-west Spanish honey (14), but higher than the value reported for honeys from Molise, Italy (12), Anatolia (15), Saudi Arabia (13), and south-east Spain (16).

Mineral content in Zulian honey turned out to be, in decreasing order: K, P, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, and Cu, most of them are similar to that reported for central and eastern regions of Venezuela: K, Ca, Mg, Na, Mn, Fe, and Cu (8).

Potassium, represents 41% of the total ash content, being the most abundant mineral determined in this work; the mean content of 1774mg/kg is twelve times higher than that reported for honey from central and eastern regions of Venezuela (8). Saudi Arabian honey (13) also has potassium as the highest constituent of the ash content, although K reported value is five times lower than K in Zulian honey. Other works in honey from north-west Spain (Galicia) and from south-eastern Anatolia (14, 15) reported K values around 12% and 83%, respectively, which were lower than the value obtained in this work.

The next most abundant mineral was phosphorus with a mean value of 1642 mg/kg, this value is lower than the minimum value reported for Saudi Arabian honey (13150 – 3080 mg/kg) (3).

Sodium, calcium and iron content were higher than the values reported in the literature, while copper and manganese content were lower (3, 13- 16).

Magnesium content was similar to the one reported for Saudi Arabian honey (3); it was lower than the one reported for north-west Spanish honey (14), and higher than that for Anatolian honey (15). The results obtained in this work show that the Zulian honey can be considered a good source of minerals.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank the Universidad del Zulia and its Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) for its financial support.

REFERENCES

- Instituto de Comercio Exterior de Venezuela. Resumen Anual. Ministerio de Fomento, República Bolivariana de Venezuela. 2001; pp 224-225.
- Pérez-Arquillue C, Conchello P, Ariño A, Juan T and Herrera A. Quality evaluation of Spanish rosemary (*Rosmarinus officinalis*) honey. *Food Chem.* 1994; 51:207-210.
- Abu-Tarboush H, Al-Kahyani A, and El-Sarrage M. Floral type identification and quality evaluation of some honey types. *Food Chem.* 46. 1993; 13-17.
- Przybylowski P, and Wilcznska A. Honey as environmental marker. *Food Chem.* 2001;74:289-291.
- Buldini P, Cavali s, Mevoli A and Sharma J. Ion chromatographic and voltametric determination of heavy and transition metals in honey. *Food Chem.* 2001;73:487-495.
- González A, Gómez A, García-Villanova R, Rivas T, Ardanuy R, and Sánchez J. Geographical discrimination of honey by using mineral composition and common chemical parameters. *J. Sci. Food and Agric.* 2000; 80(1):157-165.
- Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* 1998;63:549-562.
- Vit P, Rios A, Novoa M, Reinosa J, and Carmargo J. Antibacterial activity and mineral content of Venezuelan stingless bee honeys. Proceedings of the Fifth International Conference on Tropical Climates. Brazil. 1994; 254-258.
- COVENIN 2136-84. Comisión Venezolana de Normas Industriales: Miel de abejas, métodos de ensayo. Caracas. Venezuela. 1984.
- AOAC (1990). Official Methods of Analysis (15 th edn), ed. K. Helrich. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, VA. USA.
- COVENIN 2191-84. Comisión Venezolana de Normas Industriales: Miel de abejas. Caracas. Venezuela. 1984.
- Esti M, Panfili G, Marconl E and Trivisono M. Valorization of the honeys from Molise region through physico-chemical, organoleptic and nutritional assessment. *Food Chem.* 1997. 58:125-128.
- Mesalam A and El-Shaarawy M Quality attributes of honey in Saudi Arabia. *Food Chem.* 1987; 25:1-11.
- Rodríguez-Otero J, Paseiro P, Simal J and Cepeda A. Mineral content of the honeys produced in Galicia (North – West Spain). *Food Chem.* 1994; 49: 169 -171.
- Yilmaz H and Yavuz O. Content of some trace metals in honey from South – eastern Anatolia. *Food Chem.* 1999; 65: 475 – 476.
- Martínez M, Guerra E, Mintilla J and Minils J. Physicochemical analysis of Spanish commercial *Eucalyptus* honeys. *J Apic Res.* 1993; 32(3/4):121-126.

Recibido:17-12-2003

Acceptado:21-06-2004

Caracterização química parcial e bioquímica de sementes de *Bauhinia forficata* link

Rozilaine A.P.G. Faria¹, Manoel Andrade-Neto¹, Luciano Silva Pinto², Rolando Rivas Castellón⁴,
Juan J. Calvete³ & Benildo Sousa Cavada⁴

Depto. de Química Orgânica e Inorgânica Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE¹, Depto. Botânica Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS², Instituto de Biomedicina de Valencia, Valencia – España³, BioMol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil⁴

RESUMO. Sementes quiescentes de *Bauhinia forficata* foram submetidas à caracterização bioquímica por meio de análise de ácidos graxos, fracionamento de proteínas e atividade hemaglutinante específica. A análise elementar da semente mostrou grande quantidade de proteína total e de lipídeos com 21,24 % e 19,45%, respectivamente. Na fração lipídica, o ácido linoléico foi o mais abundante com 46,47%. Com exceção das prolaminas, as diferentes frações protéicas (albuminas, globulinas, glutelinas ácidas e básicas) apresentaram atividade hemaglutinante contra hemácias de coelho tratadas e não tratadas com enzimas proteolíticas. A maior atividade hemaglutinante específica foi evidenciada na fração glutelinas ácidas (1.072,25 U.H./mg P) contra sangue de coelho tratado com tripsina. Os aminoácidos presentes em maior teor foram glutamina (16,20%) e valina (11,07%). Assim, por apresentarem alto valor energético as sementes de *Bauhinia forficata* são uma possível fonte opcional na alimentação.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata*, nutrição humana, ácidos graxos, proteínas,

SUMMARY. Biochemical and chemical partial characterization of *Bauhinia forficata* Link seeds. Seeds of *Bauhinia forficata* species were submitted to biochemical characterization concerning fatty acids analysis, protein fractionization, and hemagglutinating activity. The seed elementary analysis showed a high protein and lipids contents with 21.24 % and 19.45 % respectively. The more abundant fatty acid was linoleic acid with 46.47 % of the lipidic fraction. With the exception of prolamins, the different proteic fractions (albumin, globulins, acid and basic glutelins) showed hemagglutinating activity against rabbit red cells no treated and treated with proteolytic enzymes. The fraction acid glutelin showed the higher specific hemagglutinating activity (1072.25 UH/mg P) against rabbit blood pre-treated with trypsin. Glutamin (16.20%) and Valin (11.07%) were the more abundant amino acids in the seeds. Therefore, *B. forficata* represent a possible optional source of food because exhibit a high energetic values.

Key words: *Bauhinia forficata*, human nutrition, fatty acids, proteins.

INTRODUÇÃO

O táxon *Bauhinia* (família Leguminosae) compreende em torno de 300 espécies nativas dos trópicos e subtropicais, sendo que no Brasil 250 espécies nativas já foram catalogadas (1). Algumas destas espécies são muito utilizadas para fins ornamentais, como a *B. variegata* devido à beleza das flores (2), enquanto outras são muito utilizadas como hipoglicemiantes destacando-se *B. forficata* (3) e *B. retusa* (4). A maioria das espécies deste táxon são conhecidas popularmente como pata-de-vaca devido à morfologia de suas folhas. Existem vários estudos que relatam as propriedades medicinais de diferentes espécies do gênero *Bauhinia*, destacando-se as atividades depurativas, diuréticas, antiinflamatórias e hipocolesterolêmica (4-6). Atualmente, além dos estudos fitoquímicos e farmacológicos, alguns trabalhos estão sendo realizados no sentido de viabilizar as sementes dessas espécies como fontes alternativas de proteínas (7). Legumes e cereais são a base na dieta de toda sociedade,

mas a presença de fatores antinutricionais (polifenóis, lectinas, ácido fítico, grupos cianogênicos, inibidores de proteases, alcalóides e toxinas) limita o emprego de várias espécies de leguminosas na alimentação (8, 9). A necessidade de obtenção de fontes protéicas de baixo custo tem dirigido a pesquisa na busca de novas espécies vegetais alternativas que possam suprir estas deficiências, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Porém, não basta apenas disponibilizar essas fontes protéicas sem antes realizar os estudos da presença de fatores antinutricionais bem como análise de toxicidade (10). Em algumas regiões da Índia são consumidas sementes de *Bauhinia* sp. tanto *in natura* quanto cozidas (11). Outros legumes selvagens também são consumidos, mas poucos estudos foram realizados para avaliar a qualidade protéica das sementes (12). O primeiro estudo realizado sobre a qualidade nutricional das sementes de *Bauhinia* foi realizado por Walters (13). Neste estudo, o autor analisou o teor de água, lipídeos, proteínas, carboidratos, fibras e cinzas em *B. articulata*. Alguns fatores antinutricionais, como

lectinas, freqüentemente são encontrados em sementes, porém podem se localizar em diferentes partes do vegetal, como raiz, caule e folha (14). As cascas de *Bauhinia* são ricas em taninos que se mostram como fatores antinutricionais como indicado por Prasad & Gupta (15) em ensaio de inibição da atividade das enzimas protopectinase e poligalacturonase. Para combater o ácido fítico, polifenóis e os inibidores de tripsina, Sindhu & Khetarpaul (9) sugerem além do aquecimento, a utilização da fermentação desses alimentos, ressaltando assim o valor nutritivo do grão, uma vez que o ácido fítico apresenta uma certa estabilidade ao calor. O presente trabalho objetivou realizar a caracterização química e bioquímica da composição da farinha da semente de *B. forficata*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Sementes maduras de *Bauhinia forficata* foram coletadas no maciço de Baturité-CE. As sementes foram trituradas mecanicamente em moinho elétricas tipo Wiley (acoplado com peneira de 60 mesh) obtendo-se a farinha para as diferentes análises.

Lipídios e ácidos graxos

O extrato lipídico total foi obtido por extrações sucessivas com N-Hexano e posteriormente o teor de ácidos graxos foi determinado segundo a técnica modificada de Matos (16), realizada em triplicatas de aproximadamente 2,0 gramas do extrato lipídico dissolvida em 60 ml de solução etanólica de KOH 0,6 N. A mistura reacional foi deixada em refluxo por 6 horas, acrescentado 20 ml de água destilada e extraída a matéria insaponificável com n-hexano Merck p.a. e a fração aquosa foi reservada. O insaponificável foi lavado com água e seco com Na₂SO₄ anidro, filtrado e concentrado em rotavapor. A fração aquosa reservada foi acidificada com HCl p.a. até pH 2,0 e levada para funil de separação e lavada com n-hexano Merck p.a., obtendo-se assim os ácidos graxos livres que foram posteriormente metilados com diazometano para obtenção dos ésteres metílicos.

Proteínas solúveis

O teor de proteínas solúveis totais presentes nas diferentes frações protéicas da farinha de sementes de *B. forficata* foi determinado segundo o método descrito por Bradford (17) utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

Fracionamento de proteínas das sementes

A farinha das sementes de *B. forficata*, foram submetidas à extração e fracionamento de proteína de acordo com sua solubilidade (globulinas, prolaminas, albuminas, glutelinas ácidas e básicas) (18). Inicialmente, cinco gramas da farinha foram deixadas em contato com uma solução salina (NaCl

0,5 M) na proporção de 1:10 (m/v) com agitação constante durante 4 horas à temperatura ambiente. Este material foi centrifugado a 9.000 g por 10 minutos, filtrado em papel filtro e o sobrenadante dialisado contra água destilada por 48 horas e centrifugado. O novo sobrenadante obtido continha a fração de albumina e o precipitado, depois de ressuspenso em 15 mL de NaCl 0,5 M, constituiu a fração globulínica. Para a obtenção da fração protéica de prolaminas, o resíduo da extração inicial com NaCl 0,5 M foi submetido à extração com etanol 70% levado à agitação à temperatura ambiente por 1 hora. Após centrifugação, o sobrenadante continha as prolaminas e o novo resíduo foi submetido a extração com HCl 0,1 M por 1 hora e após a filtração, o sobrenadante foi dialisado por 48 horas para obtenção das glutelinas ácidas. O resíduo submetido a contato com NaOH 0,1 M por 1 hora foi centrifugado nas mesmas condições anteriores para a obtenção das glutelinas básicas. Alíquotas dessas frações protéicas foram utilizadas em ensaios de hemaglutinação e dosagem de proteínas antes de serem liofilizadas.

Ensaio de atividade hemaglutinante

A determinação da atividade hemaglutinante nos diferentes extratos protéicos foi realizada utilizando-se suspensões de hemácias de coelho a 2%, tratadas e não tratadas com enzimas proteolíticas (tripsina e papaína). O título de hemaglutinação, expresso em Unidades de Hemaglutinação (UH), foi determinado como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação visível a olho nu (19).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 pode-se observar os valores lipídicos totais (19,45%), estes são similares aos encontrados por Pant & Bishnoi (20) para *B. purpurea* com um teor de 16,58% de lipídeos. Na mesma tabela aparece o conteúdo de ácidos graxos da farinha das sementes de *B. forficata*, onde se destaca o alto valor de ácidos graxos insaturados (52,52%) sendo 46,47% correspondente ao ácido linoléico.

Sastri & Shenolikar (21) realizaram estudos do teor de ácidos graxos em sementes de *B. vahlii* encontrando para lipídeos totais teores de 29,9%, dos quais 31,0% correspondem ao ácido linoléico. Os autores citam a possibilidade de se utilizar às sementes como fonte protéica e de ácidos graxos insaturados. Dietas ricas em ácidos graxos saturados, principalmente os ácidos láurico, mirístico e palmítico, elevam o nível do colesterol no sangue aumentando o risco de doenças cardiovasculares, ao contrário dos ácidos graxos insaturados (ácidos oléico e linoléico), que reduzem o nível do colesterol no organismo (22). O teor de ácidos graxos insaturados (ácido linoléico-46,47%) também foi considerado satisfatório se comparado com o teor presente em óleo de milho (40%) e óleo de girassol (50-70%) (23). Vale ressaltar que o ácido

linoléico é um ácido graxo essencial para o homem e outros animais, ou seja, é necessária a sua incorporação na dieta alimentar. Este ácido graxo participa na formação de hormônios que atuam na transmissão de estímulos nervosos e na diminuição da pressão arterial (23).

TABELA 1
Teores de lipídeos e ácidos graxos na farinha de sementes de *Bauhinia forficata*

Fração lipídica na farinha	Teor (%)
Lipídeo totais	19,45
Ácido graxo	
Ácido linoléico*	46,47
Ácido palmítico	19,27
Ácido esteárico	13,89
Ácido oléico*	5,54
Ácido gordoico*	0,51

*ácidos graxos insaturados

Na Tabela 2 se observa o teor de proteínas solúveis totais (21,24%), o que foi similar ao encontrados em *B. acuminata* (22,3%) e inferior em comparação aos encontrados em *B. retusa* (52,8%) (13). Assim mesmo os valores de proteína total da farinha de *B. forficata* são aproximados daqueles (entre 21,6 e 24,7 %) encontrados por Castellón (24), trabalhando com 6 variedades melhoradas de *Vigna unguiculata* L Walp. Considerando que o teor de proteínas presentes em leguminosas é de 18-24% (exceto soja e amendoim)(23), esse valor pode ser considerado como fonte protéica satisfatória.

O teor das diferentes frações protéicas albuminas, globulinas, prolaminas, glutelinas ácidas e básicas das sementes de *B. forficata*, estão ilustrados na Tabela 2. Pode-se observar que as globulinas representam o maior teor na farinha (8,93%), este fato é uma tendência observada na grande maioria de sementes de leguminosas, sendo as globulinas a fração eu concentra a grande maioria das proteínas de reserva das sementes. As glutelinas básicas foram as que apresentaram o segundo valor com 6,69%.

TABELA 2
Teor de proteínas totais e solúveis das frações protéicas na farinha de sementes de *B. forficata*

Fração Protéica	Teor g/100g
Proteínas totais	21,24
Globulinas	8,93
Glutelinas Básicas	6,69
Prolaminas	2,62
Glutelinas Ácidas	1,61
Albuminas	1,39

A atividade hemaglutinante específica contra hemácia de coelho das diferentes frações protéicas da farinha de sementes de *Bauhinia forficata* foi analisada para determinação de possível presença de fator antinutricional. Os resultados encontrados podem ser observados na Tabela 3. Observa-se que todas as frações, com exceção das prolaminas apresentaram atividade hemaglutinante sendo mais efetiva em hemácias tratadas com tripsina.

Trabalhando com eritrócitos do sistema ABO humano, Rajaram & Jarnadhajan (25) encontraram atividade hemaglutinante específica na fração globulinas de *B. vahlii* contra sangue humano do grupo B. Nas frações albuminas e globulinas de *B. purpurea*, esses mesmos autores observaram atividade hemaglutinante contra todos os tipos sanguíneos humanos testados, mas não observaram o mesmo para as albuminas de *B. racemosa* quando testadas contra hemácias deste sistema.

Os resultados mostrados na Tabela 3 indicam que as glutelinas ácidas apresentaram a maior atividade hemaglutinante específica (1072,25 U.H./mg P) contra sangue de coelho tratado com tripsina. O fato da fração prolaminas não apresentar atividade hemaglutinante provavelmente se deva à ausência de lectinas ou a presença de algum inibidor (glicoconjugado endógeno) presente na semente.

TABELA 3
Atividade hemaglutinante específica nas diferentes frações protéicas da farinha de sementes de *B. forficata**

Fração	mg P (a)	mg P/g F (b)	U.H. (c)	U.H./g F (d)	U.H./mg P (e)
Albuminas	69,50	13,90	32	6,40	13,33
Globulinas	446,70	89,34	2048	409,60	13,75
Glutelina Ácida	80,30	16,06	2048	409,60	1072,25
Glutelinas Básicas	334,70	66,94	16	3,20	1,89
Prolaminas	131,10	26,22	S.A.	S.A.	S.A.

*Atividade contra hemácias de coelho; S.A. Sem atividade hemaglutinante; (a) quantidade obtida da proteína; (b) relação proteína obtida/quantidade da amostra; (c) Unidade hemaglutinante; (d) relação atividade hemaglutinante/quantidade amostra; (e) atividade hemaglutinante específica levando em consideração a concentração da proteína.

De acordo com a análise dos aminoácidos presentes nas frações protéicas, conforme Tabela 4, pode-se considerar as sementes de *B. forficata* como boa fonte dos aminoácidos essenciais valina (11,07%) e leucina (9,14%), se comparados com a carne de vaca, respectivamente 5,5% e 8,0% (25). O contrário se verifica com os aminoácidos sulfurados como

metionina (1,13%) e cisteína (0,87%) para as sementes analisadas e 3,2% e 1,2% respectivamente, para a carne de vaca. Estes aminoácidos são importantes porque entram no metabolismo da produção de energia muscular (valina e leucina) enquanto que a glutamina é necessária nas atividades cerebrais.

TABELA 4
Teor de aminoácidos nas diferentes frações protéicas obtidas de farinha de sementes de *B. forficata*

	Albuminas (% ηmol)	Globulinas (% ηmol)	Prolaminas (% ηmol)	Glutelinas Ácidas (% ηmol)	Glutelinas Básicas (% ηmol)
Asparagina	10,44	9,96	10,53	10,41	10,86
Glutamina	14,71	14,57	11,01	10,38	16,20
Prolina	12,26	11,95	12,41	11,00	9,45
Glicina	10,36	8,65	9,48	9,75	9,15
Valina ^(E)	9,33	9,64	11,07	7,80	9,07
Leucina ^(E)	7,59	9,14	8,72	8,31	9,00
Serina	7,28	5,93	6,85	6,55	6,94
Alanina	6,57	6,52	6,26	6,44	6,94
Treonina ^(E)	5,06	3,71	4,10	4,08	4,12
Isoleucina ^(E)	4,51	4,71	4,80	5,33	4,23
Lisina ^(E)	4,59	4,57	5,50	5,56	4,46
Fenilalanina ^(E)	2,14	2,49	2,28	1,91	2,36
Arginina ^(E*)	1,03	3,17	1,81	8,17	3,43
Histidina ^(E*)	1,74	2,40	1,81	1,88	1,83
Tirosina	0,55	1,00	1,58	1,10	1,11
Cisteína	0,87	0,45	0,82	0,70	0,35
Metionina ^(E)	0,95	1,13	0,94	0,63	0,84
Triptofano ^(E)	ND	ND	ND	ND	ND

(E): AA essenciais; (E*): AA essenciais para fase de crescimento; ND: não determinado

CONCLUSÕES

As sementes de *B. forficata* apresentam alto potencial nutricional visto que seus teores protéicos e lipídicos (principalmente ácidos graxos insaturados) estão dentro de níveis satisfatórios quando comparados com espécies vegetais de amplo uso na alimentação humana e/ou animal. Evidentemente estudos posteriores devem ser realizados com esta possível fonte alimentar, principalmente no que diz respeito a fatores tóxicos e antinutricionais.

Por outro lado à evidência da presença de lectinas nas frações protéicas sugerem o desenvolvimento de estudos para o isolamento e completa caracterização destas proteínas, bem como avaliação criteriosa das propriedades tóxicas e/ou antinutricionais das mesmas.

AGRADECIMENTOS

À FUNCAP pela bolsa de pesquisa e CNPq e CAPES pelos auxílios concedidos. BS Cavada é pesquisador do CNPq.

REFERÊNCIAS

1. Salatino A, Blatt CTT, Santos DYAC, Vaz AMSF. Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. Rev Bras Bot São Paulo, 1999; 22:17-20
2. Agarez FV, Pereira C, Rizzini CM. Botânica: taxonomia, morfologia e reprodução dos Angiospermae: chaves para determinação das famílias Angiospermae, 2ª ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda, 1994.
3. Panda S, Kar S. *Withania somnifera* and *Bauhinia purpurea* in the regulation of circulating thyroid hormone concentrations in female mice. J Ethnopharmacology, 1999; 67:233- 239.
4. Singh KN, Chandra V. Hypoglycaemic and hypocholesterolaemic effects of proteins of *Acacia milanoxydon* and *Bauhinia retusa* wild leguminous seeds in young albino rats. J Indian Medic Assoc, 1977; 68:201-203.
5. Costa OA. Estudo farmacológico da unha-de-vaca – *Bauhinia forficata* Link. Ver Flora Medicinal, 1945; 9: 175-189.
6. Iribarren AM, Pomilio AB. Components of *Bauhinia candicans* Benth. J Nat Prod., 1983; 46: 752-753.
7. Chowdhury AR, Banerji R, Misra G, nigam SK. Fatty acid and mineral composition of the seeds of some species of *Bauhinia*. Fette Seifen Anstrichm., 1984; 86: 237-239.

8. Salatino A. Química da folha de *Bauhinia holophylla* (Bongard) Steudel. Bol Bot Univ S. Paulo, 1977; 5: 43-52.
9. Sindhu SC, Khetarpaul N. Probiotic fermentation of indigenous food mixture: effect on antinutrients and digestibility of starch and protein. J Food Comp Analysis, 2001; 14: 601-609.
10. Prakash D, Misra PS. Amino acid composition of *Bauhinia* and *Cassia* seeds. Fitoterapia, 1983; 54: 257-260.
11. Prakash D, Niranjana A, Tewari SK, Pushpangadan P. Underutilised legumes: potential sources for low-cost protein. Internat J Food Sci Nutrition, 2001; 52: 337-341.
12. Kumari KV, Siddhuraju P, Janardhanan K. Chemical composition, amino acid content and protein quality of the little-known legume *Bauhinia purpurea* L. J Sci Food Agric., 1997; 73: 279-286.
13. Walters JAT. The carob bean (*Ceratonia siliqua*) in Rhodesia and other podbearing indigenous trees of value for stock feed. Rhodesia Agric J, 1924; 21: 567-572.
14. Nair GN, Das HR. Hemagglutinins in vegetative tissues of Bengal gram. Plant Foods Hum Nutrit., 2000; 55: 243-253.
15. Prasad V, Gupta SC. Inhibitory effect of bark and leaf decoctions on the activity of pectic enzymes of *Alternaria tenuis*. Indian J Exp Biol, 1967; 5: 192-193.
16. Matos FJA. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC, 1988, p. 126.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, New York, 1976; 72: 248-254.
18. Osborne TB. The vegetable proteins. 2.ed. London: Longmans Green and company, 1924. p.154.
19. Moreira RA, Perrone JC. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol, Maryland, 1977; 59: 783-787.
20. Pant R, Bishnoi PLO. Chemical composition of some wild Indian leguminous seeds. Curr Sci, 1967; 36: 365-367.
21. Sastri BVR, Shenolikar IS. Nutritive value of two unusual foods, adda (*Bauhinia vahlii*), and marking nut (*Semecarpus anacardium*) kernels. Indian J Med Res, 1974; 62: 1673-1677.
22. Robbers JE, Speedie MK, Tyler V. Farmacognosia e farmacobiocologia. São Paulo: Editorial Premier, 1997.
23. Laszlo H, Basso LM, Coelho CML. Química de alimentos: alteração dos componentes orgânicos. São Paulo: Liv. Nobel S.A., 1986, p.98.
24. Castellon RER. Caracterização Bioquímica de Sementes de 6 Variedades de Feijão de Corda *Vigna unguiculata* (L) Walp. Fortaleza: UFC, 1996. 78 p. Dissertação de Mestrado Apresentada no Curso de Agronomia/Fitotecnia, UFC.
25. Rajaran N, Janardhajan K. Chemical composition and nutritional potential of the Tribal Pulses *Bauhinia purpurea*, *B. racemosa* and *B. vahlii*. J Sci Food Agr, London, 1991; 55: 423-431.

Recibido: 05-03-2004

Aceptado: 28-06-2004

NOTAS NECROLOGICAS

EN HONOR DE CLIVE ERIC WEST, QUIEN CONTRIBUYO AL AVANCE DEL CONOCIMIENTO DE LA VITAMINA A Y OTROS MICRONUTRIENTES

CLIVE ERIC WEST, Ph.D, DSc falleció el 27 de agosto de 2004, en la ciudad de Wageningen, Holanda, un mes después de haber cumplido 65 años. El Dr. West era nativo de Australia, en donde recibió su educación universitaria en ciencias de la nutrición, con especialidad en nutrición animal, en la universidad de Sidney, y que luego complementó con dos doctorados en la universidad de New England en Armidale.

Dedicó los primeros años de su vida profesional a estudios del metabolismo intermediario, con énfasis en el colesterol circulante, en experimentos hechos con aves, cerdos, cabras, conejos y cuyos. Su interés por aplicar sus conocimientos en el mundo en desarrollo lo llevaron a establecerse en Nigeria en 1976. En 1979 se trasladó a Holanda, para incorporarse al Departamento de Nutrición de la que ahora se conoce como Universidad de Wageningen. Ahí, amplió su interés científico por la nutrición humana y su importancia en salud pública. Su trabajo lo hizo merecedor de ser designado en 1992 como Profesor Visitante del Programa en Contra de la Deficiencia de Micronutrientes (PAMM, por sus siglas en inglés) en la Escuela Rollins de Salud Pública de la Universidad de Emory, Atlanta, en los Estados Unidos. En el año 2000, fue nombrado Profesor de Nutrición en la Enfermedad en el Departamento de Gastroenterología de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica de Nijmegen en Holanda.

El Dr. West influyó en muchos profesionales del mundo en desarrollo, con quienes llevó a cabo investigaciones en las áreas de malaria, tuberculosis y xeroftalmía en humanos, y el virus Newcastle en aves. El Dr. West estudió la importancia de factores ambientales en el desarrollo y crecimiento fetal y la infancia. Sin embargo, sus principales contribuciones científicas las reservó a los cinco micronutrientes más importantes en salud pública (vitamina A, hierro, yodo, zinc y folatos), principalmente en aspectos relacionados con el diagnóstico y causas de su deficiencia, y con factores que afectan la biodisponibilidad de estos nutrientes en la dieta, alimentos fortificados y presentaciones farmacéuticas (suplementos).

En 1994, formó parte de los autores de un artículo publicado en *Lancet*, y titulado "Ausencia de mejoramiento del estado de vitamina A mediante el consumo de vegetales de hojas verde-oscuro" ["Lack of improvement in vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy

vegetables"], que despertó una gran polémica, ya que sus resultados discrepaban con las equivalencias nutricionales aceptadas hasta ese momento para la conversión de beta-caroteno y otros carotenoides a vitamina A (retinol). Después de varios años de discusión y estudios confirmatorios, las conclusiones de este estudio fueron aceptadas, y los factores de conversión quedaron establecidos en 12 microgramos de beta-caroteno o 24 microgramos de otros carotenoides pro-vitamina A, cuando ingeridos provenientes de alimentos vegetales, por cada microgramo de retinol. Sin embargo él siempre insistió que aún esos factores seguían siendo conservadores, ya que el metabolismo humano es muy ineficiente para extraer y absorber estos pigmentos presentes en las matrices vegetales.

Sin embargo, él y sus colaboradores también demostraron que estos pigmentos, cuando presentes en forma libre, si son fácilmente absorbidos y utilizables por el organismo humano. En un artículo publicado en la revista "American Journal of Clinical Nutrition" en el año 2001, titulado "Bioeficacia del beta-caroteno en base oleosa examinada en niños indonesios" ["Bioefficacy of beta-carotene dissolved in oil studied in children in Indonesia"], se presentó la evidencia de que el beta-caroteno aislado y disuelto en grasa tiene un factor de conversión de 2-3 microgramos por cada microgramo de vitamina A. Este descubrimiento también ayudó al establecimiento de la Ingesta Nutricional Recomendada (INR) de la vitamina A en sus diferentes formas dietéticas, por los organismos correspondientes de los Estados Unidos y Canadá, y de la FAO/OMS.

Aunque gran parte de su trabajo lo desarrolló en Africa y Asia, Latinoamérica también recibió su atención. Realizó estudios de lipoproteínas y ácidos grasos en la madre y el cordón umbilical de dos grupos raciales de Trinidad. Empero, su mayor contribución para este continente fue en la capacitación de profesionales. Entre sus estudiantes pueden mencionarse al Dr. Arturo Rodríguez-Ojeda, quien desarrolla investigación en la epidemiología de enfermedades crónicas en Cuba, y Jesús Bulux de Guatemala. También es importante mencionar su estrecha colaboración, desde 1985, con el Centro de Estudios en Sensoriopatías, Senectud e Impedimentos y Alteraciones Metabólicas (CESSIAM) en Guatemala. CESSIAM ha recibido a 17 estudiantes holandeses recomendados por el Dr. West, de los cuales once fueron para completar los requerimientos de investigación para la maestría. La mayor parte de los estudios se centraron en el mejoramiento del estado nutricional del niño lactante en respuesta a la

suplementación oral de la madre con vitamina A o yodo en aceite.

Finalmente, el Dr. Clive West influyó en el establecimiento y desarrollo de "Los Talleres de Liderazgo en Nutrición de Latinoamérica". El Dr. West heredó, del Prof. Jo Hautvast, la dirección de una iniciativa similar para Europa, y desde donde contribuyó a los talleres latinoamericanos realizados en Guatemala (1997), Argentina (2000) y México (2003).

El Prof. West formó parte del Comité Ejecutivo del Grupo Consultivo Internacional de Vitamina A (IVACG, por sus siglas en inglés), y del Cuerpo Editorial de la revista "Sight & Life", que está dedicada a la difusión de los aspectos de salud pública asociados con la vitamina A.

El Dr. West será recordado por su amabilidad, afabilidad y calor humano, su intenso interés por el entendimiento de las bases de la nutrición y la fisiología humana, y su dedicación por aplicar los conocimientos científicos en el beneficio de la salud pública de las poblaciones en el mundo en desarrollo. El será también un modelo para promover el entendimiento y colaboración entre las naciones y las culturas, al haber

favorecido a la capacitación de profesionales de países en desarrollo en técnicas sofisticadas existentes en los países industrializados, y motivado el interés de sus estudiantes holandeses por resolver problemas que enfrentan las sociedades de los países pobres.

El Dr. Clive West hubiera estado presente en la XII Reunión del IVACG en Lima, Perú, en noviembre de este año. Su ausencia física será muy notoria, pero él estará siempre presente a través de sus estudiantes y colaboradores, y los trabajos científicos de todos ellos. Todo esto será parte del merecido homenaje que recibirá en esta ciudad del continente americano.

Noel W. Solomons,
CESSIAM, Guatemala, Guatemala.

Omar Dary,
MOST/USAID, Arlington, Virginia, Estados Unidos.

INFORMACION PARA LOS AUTORES

En 1950 el Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela edita su revista Archivos Venezolanos de Nutrición la cual en 1965 es donada a la recién creada Sociedad Latinoamericana de Nutrición, SLAN, para convertirse en su órgano oficial de divulgación Archivos Latinoamericanos de Nutrición, ALAN.

ALAN acoge en sus páginas trabajos de revisión, editoriales, conferencias y simposia y trabajos científicos originales sobre temas relacionados con alimentación y nutrición, entre ellos, ciencia y tecnología de alimentos, nutrición humana y animal, bioquímica nutricional aplicada, nutrición clínica y comunitaria, educación en nutrición y microbiología de alimentos.

Todos los artículos que se publican pasan por un proceso de arbitraje externo. El Comité Editorial no se hace responsable de los conceptos emitidos en los artículos aceptados para ser publicados y ser reserva el derecho de no publicar los originales que no se ajusten a los lineamientos de la revista. No se devolverán originales ni se mantendrá correspondencia sobre aquellos que no sean publicados. ALAN se reserva los derechos de reproducción de los artículos seleccionados.

ALAN se acoge a las normas de los requisitos uniformes del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas (CIDRM), también conocido como el Grupo de Vancouver, en su quinta edición (1997) de los requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas (1). A continuación se reproduce esta publicación y se añaden algunas recomendaciones específicas, para ALAN.

Requisitos para la presentación de manuscritos a una revista

Resumen de los requisitos técnicos

- Todas las partes del manuscrito estarán a doble espacio.
- Cada sección o componente comenzará en página nueva.
- Revise la secuencia: página del título, resumen y palabras clave, texto agradecimientos, referencias, cuadros (cada uno en página aparte), pies e epígrafes de las ilustraciones.
- Las ilustraciones se presentaran en forma de impresiones fotográficas sin tomar, y no deberán exceder de 203 x 254 mm.
- Incluya la autorización para reproducir material publicado con anterioridad o para usar ilustraciones en las que se pueda identificar a los sujetos humanos.
- Adjunte la transferencia de los derechos de autor y otros formularios.
- Presente el número exigido de copias impresas del artículo (ALAN exige original y 3 copias).
- Guarde copias de todo lo que envíe.

Preparación del manuscrito

El texto de los artículos de observación y experimentales se divide generalmente, aunque no por fuerza, en secciones que llevan estos encabezamientos: introducción, métodos, resultados y discusión. En los artículos largos puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas secciones, sobre todo en las de resultados y discusión, a fin de hacer más claro el contenido. Es probable que otro tipo de artículos -como los informes de casos, las revisiones y los editoriales- exijan otra estructura. Para mayor orientación, los autores deberán consultar la revista en la que pretenden publicar.

Mecanografíese el manuscrito en papel bond blanco de 216 x 280 mm o de la medida estándar ISO A4 (212 x 297 mm), con márgenes de por lo menos 25mm (ALAN prefiere la medida de 216 x 280 mm). Escríbase o imprímase solamente sobre una cara del papel. Utilícese doble espacio a lo largo de todo el manuscrito, incluido la página del título, el resumen, el texto los agradecimientos, las referencias, cada uno de los cuadros y los pies o epígrafes de las ilustraciones. Numérense las páginas en forma consecutiva, empezando por las del título. Sobre el ángulo superior o inferior derecho de cada página anótese el número que le corresponde.

Página del título

La primera página contendrá: 1) el título del artículo, que será conciso pero informativo; 2) nombre de pila preferido y apellidos de cada autor, acompañados de sus grados académicos más importantes y su afiliación institucional; 3) nombre del departamento o departamentos y la institución o instituciones a los que se debe atribuir el trabajo; 4) declaraciones de descargo de responsabilidad, si las hay; 5) nombre y dirección del autor que se ocupará de la correspondencia relativa al manuscrito; 6) nombre y dirección del autor a quien se dirigirán las solicitudes de separatas, o nota informativa de que los autores no las proporcionarán; 7) procedencia del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo, medicamentos o todo ello; y 8) título abreviado (titulillo) que no pase de 40 pulsaciones (contando caracteres y espacios), el cual se colocará, debidamente identificado como tal, en la última línea de la página inicial.

Autoría

Todas las personas designadas como autores habrán de cumplir con ciertos requisitos para tener derecho a la autoría. Cada autor

(1) Requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas. Rev Panam Salud Pública. Pan-Am J Pub Health. 1998;3(3):188-1998.

debe haber participado en el trabajo en grado suficiente para asumir responsabilidad pública por su contenido. Para concederle a alguien el crédito de autor, hay que basarse únicamente en su contribución esencial por lo que se refiere a los siguientes aspectos: 1) la concepción y el diseño o bien el análisis y la interpretación de los datos; 2) la redacción del artículo o la revisión crítica de una parte importante de su contenido intelectual; y 3) la aprobación final de la versión que será publicada. Las tres condiciones tendrán que cumplirse siempre. La participación que consiste meramente en conseguir financiamiento o recoger datos no justifica el crédito de autor. Tampoco basta con ejercer la supervisión general del grupo de investigación. Toda parte del artículo que sea decisiva con respecto a las conclusiones principales deberá ser responsabilidad de por lo menos uno de los autores. Los directores de revistas podrán solicitar a los autores que describan la contribución de cada uno; esa información puede ser publicada.

Cada vez es más común que los ensayos multicéntricos se atribuyan a un autor corporativo. Todos los miembros del grupo que sean designados como autores, ya sea en la línea destinada al nombre de los autores a continuación del título o en una nota a pie de página, deberán cumplir plenamente con los requisitos de autoría recién señalados. Los miembros del grupo que no cumplan con dichos criterios serán mencionados, con su autorización, en la sección de agradecimientos o en un apéndice (véase "Agradecimientos").

El orden en que figuran los autores debe reflejar una decisión conjunta de estos. Como los autores se suelen enumerar de distintas maneras, el significado del orden en que aparecen no puede deducirse con exactitud a menos que ellos mismos lo enuncien explícitamente. Para tal efecto, tal vez deseen agregar, en una nota a pie de página, la explicación sobre el orden de enumeración. Al decidir acerca de dicho orden, los autores tendrán presente que muchas revistas imponen un límite al número de autores que figuran en el índice de materias y que, cuando hay más de 25 autores, la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos incluye en MEDLINE tan solo los nombres de los 24 primeros más el del último.

Resumen y palabras clave

La segunda página incluirá un resumen que no sobrepasará las 250 palabras de extensión. En él indicaran los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos (selección de los sujetos o los animales de laboratorio incluidos en el estudio; métodos de observación y análisis); los hallazgos más importantes (proporcionense datos específicos y, de ser posibles, su significación estadística), y las conclusiones principales. Hágase hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio o las observaciones.

A continuación del resumen agréguese, debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indizadores a clasificar el artículo, las cuales se publicarán junto con el resumen. Utilícense para este propósito los términos de la lista "Medical Subject Headings" (MeSH) [Encabezamientos de temas médicos] del Index Medicus; en el caso de términos de reciente aparición que todavía no figuren en dicha lista, podrán usarse las expresiones corrientes. ALAN exige que todo trabajo deberá acompañarse de un Resumen en inglés con sus palabras clave, "key words", si el trabajo original fuese en español, portugués o francés. Si el trabajo original es en inglés, el Resumen debe presentarse en español, igualmente con sus palabras clave.

Introducción

Expresé el propósito del artículo y resuma el fundamento lógico del estudio u observación. Menciones las referencias estrictamente pertinentes y no incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.

Métodos

Describa claramente la forma como se seleccionaron los sujetos observados o que participaron en los experimentos (pacientes o animales de laboratorio, incluidos los testigos). Identifique la edad, el sexo y otras características importantes de los sujetos. La definición y la pertinencia de la raza o el grupo étnico son ambiguos. Los autores deberán ser particularmente cuidadosos con respecto a usar estas categorías.

Identifique los métodos, los aparatos (nombre y dirección del fabricante entre paréntesis) y los procedimientos con detalles suficientes para que otros investigadores puedan reproducir los resultados. Proporcione referencias de los métodos acreditados, incluidos los de índole estadística (véase más adelante); dé referencias y explique brevemente los métodos ya publicados pero que no son bien conocidos; describa los métodos nuevos o que han sido sustancialmente modificados, manifestando las razones por las cuales se usaron y evaluando sus limitaciones. Identifique exactamente todos los medicamentos y productos químicos utilizados, sin olvidar nombres genéricos, dosis y vías de administración.

Los informes de ensayos clínicos aleatorizados deberán presentar información sobre todos los elementos importantes del estudio, como son el protocolo (población de estudio, intervenciones o exposiciones, resultados y el fundamento lógico del análisis estadístico), asignación de intervenciones (métodos de aleatorización, ocultamiento de la asignación a los grupos de tratamiento) y método de enmascaramiento (método ciego).

Los autores que presenten manuscritos de revisión incluirán una sección en la que se describan los métodos utilizados para localizar, seleccionar, extraer y sintetizar los datos. Estos métodos se mencionarán también en forma sinóptica en el resumen.

Ética. Cuando informe sobre experimentos en seres humanos, señale si los procedimientos seguidos estuvieron de acuerdo con las normas éticas del comité (institucional o regional) que supervisa la experimentación en seres humanos o con la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en 1983. No utilice el nombre de los pacientes, sus iniciales ni los códigos hospitalarios, especialmente en el material ilustrativo. Cuando dé a conocer experimentos con animales, mencione si se cumplieron las normas de la institución, las de un consejo nacional de investigación o cualquier ley nacional acerca del cuidado y el uso de animales de laboratorio.

Estadística. Describa los métodos estadísticos con detalles suficientes para que el lector versado en el tema y que tenga acceso a los datos originales pueda verificar los resultados presentados. Siempre que sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de error o incertidumbre de la medición (por ej., intervalos de confianza). No dependa exclusivamente de las pruebas de comprobación de hipótesis estadísticas, tales como el uso de los valores P, que no transmiten información cuantitativa importante.

Analice la elegibilidad de los sujetos de experimentación. Proporcione los detalles del proceso de aleatorización. Describa los medios utilizados para enmascarar las observaciones (método ciego), indicando los resultados que dieron. Informe sobre las complicaciones del tratamiento. Especifique el número de observaciones. Mencione las pérdidas de sujetos de observación (por ej., las personas que abandonan un ensayo clínico). Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos utilizados serán de trabajos vigentes (indicando el número de las páginas), y no de los artículos originales donde se describieron por vez primera. Especifique cualquier programa de computación de uso general que se haya empleado.

Las descripciones generales de los métodos utilizados deben aparecer en la sección de métodos. Cuando resuma los datos en la sección de resultados, especifique los métodos estadísticos que se emplearon para analizarlos. Limite el número de cuadros y figuras al mínimo necesario para explicar el tema central del artículo y para evaluar los datos en que se apoya. Use gráficas en vez de cuadros subdivididos en muchas partes; no duplique los datos en las gráficas y los cuadros. Evite el uso no técnico de términos de la estadística, tales como «al azar» (que entraña el empleo de un método de aleatorización), «normal», «significativo», «correlaciones» y «muestra». Defina los términos, las abreviaturas y la mayor parte de los símbolos estadísticos.

Resultados

En el texto, los cuadros y las ilustraciones, presente los resultados siguiendo una secuencia lógica. No repita en el texto todos los datos de los cuadros ni de las ilustraciones; destaque o resuma tan solo las observaciones importantes.

Discusión

Haga hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio y en las conclusiones que se derivan de ellos. No repita con pormenores los datos u otra información ya presentados en las secciones de introducción y de resultados. Explique en la sección de discusión el significado de los hallazgos y sus limitaciones, incluidas sus implicaciones para la investigación futura. Relacione las observaciones con otros estudios pertinentes.

Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, pero absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que no estén completamente respaldadas por los datos. En particular, los autores evitarán hacer afirmaciones sobre los beneficios y los costos económicos, a menos que su manuscrito incluya datos y análisis económicos. No reclame ningún tipo de precedencia ni mencione trabajos que no estén terminados. Proponga nuevas hipótesis cuando haya justificación para ello, pero identifícalas claramente como tales. Cuando sea apropiado, puede incluir recomendaciones.

Agradecimientos

En un lugar adecuado del artículo (como nota al pie de la primera página o como apéndice del texto; véanse los requisitos de la revista) uno o varios enunciados especificarán lo siguiente: 1) las colaboraciones que deben ser reconocidas pero que no justifican la

autoría, tales como el apoyo general del jefe del departamento; 2) el reconocimiento por la ayuda técnica recibida; 3) el agradecimiento por el apoyo financiero y material, especificando la índole del mismo; y 4) las relaciones que puedan suscitar un conflicto de intereses (véase «Conflicto de intereses»).

Las personas que colaboraron intelectualmente en el artículo pero cuya participación no justifica la autoría pueden ser citadas por su nombre, añadiendo su función o tipo de colaboración; por ejemplo, «asesoramiento científico», «examen crítico de la propuesta para el estudio», «recolección de los datos» o «participación en el ensayo clínico». Estas personas tendrán que conceder su permiso para ser nombradas. Los autores se responsabilizarán de obtener la autorización por escrito de las personas mencionadas por su nombre en los agradecimientos, pues los lectores pueden inferir que estas respaldan los datos y las conclusiones.

El reconocimiento por la ayuda técnica recibida figurará en un párrafo separado de los testimonios de gratitud por otras contribuciones.

Referencias

Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden en que se mencionan por primera vez en el texto. En este, en los cuadros y en los pies o epígrafes de las ilustraciones, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Las referencias citadas solamente en cuadros o ilustraciones se numerarán siguiendo una secuencia que se establecerá por la primera mención que se haga en el texto de ese cuadro o esa figura en particular.

Emplee el estilo de los ejemplos que aparecen más adelante, los cuales están basados en el formato que la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos usa en el *Index Medicus*. Abrevie los títulos de las revistas de conformidad con el estilo utilizado en dicha publicación. Consulte la *List of Journals Indexed in Index Medicus* [Lista de revistas indizadas en *Index Medicus*], que se publica anualmente como parte del número de enero y como separata. La lista se puede obtener asimismo en el sitio que la biblioteca mantiene en la World Wide Web (<http://www.nlm.nih.gov>).

Absténgase de utilizar los resúmenes como referencias. Las referencias a artículos que han sido aceptados pero que todavía no se publican se designarán como «en prensa» o «de próxima aparición»; los autores obtendrán por escrito el permiso para citar dichos artículos y también la verificación de que han sido aceptados para publicación. La información proveniente de manuscritos presentados para publicación pero aún no aceptados se citará en el texto como «observaciones inéditas», con el permiso correspondiente de la fuente.

No cite una «comunicación personal» a menos que aporte información esencial que no pueda obtenerse de una fuente pública; en ese caso, el nombre de la persona y la fecha de la comunicación aparecerán entre paréntesis en el texto. En el caso de artículos científicos, los autores deberán obtener el permiso de la fuente y su confirmación de la exactitud de la comunicación personal, ambos por escrito. Los autores verificarán las referencias cotejándolas contra los documentos originales.

El estilo de los requisitos uniformes (estilo de Vancouver) se basa en gran medida en una norma de estilo ANSI adaptada por la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) para sus bases de datos. En los ejemplos que siguen se han agregado notas cuando el estilo de Vancouver difiere del estilo que actualmente utiliza la NLM.

Artículos de revista

1. Artículo de revista ordinario

Enumere los primeros seis autores y añada la expresión «et al.» (Nota: La NLM incluye ahora hasta 25 autores; si hay más de 25, enumera los primeros 24, continuación el último autor y luego agrega «et al.»)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996 Jun 1;124(11):980-3.

Optativamente, si se utiliza la paginación continua a lo largo de un volumen (como hacen muchas revistas médicas), se pueden omitir el mes y el número.

(Nota: Para respetar la uniformidad, en todos los ejemplos que se presentan en los requisitos uniformes se aplica esta opción. La NLM, sin embargo, no usa dicha opción.)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

Más de seis autores:

Parkin DM, Clayton D, Black Rj, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996;73:1006-12.

2.. Organización como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.

3. No se indica el nombre del autor

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15.

4. Artículo en idioma extranjero (2)

(Nota: La NLM traduce el título al inglés, lo encierra entre corchetes y le agrega la abreviatura correspondiente al idioma original.)

Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral infrapatellar seneruptur hos tidligere frisk kvinne. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1996; 116:41-2.

5. Suplemento de un volumen

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.

6. Suplemento de un número

Payne DK, Sullivan MD, Massie Mj. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23(1 Suppl 2): 89-97.

7. Parte de un volumen

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995;32(Pt 3):303-6.

8. Parte de un número

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *N Z Med J* 1994;107(986 Pt 1):377-8.

9. Número sin volumen

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995;(320): 110-4.

10. Sin número ni volumen

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responsos. *Curr Opin Gen Surg* 1993:325-33.

11. Paginación en números romanos

Fisher GA, Sikic BI. Drug resistance in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995 Apr;9(2):xi-xii.

12. Indicación del tipo de artículo, según corresponda

Enzensber er W, Fischer PA. Metronome in Parkinson,s disease [carta]. *Lancet* 1996;347:1337.

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumen]. *Kidney Int* 1992;42:1285.

13. Artículo que contiene una retractación

Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retractación de Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. *En: Nat Genet* 1994;6:426-31]. *Nat Genet* 1995;11: 104.

(2) Evidentemente "extranjero" se entiende aquí en relación con el idioma inglés, pues los ejemplos de referencia bibliográfica se han trasladado directamente del original, sin adaptarlos (N. Del t.).

14. Artículo retirado por retractación

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [retirado *por retractación* en Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:3127]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:1083-8.

15. Artículo sobre el que se ha publicado una fe de erratas

Hamlin JA, Kahn AM. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [se publica una fe de erratas en West J Med 1995;162:278]. West J Med 1995; 162:28-31.

Libros y otras monografías

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver indicaba, incorrectamente, que entre la editorial y la fecha debía ir una coma en vez de punto y coma, como debe ser.)

16. Individuos como autores

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership. skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

17. Directores ("editores"), compiladores como autores

Norinan JJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

18. Organización como autor y editorial

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

19. Capítulo de libro

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver prescribía el uso de dos puntos en vez de la letra p antes de las páginas.)

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. En: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

20. Actas de conferencias

Kimura J, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology, Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

21. Artículo presentado en una conferencia

Bengtsson S, ToIheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. En: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

22. Informe científico o técnico

Publicado por la institución financiadora o patrocinadora:
Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSIGOE169200860.

Publicado por la institución ejecutora:

Field MJ, Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

23. Tesis doctoral

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [tesis doctoral]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

24. Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, titular. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Otros trabajos publicados**25. Artículo de periódico**

Lee C. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col. 5).

26. Material audiovisual

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassette]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

27. Documentos legales

Ley pública:

Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Proyecto de ley sin sancionar:

Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1st Sess. (1995).

Código de normas federales:

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

Audiencia:

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nation's Emergency Rooms: Hearings Before the Subcomm. on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm. on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26, 1993).

28. Mapa

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [mapa demográfico]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

29. Libro de la Biblia

The Holy Bible. King James version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

30. Diccionarios y obras de consulta semejantes

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p.119-20.

31. Obras clásicas

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

Trabajos inéditos**32. En prensa**

(Nota: La NLM prefiere referirse a estos trabajos como «en preparación» [forthcoming] porque no todos se publicarán impresos.)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. En prensa 1996.

Material en soporte electrónico**33. Artículo de revista en formato electrónico**

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [publicación periódica en línea] 1995 jan-mar [citada 1996 jun 51;1(1):[24 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

34. Monografía en formato electrónico

CDI, clinical dermatology illustrated [monografía en CD-ROM]. Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

35. Fichero de computadora

Hemodynamics 111: the ups and downs of hemodynamics [programa de computadora]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

Cuadros

Mecanografía o imprima cada cuadro a doble espacio y en hoja aparte. No presente los cuadros en forma de impresiones fotográficas. Numérelos consecutivamente siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto, y asigne un título breve a cada uno. Cada

columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. Las explicaciones irán como notas al pie y no en el encabezamiento. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en cada cuadro. Como llamadas para las notas al pie, utilícese los símbolos siguientes en la secuencia que se indica: *, †, ‡, †, **, ††, ††.

Identifique las medidas estadísticas de variación, tales como la desviación estándar y el error estándar de la media.

No trace líneas horizontales ni verticales en el interior de los cuadros. Cerciérese de que cada cuadro aparezca citado en el texto.

Si incluye datos publicados o inéditos provenientes de otra fuente, obtenga la autorización necesaria para reproducirlos y conceda el reconocimiento cabal que corresponde. Incluir un número excesivo de cuadros en relación con la extensión del texto puede ocasionar dificultades al confeccionar las páginas. Examine varios números recientes de la revista a la que planea presentar el artículo y calcule cuántos cuadros pueden incluirse por cada millar de palabras de texto. Al aceptar un artículo, el director podrá recomendar que los cuadros suplementarios que contienen datos de respaldo importantes, pero que son muy extensos para publicarlos, queden depositados en un servicio de archivo, como el Servicio Nacional de Publicaciones Auxiliares en los Estados Unidos, o que sean proporcionados por los autores a quien lo solicite. En tal caso, se agregará en el texto la nota informativa necesaria. Dichos cuadros se presentarán junto con el artículo para su consideración.

Ilustraciones (figuras)

Envíe los juegos completos de figuras en el número requerido por la revista. Las figuras estarán dibujadas y fotografiadas en forma profesional; no se aceptarán los letreros trazados a mano o con máquina de escribir. En lugar de los dibujos, radiografías y otros materiales de ilustración originales, envíe impresiones fotográficas en blanco y negro, bien contrastadas, en papel satinado y que midan 127 x 173 mm, sin exceder de 203 x 254 mm. Las letras, números y símbolos serán claros y uniformes en todas las ilustraciones; tendrán, además, un tamaño suficiente para que sigan siendo legibles incluso después de la reducción necesaria para publicarlos. Los títulos y las explicaciones detalladas se incluirán en los pies o epígrafes, no sobre las propias ilustraciones.

Al reverso de cada figura pegue una etiqueta de papel que lleve anotados el número de la figura, el nombre del autor y cuál es la parte superior de la misma. No escriba directamente sobre el dorso de las figuras ni las sujete con broches para papel, pues quedan marcadas. Las figuras no se doblarán ni se montarán sobre cartón.

Las fotomicrografías incluirán en sí mismas un indicador de la escala. Los símbolos, flechas y letras usados en estas deberán contrastar claramente con el fondo.

Si se usan fotografías de personas, estas no deberán ser identificables; de lo contrario, habrá que anexar un permiso por escrito para poder utilizarlas.

Las figuras se numerarán en forma consecutiva de acuerdo con su primera mención en el texto. Si la figura ya fue publicada, se reconocerá la fuente original y se presentará la autorización por escrito que el titular de los derechos de autor concede para reproducirla. Este permiso es necesario, independientemente de quién sea el autor o la editorial; la única salvedad son los documentos considerados como de dominio público.

Pies o epígrafes de las ilustraciones

Los pies o epígrafes de las ilustraciones se mecanografiarán o imprimirán a doble espacio, comenzando en hoja aparte e identificándolos con los números arábigos correspondientes. Cuando se utilicen símbolos, flechas, números o letras para referirse a ciertas partes de las ilustraciones, será preciso identificar y aclarar el significado de cada uno en el pie o epígrafe. En las fotomicrografías habrá que explicar la escala y especificar el método de tinción.

Unidades de medida

Las medidas de longitud, talla, *peso* y volumen se expresarán en unidades del sistema métrico decimal (metro, kilogramo, litro, etc.) o sus múltiplos y submúltiplos.

Las temperaturas se consignarán en grados Celsius. Los valores de presión arterial se indicarán en milímetros de mercurio.

Todos los valores hemáticos y de química clínica se presentarán en unidades del sistema métrico decimal y de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). La redacción de la revista podrá solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores agreguen unidades alternativas o distintas de las del SI.

Abreviaturas y símbolos

Utilice únicamente abreviaturas corrientes. Evite las abreviaturas en el título y el resumen. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura en el texto, irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

Envío del manuscrito a la revista

Envíe por correo el número requerido de copias del manuscrito en un sobre de papel resistente; si es necesario, proteja las copias y las figuras metiéndolas entre dos hojas de cartón para evitar que las fotografías se doblen. Meta las fotografías y transparencias en su propio sobre de papel resistente.

Los manuscritos irán acompañados de una carta de envío firmada por todos los coautores.

Artes Finales: Amerik Solutions C.A., Caracas, Venezuela
Teléfono (02) 993.81.43

Portada: Chávez & López, Diseño Gráfico, Caracas, Venezuela
Teléfono (02) 285.55.29

Impresión: Editorial Texto C.A., Caracas, Venezuela
Teléfonos: (02) 632.97.17 - 632.74.86

LA SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE NUTRICION (SLAN)

La Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN) fue creada el 10 de Noviembre de 1965 en ocasión de celebrarse el Primer Congreso de Nutrición del Hemisferio Occidental. El actual Consejo Directivo de la SLAN (2004-2006) está constituido por los siguientes miembros:

Presidente	Helio Vannucchi
Vicepresidente (Presidente Electo)	Eduardo Atalah S.
Secretario General	Julio Sergio Marchini
Tesorero	Pedro Eder Portari Filho
Presidente Saliente	Adolfo Chávez Villasana

DIRECTORIO DE ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION

Editor General	José Félix Chávez Pérez
Editor Asociado	Maritza L. de Jiménez

MIEMBROS DEL CUERPO EDITORIAL. PERIODO 2004-2006

Juan de Dios Alvarado	Ileana Holst Schumacher
Hugo Amigo A.	Franco M. Lajolo
Héctor Araya	Luis López Valladares
María Laura Arias E.	María L.P. Martín de Portela
Jaime Ariza M.	Lilia Masson Salaué
Guillermo Arroyave	Reynaldo Martorell
Denis Barclay	Josefina Morales de León
José María Bengoa	María del C. Morasso
Adriana Blanco M.	Rosa María Ortega A.
Odilia Bermudez	Saturnino de Pablo
Héctor Bourges R.	Ingrid R. de Paoli
Ricardo Bressani	Nelly Pak
Jesús Bulux	Emma W. de Penna
Benjamín Caballero	María Ester Río
Ana M. Calderón de la Barca	Delia Rodríguez-Amaya
Esther Casanueva	Manuel Ruz
Germán Camejo	María Elena Sambucetti
Eduardo S. Castro Montero	Elba Sangronis
Fanny Carrillo de Padilla	Teresa Shamah Levi
Sara J. Closa	Nilson E. de Sousa
Louella Cunningham	Nora Slobodianik
Elizabet Dini G.	Liseti Solano R.
Juan Ignacio Egaña	Noel W. Solomons
Patricia R. de Ferrer	Armando Tovar
María N. García Casal	Juscelino Tovar
Eglis González G.	Luiz C. Trugo
Marisa Guerra M.	Mirtha E. Valencia
Werner G. Jaffé	Mauro Valencia J.
Gladys Henriquez P.	Mario Villarroel T.
Pilar Hernández S.	Carolyn Jane Wyatt
Eva Hertrampf	Enrique Yáñez S.
Patricio Hevia Opazo	Liliana Zago

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Volumen 54. Nº 3, Septiembre 2004

Contenido

	Páginas
ARTICULOS GENERALES	
Efeitos terapêuticos dos fitosteróis e fitostanóis na colesterolemia Sílvia L. C. Martins, Heliênia F. Silva, Maria Rita Carvalho Garbi Novaes, Marina Kiyomi Ito	257
TRABAJOS DE INVESTIGACION	
Bioquímica Nutricional	
Lipemia postprandial en adultos jóvenes de diferentes etnias en Colombia Cecilia Aguilar de Plata, Maria Teresa Velasco de Echeverri, Beatriz Gracia de Ramírez, Alberto Pradilla Ferreira, Martha Liliana Cruz Naranjo, Mildrey Mosquera Escudero	264
Efecto de un desayuno con alto contenido en grasa o en carbohidratos sobre el perfil de lípidos posprandial en individuos sanos con y sin antecedente familiar de diabetes mellitus tipo 2 Manuel González-Ortiz, Blanca R. Balcázar-Muñoz, José M. Mora-Martínez, Esperanza Martínez-Abundis	274
Nutrición Experimental	
Exactitud del índice de masa corporal en la predicción de la adiposidad medida por impedanciometría bioeléctrica Fernando Carrasco N., Eliana Reyes S., Olga Rimler S., Francisca Rios C.	280
Nutrición Infantil	
Influencia del estado nutricional sobre la efectividad de un suplemento dietario de bacterias lácticas. Prevención y cura de diarreas infantiles María Esther Rífo, Liliana Beatriz Zago, Hugo Garcia y Luis Winter	287
Microbiología de Alimentos	
Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Xinia Barrantes, Dylana Railey, María Laura Arias y Carolina Chaves	293
Evaluación del efecto de cultivos probióticos presentes en yogurt sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y la producción de termonucleasa Marlon Salvatierra, Andrea Molina, María del Mar Gamboa y María Laura Arias	298
Evaluación de la presencia de bacterias en alimentos y en el ambiente de una sección de oncología de un hospital nacional, San José, Costa Rica Fabiola Jiménez, Laura Garro, Evelyn Rodríguez, Zenén Zeledón	303
Ciencia de Alimentos	
Evaluación microbiológica y fisicoquímica de bebidas pasteurizadas fortificadas con extractos de desechos desodorizados de naranja Mario José Moreno Alvarez, Alexandra Machado, Arelis Padrón, David García y Douglas Rafael Belén Camacho	308
Tecnología de Alimentos	
Desarrollo de un producto de panificación apto para el adulto mayor a base de harina de trigo y harina de arroz María José Reyes Aguilar, Patricia de Palomo, Ricardo Bressani	314
LatinFoods. Composición de Alimentos	
Caracterización nutricional de los carbohidratos y composición centesimal de raíces y tubérculos tropicales cocidos, cultivados en Costa Rica Adriana Blanco-Metzler, Juscelino Tovar, Mireya Fernández-Piedra	322
Perfil lipídico de 25 pescados marinos mexicanos con especial énfasis en sus ácidos grasos n-3 como componentes nutraceuticos María Isabel Castro-González, Anayté Ojeda, José Luis Silencio, Lorena Cassis, Héctor Ledesma, Fernando Pérez-Gil	328
Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible <i>Monostroma undulatum</i>, Wittrock Adriana Alicia Gallardo, Susana Risso, María Angélica Fajardo, Silvia Estevao Belchior	337
Mineral content of the honey produced in Zulia state. Venezuela Betzabé Sulbarán de Ferrer, Graciela Ojeda de Rodríguez, Jorge Peña, Janeth Martínez y María Morán	346
Caracterização química parcial e bioquímica de sementes de <i>Bauhinia forficata</i> link Rozilaine A.P.G. Faria, Manoel Andrade-Neto, Luciano Silva Pinto, Rolando Rivas Castellón, Juan J. Calvete & Benildo Sousa Cavada ...	349
NOTAS NECROLOGICAS	354
IFORMACION PARA LOS AUTORES	356