

ALAN

Volumen 45. N° 3. Septiembre 1.995

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

Organo Oficial de la
Sociedad Latinoamericana de Nutrición

VOL 45

SEPTIEMBRE 1995

Nº 3

Contenido

Páginas

ARTICULOS GENERALES

Avaliação do programa de merenda escolar do Município de Campinas, Brasil

Elisabete Salay e José Ferreira de Carvalho 167

TRABAJOS DE INVESTIGACION

Nutrición Humana

Balance de minerales durante la recuperación nutricional en lactantes con desnutrición energético-proteica

María Verónica Marín Briano, Carlos Castillo Durán y Ricardo Uauy Dagach 172

Mineralización ósea e ingesta de calcio en escolares chilenos

Laura Leiva , Raquel Burrows, Ricardo Lillo, Hugo Pumarino y Santiago Muzzo 178

Mineralización ósea en adolescentes que padecieron desnutrición postnatal temprana

Santiago Muzzo, Laura Leiva, Ricardo Lillo, Hugo Pumarino , Renata Ernst, y Raquel Burrows 183 ✓

Evaluación química y nutricional de un alimento para adultos a base de soja y cereales

María Catalina Olgún, Susana Agnese Calderari, María Delia Posadas, Gilda Celina Revelant,
María del Carmen Gayol, María Isabel Zingale, Miryam Elsa Vignale, Verónica Beatriz Labourdette,
Mariela Balseiro, y Andrés Agustín Torriggino 187

Bioquímica Nutricional

Alterações histológicas de glândulas submandibulares e testículos induzidas por dietas à base de soja e dieta zinco deficiente em ratos Vanderlei L.C.M, Arruda Veiga M.C.F., Reis N.S. y Tambeli C.H.....	193
--	-----

Zinc, copper and iron and their interrelations in the growth of sickle cell patients Josefina A. Pellegrini Braga, José Kerbauy, Mauro Fisberg.....	198
---	-----

Effects of dietary fat and nitrite on plasma and corporal density Rebeca C. de Angelis, Ilza C.M. Terra, Julieta H. Scialfa, Itamar Klemps F.	204
--	-----

Bacteriología de Alimentos

Comparación de metodologías para la detección y enumeración de bacterias ácido lácticas en el yogurt Ana Graciela Briceño y Raúl Martínez	207
---	-----

Residuos de antibióticos en leche pasteurizada distribuida en servicios de nutrición hospitalarios de Costa Rica Rafael Monge, Magaly Caballero, y Rita Coghi	213
---	-----

Ciencia de Alimentos

Caracterización bioquímica de las proteínas de jaiba mora (<i>Homalaspis plana</i>) Lilian Abugoch J., Abel Guarda M, y Mario Chiong L.	216
--	-----

Effect of germination on the protein content and on the level of specific activity of lipoxygenase-1 in seedlings of three soybean cultivars Bordingnon J.R., Ida E.L., Oliveira M.C.N., y Mandarino J.M.G.....	222
---	-----

Nutrición Animal

Evaluación de los niveles de efectividad de mezclas vegetales en la recuperación de animales con desnutrición proteico-energética precoz y tardía Patricia Liliana Jiménez de Erramouspe y Margarita Armada de Romano	227
---	-----

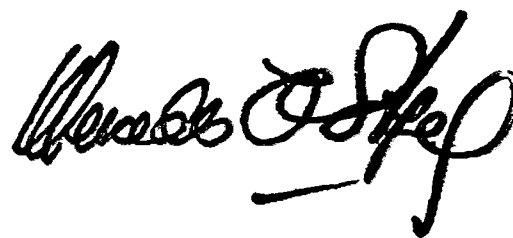
Latin Foods. Composición de Alimentos

Caracterizaçáo química da polpa e do óleo do marolo (<i>Annona coriaceae</i>) Tânia da S. Agostini, Heloisa M. Cecchi, y Daniel Barrera-Arellano.....	237
---	-----

Estudio comparativo de la composición y el valor nutritivo de semillas y concentrados de proteína de leguminosas Rosana Cantoral, Alfredo Fernández-Quintela, J.Alfredo Martínez, y M. Teresa Macarulla	242
---	-----

NUEVOS LIBROS	249
----------------------------	-----

INFORMACION PARA LOS AUTORES.....	250
--	-----



Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the
Latin American Society of Nutrition

VOL 45

SEPTEMBER 1995

Nº 3

Contents

	Pages
GENERAL ARTICLES	
Evaluation of a school-lunch program in Campinas, Brazil. Elisabete Salay and José Ferreira de Carvalho	167
RESEARCH PAPERS	
Human Nutrition	
Mineral balance during nutritional recuperation of malnourished infants María Verónica Marín Briano, Carlos Castillo Durán and Ricardo Uauy Dagach.....	172
Bone mineralization and calcium intake in school age children Laura Leiva , Raquel Burrows, Ricardo Lillo, Hugo Pumarino and Santiago Muzzo.....	178
Bone mineralization of adolescents that suffered of early postnatal undernutrition Santiago Muzzo, Laura Leiva, Ricardo Lillo, Hugo Pumarino , Renata Ernst, and Raquel Burrows.....	183
Chemical and nutritional assessment of soybean and cereal mixture for adults. María Catalina Olgúin, Susana Agnese Calderari, María Delia Posadas, Gilda Celina Revelant, María del Carmen Gayol, María Isabel Zingale, Miryam Elsa Vignale, Verónica Beatríz Labourdette, Mariela Balseiro, and Andrés Agustín Torriggino.....	187

Biochemical Nutrition

Histologic alterations of the submandibular glands and testicles induced by soy and zinc deficient diets.
Vanderlei L.C.M, Arruda Veiga M.C.F., Reis N.S. and Tambeli C.H. 193

Zinc, copper and iron and their interrelations in the growth of sickle cell patients
Josefina A. Pellegrini Braga, José Kerbauy, Mauro Fisberg 198

Effects of dietary fat and nitrite on plasma and corporal density
Rebeca C. de Angelis, Ilza C.M. Terra, Julieta H. Scialfa, Itamar Klemps F. 204

Food Bacteriology

Comparison of methodologies for the detection and enumeration of lactic acid bacteria in yogurt.
Ana Graciela Briceño and Raúl Martínez 207

Presence of antibiotic residues in pasteurized milk distributed to hospital's nutrition services in Costa Rica
Rafael Monge, Magaly Caballero, and Rita Coghi 213

Food Science

Biochemical characterization of crab (*Homalaspis plana*) proteins.
Lilian Abugoch J., Abel Guarda M, and Mario Chiong L 216

Effect of germination on the protein content and on the level of specific activity of lipoxygenase-1 in seedlings of three soybean cultivars
Bordignon J.R., Ida E.L., Oliveira M.C.N., and Mandarino J.M.G. 222

Animal Nutrition

Evaluation of the levels effectiveness of vegetable mixtures in the recovering of rats with later and early protein calorie malnutrition.
Patricia Liliana Jiménez de Erramouspe y Margarita Armada de Romano 227

Latin Foods. Food Composition

Chemical characterization of the oil and pulp of marolo (*Annona coriacea*)
Tânia da S. Agostini, Heloisa M. Cecchi, and Daniel Barrera-Arellano..... 237

Composition and nutritional value of legume seeds and protein concentrates. A comparative study
Rosana Cantoral, Alfredo Fernández-Quintela, J.Alfredo Martínez, and M. Teresa Macarulla..... 242

NEW BOOKS..... 249

INFORMATION TO AUTHORS..... 250

Avaliação do programa de merenda escolar do Município de Campinas, Brasil

Elisabete Salay¹ e José Ferreira de Carvalho²

Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição e Departamento de Estatística da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas - SP, Brasil

RESUMO: O presente estudo teve como objetivos determinar as adequações calórica e protéica, diagnosticar a modalidade operativa e as dificuldades operacionais do Programa de Merenda Escolar na cidade de Campinas do Brasil. Foi analisada uma amostra aleatória com 6 escolas e 1.237 crianças. Para determinar o consumo de energia e proteína empregou-se o método de pesagem direta dos alimentos. Um modelo de projeto alimentar foi elaborado para a análise da operacionalização. Os valores determinados das adequações foram muito baixos: 48.6 ± 17.3 % de energia e 52.7 ± 17.2 % de proteína. Os valores de adequação das escolas não + estatisticamente ($\alpha=0.05$) que a eficácia e/ou impactos do programa em Campinas poderiam estar sendo entravados pela falta de recursos e por diferentes distorções operacionais. Dentre estas destacam-se: as elevadas quantidades de alimentos preparados e não servidos às crianças, o tipo de alimento utilizado, a ineficiência dos controles administrativos, a baixa frequência de supervisão de recursos humanos, a pequena produção de hortas escolares e a inexistência de controle de qualidade dos alimentos, de avaliações, de participação popular, de educação nutricional e de integração com programas de saúde.

SUMMARY: Evaluation of a school-lunch program in Campinas, Brazil. The objective of this study was to investigate the calorie and protein adequacies, to establish the operation model and the operational difficulties of the School-Lunch Program in Campinas, Brazil. Six schools randomly selected (1,237 children) were investigated. Calorie and protein consumption were estimated by weighed records. A model food project was developed in order to analyse the city food-service operation. The adequacy values were very low: 48.6 ± 17.3 % for energy and 52.7 ± 17.2 % for protein. The Tukey test indicated that schools did not differ regarding adequacies ($\alpha=0.005$). The results suggested that the efficiency and/or the impact of Campinas program may be limited by both, lack of resources and several operation failures such as: preparation of large amount of food which is not served to the children; the type of the food served; the ineffective administrative controls; the low supervision frequency, low school garden production and inefficient staff training; as well as the lack of food quality control, evaluations, community participation, nutritional education had integration with health programs.

INTRODUÇÃO

A subalimentação infantil no Brasil representa ainda um problema social importante para o país. Assim, cerca de 5 milhões de crianças brasileiras menores de 5 anos sofrem de desnutrição (1). As ações públicas que interferem nos níveis

de renda e de emprego da população são as mais eficazes para a solução do problema nutricional nos países em desenvolvimento. Entretanto, vários programas complementares podem colaborar para diminuir a prevalência da desnutrição infantil. Dentre essas atividades, programas de alimentação escolar têm sido frequentemente implementados.

No Brasil, o Programa Nacional de Merenda Escolar (PNAE) foi instaurado em 1954. Atualmente, ele beneficia a mais de 30 milhões de crianças, representando uma das mais importantes ações da política social de alimentação do país. Entretanto, sabe-se que vários obstáculos operacionais reduzem a eficácia deste programa. Mas, necessita-se de análises mais aprofundadas sobre este tema. Na verdade, as pesquisas existentes, ou se restringiram à determinação dos impactos e/ou eficácia do serviço (2-5) ou à avaliação de sua operacionalização

1 Professor Assistente Doutor, MS-3, Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, CP 6121, CEP 13081-970, Campinas, SP, Brasil.

2 Professor Adjunto, MS-5, Departamento de Estatística, Instituto de Matemática, Estatística e Ciências da Computação, Universidade Estadual de Campinas.

(6-7). Análises que tentaram relacionar a eficácia do PNAE com a seu modo operacional, utilizando um modelo de projeto alimentar que facilite estudos comparativos, são precárias (8).

Neste sentido, o presente trabalho tem como objetivos principais determinar a eficácia do PNAE na cidade de Campinas, diagnosticar sua modalidade operativa e verificar suas dificuldades operacionais ao nível municipal.

MATERIAL E METODOS

Selecionou-se uma amostra aleatória contendo 6 escolas com 1.237 crianças, a partir do universo de 38 escolas municipais de primeiro grau e 19.520 alunos de cidade de Campinas.

A maioria dos dados foi coletada na semana de 20 a 24 de novembro de 1989 por uma equipe devidamente treinada.

Determinou-se a eficácia do PNAE como sendo as adequações calórica e protéica da alimentação consumida na escola em relação ao objetivo alimentar do programa, ou seja, fornecer às crianças uma refeição contendo 300 calorias e 8 gramas de proteínas. Para isto, foi empregado o método de pesagem direta dos alimentos. A coleta de dados de consumo alimentar foi repetida por 5 dias. Realizou-se a conversão da quantidade de alimentos consumidos em energia e proteínas pelo emprego de tabela de composição química de alimentos (9), ou da ficha técnica dos produtos que foi fornecida pelas indústrias.

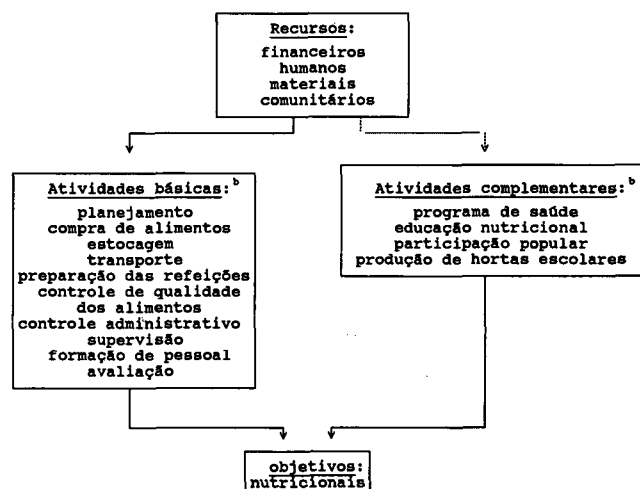
Analisou-se o nível micro da operacionalização do programa. Neste sentido, a operacionalização foi considerada como sendo o conjunto de atividades realizadas, a partir de certa quantidade de recursos, para atingir objetivos pré-determinados (10). Foi elaborado um modelo de projeto alimentar, baseando-se em estudos anteriores (11-13). Utilizou-se as noções de atividades básicas e atividades complementares empregadas pelo INCAP (11). Assim, os recursos considerados foram: humanos, materiais e comunitários. As atividades básicas estudadas foram: planejamento, compra de alimentos, estocagem, transporte, preparação das refeições, controle de qualidade dos alimentos, controles administrativos, supervisão, formação de pessoal e avaliações. As seguintes atividades complementares foram avaliadas: programas de saúde, educação nutricional, participação popular e produção de hortas escolares (Fig. 1).

A análise das atividades e recursos foi feita empregando-se critérios qualitativos ou quantitativos, desde que pertinentes à cada elemento do processo (14-15). Para isto, foram submetidos questionários (com perguntas abertas e fechadas) aos responsáveis pelas atividades do programa nas escolas da amostra, nos sistemas municipais de transporte e armazenamento e na prefeitura. Além disto, foram determinados, a partir dos dados de consumo alimentar outros indicadores de possíveis problemas operacionais: as porcentagens do custo de sobras limpas (PSL) (alimentos preparados mas não servidos) e de restos (PR) (alimentos comestíveis servidos e

não consumidos) em relação ao custo dos alimentos preparados (16); a proporção de energia proveniente de proteínas (P) e de lipídeos (G) e a relação G/P (17).

Os índices relativos ao consumo alimentar foram calculados empregando-se o sistema SAS (SAS Institute Cary, NC, USA), em computador IMB-3090 da UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas). A análise estatística consistiu em estimar média aritmética, desvio-padrão e realizar o teste de Tukey.

FIGURA 1
Modelo de projeto alimentar utilizado^a



- a Modelo elaborado baseando-se em estudos anteriores (11-13)
b Ver as definições de atividades básicas e complementares em INCAP (11)

RESULTADOS

Características operacionais gerais do PNAE em Campinas

O Programa de Merenda Escolar em Campinas deveria cumprir as normas referentes à Municipalização da Merenda Escolar no Estado de São Paulo (18). Dentre essas destaca-se que a ação operava de maneira descentralizada, isto é, o Governo do Estado de São Paulo repassava os recursos financeiros para o município comprar alimentos. As crianças beneficiárias permaneciam meio período (4 horas) nas escolas onde recebiam uma refeição. O programa funcionava 180 dias por ano. Ao nível municipal, a Secretaria Municipal da Educação, órgão ligado à prefeitura, responsabilizava-se pelo PNAE.

A logística básica diagnosticada do programa foi a seguinte: de três em três meses a Secretaria Municipal da Educação adquiria os alimentos, em geral, do tipo formulado; a seguir, depositava-se os produtos alimentícios no Armazém Municipal da Merenda Escolar; todo mês a prefeitura distribuía os alimentos às escolas que os armazenavam, preparavam e distribuía aos alunos.

A Tabela 1 apresenta a estrutura de custo do PNAE em Campinas. Nota-se que os itens mais importantes do custo de operação do programa foram os alimentos (61.0 %) e a mão de obra (36.4 %). O custo anual foi de 13.7 US\$ (novembro de 1989) por criança.

TABELA 1
ESTRUTURA DO CUSTO MÉDIO MENSAL DO
PROGRAMA DE MERENDA ESCOLAR NA CIDADE
DE CAMPINAS

Item	Custo (US \$) ^a	Porcentagem do Custo Total (%)	Custo/Criança (US %/Criança)
Alimentos	27.041,89	61,0	1,39
Merendeiras			
Armazém	16.109,44	36,4	0,83
Municipal	353,77	0,8	0,02
Transporte	466,04	1,1	0,02
Gaz	326,62	0,7	0,02
Total	44.294,76	100,0	2,28

^a 1 dólar equivale a 7,33 cruzeiros de 30-11-1989 (taxa oficial de compra).

Adequação da merenda escolar

As adequações calórica e protéica do Programa de Merenda Escolar na cidade de Campinas encontram-se na Tabela 2. Ressalta-se que em nenhuma das escolas analisadas as adequações atingiram valores desejáveis (100.0 %). Na escola 2 encontrou-se valores de adequações tão baixos quanto 33,4 % de energia e 38,3 % de proteína. A instituição 5 foi a que apresentou valores de adequações superiores: 56,6 % de energia e 64,7 % de proteína. As médias gerais de adequação foram: 48,6±17,3 % de caloria e 52,7±17,2 % de proteína. Os valores definidos em cada escola não apresentaram diferença estatística ($\alpha=0,05$).

TABELA 2
ADEQUAÇÃO ENERGÉTICA (%) E PROTÉICA (%) DA
MERENDA SERVIDA NAS ESCOLAS MUNICIPAIS
PRIMARIAS DE CAMPINAS^a

Escola	Adequação de ^b Energia (%)	Adequação de ^b Proteína (%)
1	47,2 ± 4,1	59,7 ± 3,9
2	33,4 ± 8,4	38,3 ± 10,3
3	51,0 ± 3,0	52,9 ± 9,3
4	48,2 ± 25,4	50,6 ± 20,7
5	56,6 ± 27,4	64,7 ± 28,5
6	55,3 ± 13,4	50,0 ± 13,8
Média geral	48,6 ± 17,3	52,7 ± 17,2

^a Valor médio de 5 repetições ± desvio-padrão.
^b Os valores não foram significativamente diferentes ($\alpha=0,05$), segundo o teste de Tukey.

Operacionalização e suas dificuldades

Os recursos: Das escolas analisadas, somente 50 % consideravam suficiente a quantidade de alimentos fornecidos pela prefeitura. Na verdade, os recursos financeiros repassados pelo Governo do Estado de São Paulo para a compra de alimentos foram insuficientes, isto é, 0,6 cruzeiros (novembro de 1989) por criança e refeição. Este valor equivalia, por exemplo, a somente 135 calorias de pão de trigo.

Relatou-se a falta de equipamentos e utensílios: em 17 % das escolas para preparar os alimentos e em 33 % para servir as refeições. As instituições estavam equipadas para preparar refeições simples, na verdade, elas possuíam somente fogão (100 % das escolas) e geladeira (67 % das escolas).

A mão de obra administrativa foi considerada precária. Em especial, necessitava-se de pessoal para supervisionar o programa. Um total de 33 % das escolas relataram a falta de merendeiras.

Os recursos comunitários foram raramente empregados no PNAW de Campinas em 1989.

As atividades: Relatizava-se a compra de alimentos pela modalidade operativa mais demorada e complicada (concorrência) de 3 em 3 meses, quando o Governo do Estado de São Paulo repassava os recursos financeiros. Para a seleção dos fornecedores de alimentos, utilizava-se os seguintes critérios: conteúdo calórico e protéico, nível de aceitação e custo, citados em ordem de prioridade.

Foi considerado precário o Sistema Municipal de Transporte, pois somente dois veículos serviam ao programa, além de serem empregados para outros fins. Não ocorriam perdas importantes de alimentos durante o transporte.

O Armazém Municipal da Merenda Escolar apresentava condições de armazenagem precárias (desinfecções feitas raramente, alimentos empilhados com pouca sistematização, etc.). Ao nível das escolas somente 50 % delas consideravam boa sua estrutura de estocagem. Não se observaram perdas importantes de alimentos na armazenagem, tanto nas escolas como no Armazém Municipal da Merenda Escolar.

A Secretaria Municipal da Educação planejava a quantidade de alimentos para ser adquirida e estocada a partir do número médio de refeições de cada instituição. Este procedimento foi prejudicado pelo fato dele depender da quantia de recursos financeiros repassada pelo Governo do Estado de São Paulo, a qual a prefeitura desconhecia. Utilizava-se alimentos formulados contrariamente às indicações da Municipalização da Merenda (18) pois, argumentava-se não existir infraestrutura para preparar alimentos *in natura*. A prefeitura sugeria o seguinte cardápio semanal: leite como chocolate e bolacha; sopa de legumes com pedaços de carne; polenta com proteína texturizada de soja e molho; curau; e sopa de legumes com pedaços de frango.

O fornecimento da merenda foi interrompido frequentemente em 33 % das escolas devido à falta de alimen-

tos, água e material de cantina.

A Tabela 3 apresenta os valores de P, G e G/P da merenda das escolas de Campinas. A média geral de P foi de $12,9 \pm 2,9$ % e portanto levemente superior ao desejável. As médias de G e G/P estavam dentro dos limites sugeridos: $25,2 \pm 8,2$ % e $2,1 \pm 0,9$ %, respectivamente. A aplicação do teste de Tukey mostrou que as médias das escolas de P, G, e G/P não foram significativamente diferentes ($\alpha=0,05$).

TABELA 3
VALORES DE P (PROPORÇÃO DE ENERGIA PROVENIENTE DE PROTEÍNA) (%), G (PROPORÇÃO DE ENERGIA PROVENIENTE DE LIPÍDEOS) (%) E G/P DA MERENDA DAS ESCOLAS DE CAMPINAS^a

Escola	P(%) ^b	G(%) ^b	G/P ^b
1	$13,6 \pm 2,0$	$21,0 \pm 12,1$	$1,6 \pm 1,0$
2	$12,4 \pm 2,0$	$11,1 \pm 3,4$	$1,0 \pm 0,5$
3	$11,3 \pm 2,6$	$30,4 \pm 4,7$	$2,9 \pm 0,5$
4	$12,2 \pm 4,8$	$13,2 \pm 7,6$	$1,4 \pm 1,3$
5	$13,3 \pm 7,5$	$21,8 \pm 13,8$	$2,2 \pm 1,4$
6	$9,9 \pm 2,8$	$27,0 \pm 10,6$	$3,0 \pm 1,3$
Média geral	$12,9 \pm 2,9$	$25,2 \pm 8,2$	$2,1 \pm 0,9$
Faixa do Valor desejável	11 - 12	20 - 30	2,5 - 2,5

^a Valor médio de 5 repetições \pm desvio-padrão

^b Os valores não foram significativamente diferentes ($\alpha=0,05$), segundo o teste de Tukey.

^c Segundo Araya & Arroyave (17).

As porcentagens dos custos de sobras limpas em relação ao custo dos alimentos preparados (PSL) encontram-se na Tabela 4. Foram observados valores elevados de PSL, a média geral das instituições sendo de $36,5 \pm 23,8$ %. As médias de cada escola não foram significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Portanto, em geral nas escolas preparava-se mais alimentos do que o necessário para as crianças. Os valores de custos de restos foram insignificantes.

Os controles administrativos representavam, em geral, mais uma rotina burocrática do que uma forma de elevar a eficácia do serviço. Na verdade, não existia uma integração dos diversos tipos de controle: por exemplo, a Secretaria Municipal da Educação não controlava os dados relativos aos alimentos armazenados no Armazém Municipal da Merenda Escolar. Além disto, as quantidades de alimentos preparados, servidos, restos e sobras limpas, nem qualquer outro tipo de perda, não foram controladas.

As atividades como: formação de pessoal, supervisão foram realizadas raramente em 1989. Outras, como o controle de qualidade dos alimentos e as avaliações inexistentes. As

seguintes atividades complementares não foram realizadas: educação nutricional, participação da população, e integração com programas de saúde. Somente uma escola analisada tinha uma horta, sendo a sua produção insignificante.

TABELA 4
VALORES DE PSL (PORCENTAGEM DO CUSTO DA SOBRA LIMPA) (%) DA MERENDA ESCOLAR EM CAMPINAS^a

Escola	PSL (%)
1	$48,1 \pm 21,4$
2	$53,7 \pm 27,2$
3	$25,6 \pm 18,9$
4	$21,9 \pm 10,8$
5	$33,1 \pm 14,2$
6	$22,3 \pm 26,5$
Media geral	$36,5 \pm 23,8$

DISCUSSÃO

Os resultados encontrados para as adequações de energia ($48,6 \pm 17,3$ %) e de proteína ($52,7 \pm 17,2$ %) mostram que o programa pouco deve estar contribuindo para o melhoramento do estado nutricional das crianças. Estes dados estão de acordo com outro estudo (8) no qual o Programa de Merenda Escolar operava de modo similar ao caso analisado. Mas, eles são diferentes daqueles de outra pesquisa (5) onde determinou-se níveis de eficácia satisfatórios. Isto mostra a importância do pressuposto feito anteriormente, ou seja, que é conveniente associar-se a análise da eficácia de programas alimentares com o estudo da operacionalização.

Com efeito, a abordagem empregada no presente estudo (modelo de projeto alimentar), tem a vantagem de fornecer uma visão abrangente dos problemas operacionais do programa. Entretanto, este tipo de análise, muitas vezes se limita a indicar a necessidade de estudos mais aprofundados sobre pontos específicos da operacionalização (19). Levando em conta esse limite, destacou-se os seguintes entraves operacionais a eficácia e/ou impactos do programa.

Observou-se a deficiência de recursos: quantidade de recursos financeiros alocada escassa, infraestrutura precária de transporte, de armazenamento e para preparar refeições mais elaboradas, carência de recursos humanos administrativos e de merendeiras em cartas escolas (33 %). Além disto, não se recorria aos recursos comunitários. Estes fatores, não deixam de ser um obstáculo importante para que o programa atinja seus objetivos. Todavia o custo de operacionalização do PNAE em Campinas encontra-se na faixa de custo de ações similares em outros países (20). Na verdade, ao lado da escassez de recursos, encontrou-se que ocorriam desperdícios e distorções operacionais.

Os resultados obtidos sobre a porcentagem de custo de sobra limpa ($36,5 \pm 23,8$ %) estão de acordo com aqueles determinados nas escolas da Argentina (21). Este fato sugere que desperdícios e/ou desvios importantes ocorrem durante o preparo das refeições. Talvez, devido à dificuldade das merendeiras de controlar o número de alunos que desejam consumir a merenda, ou mesmo, pelo fato da alimentação preparada servir a outras pessoas que não o público alvo.

Outro ponto da destaque é a utilização de alimentos formulados. Na verdade, outra análise (8), que estudou um cardápio similar também determinou baixos valores de adequações. Isto, portanto sugere que o tipo de alimento oferecido representa um obstáculo para a eficácia do programa.

Os controles administrativos do programa deveriam ser um elemento fundamental da sua operacionalização, considerando-se os elevados níveis de desvios de recursos públicos no Brasil. Todavia, eles não estavam implementados de modo a facilitar auditorias e evitar perdas e desvios de recursos (22).

Outras atividades que visam aumentar a eficácia e os impactos do serviço como sugerido por vários trabalhos (11-13, 20, 22) não foram frequentemente empreendidas ou mesmo inexistiam: supervisão, formação de recursos humanos, controle de qualidade, avaliações, participação popular, produção de hortas escolares, educado nutricional e integração com programas de saúde.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEP) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelo financiamento concedido à presente pesquisa.

REFERENCIAS

1. Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição. Pesquisa nacional sobre saúde e nutrição: resultados preliminares. Brasília, INAN, 1990.
2. Mazzili R. Valor nutricional da merenda e sua contribuição para as recomendações nutricionais do pré-escolar matriculado no CEAPE. Rev Saúde Públ. 21:246-254, 1987.
3. Dall'Acqua FM. Economic adjustment and nutrition policies: evaluation of a school-lunch programme in Brazil. Food Nutrition Bull 13:202-209. 1991.
4. Kafuri R & SP Ramon. Pesquisa sobre a influência da alimentação escolar no rendimento das atividades discentes. Goiânia, UFG/INEP/SEC/CNAE/. 1985.
5. Silva MV da & R. de CC Pereira. Análise das dietas oferecidas pelo Programa de Merenda Escolar do Município de Piracicaba, SP. En: Anis do II Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: necessidades nutricionais. São Paulo, Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição p. 238. 1990.
6. Castro C de M. & P. Fletcher. A escola que os brasileiros frequentaram em 1985. Brasília, IPEA/IPLAN/CNRH, 1985.
7. Fundação de Assistência ao Estudante. Avaliação do Programa Municipalizado de Alimentação Escolar. Brasília 1986.
8. Nutti MR. Análise dos sistemas de alimentação escolar em cinco municípios do Estado de São Paulo. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 1986.
9. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estudo nacional de despesa familiar: tabelas de composição química de alimentos. Rio de Janeiro, 1977.
10. Pan American Health Organization. Increasing the operational capacity of the health services for the attainment of the goal of health for all by the year 2.000. (Scientific Publication # 482). Washington, 1985.
11. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Formulación de proyectos de alimentación a grupos escolares (PROPAG-Informe de grupo de Ttrabajo ad-hoc). San José, 1986.
12. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Gestión de programas de alimentación de grupos. (Estudio FAO: alimentación y nutrición, # 23). Roma, FAO, 1984.
13. Sachs I, A Bergeret, M Schiray, S Sigal, D Théry & K Vinaver. Initiation à l'écodéveloppement. Toulouse, Privat, 1981.
14. Gillespie S. Institution building for nutrition: development of a framework and identification of indicators for evaluation. Food Nutrition Bull 12:103-115, 1990.
15. Organización Mundial de la Salud. Evaluación de los programas de salud: normas fundamentales. Ginebra, OMS, 1981. (Serie Salud para Todos, 5).
16. Harper JM, CT Shigetomi, SD Mackin, PA Iyer & GR Jansen. Alternate lunch patterns in high schools: I. Labor requeriments and meal costs. J Am Diet Assoc 77: 152-159, 1980.
17. Araya H & G Arroyave. Relación del contenido energético proveniente de grasas y de proteínas como indicador de la potencialidad energética-proteínica de las dietas de poblaciones. Arch Latinaomer Nutri 29: 103-111, 1979.
18. Departamento de Assistência ao Escolar. Municipalização da Merenda Escolar. São Paulo, DAE, 1986.
19. Deleau M, JP Nioche, P Penz, & R Poinard. Evaluer les politiques publiques: méthodes, déontologie, organisation. Paris, La Documentation Française, 1986.
20. Beaton GH & Ghassemi. Supplementary feeding programs for young children in developing countries. Am J Clin Nutr 35:864-916, 1982.
21. Choen E & R Franco. Evaluación de proyectos sociales. Buenos Aires, Gel, 1988.
22. Anderson MA, JE Austin, JD Wray & MF Zeitlin. Nutrition interventions in developing countries: I. Supplementary feeding. Cambridge, Oelgeschlager, Gunn & Hain, 1981.

Recibido: 20-09-1993

Aceptado: 25-03-1995

Balance de minerales durante la recuperación nutricional en lactantes con desnutrición energético-proteica

María Verónica Marín Briano¹, Carlos Castillo Durán² y Ricardo Uauy Dagach³

Unidad de Nutrición Clínica, Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos, INTA, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

RESUMEN. Los requerimientos de minerales en los lactantes varían según la tasa de crecimiento, relacionándose con las demandas para permitir una adecuada composición del tejido ganado, asegurar una mineralización ósea óptima y mantener niveles plasmáticos normales. El período de recuperación de la desnutrición determina requerimientos aumentados de estos nutrientes, los que pueden no ser adecuadamente satisfechos con las fórmulas lácteas en uso.

Evaluamos la retención de Ca, P, Mg, Cu y Zn durante la recuperación nutricional, en 9 lactantes de sexo masculino desnutridos (edad: 2-7 meses, peso/edad <70%) alimentados con dos fórmulas lácteas, ambas con densidad energética de 85 Kcal/dL (356 KJoule/dL): una a base de leche de vaca entera en polvo y otra modificada, que aporta la densidad de minerales propuesta por las recomendaciones internacionales para lactantes sanos, comparamos los resultados con las retenciones de referencia para niños sanos de la misma edad, o de igual talla. Cada niño recibió leche de vaca (LP) y leche modificada (LPM) por 6 días, usándose los tres últimos días de cada período para balance.

El balance de Ca, Mg y P mostró que, a pesar de ingestas elevadas, las excreciones urinarias resultaron muy bajas en relación a lo normal. Las retenciones de Ca ($68,5 \pm 22,7$ mg/kg/d con LP y $61,4 \pm 16,7$ mg/kg/d con LPM) superaron en más de 3 veces lo esperado para igual edad (130 mg/d) y en 2,5 veces para igual talla (155 mg/d); las retenciones de Mg ($7,4 \pm 2,0$ mg/kg/d con LP y $3,4 \pm 1,2$ mg/kg/d con LPM) fueron muy superiores a las observadas en niños sanos (igual edad 2,7 mg/d, igual talla 3,3 mg/d); las retenciones de P ($74,8 \pm 7,1$ mg/kg/d con LP y $52,2 \pm 9,3$ mg/kg/d con LPM), fueron 4 a 5 veces mayores a las esperadas para igual talla (79 mg/d); hasta 6 veces superior para la edad (66 mg/d). En relación al Cu las retenciones fueron significativamente mayores con LPM que con LP ($13,8 \pm 14,0$ μ g/kg/d vs $40,0 \pm 13,2$ μ g/kg/d con LPM; $p < 0,001$); con LP éstas resultaron insuficientes en relación a las recomendaciones, lo cual no ocurrió con LPM, en que todos los balances fueron positivos y con un

SUMMARY. Mineral balance during nutritional recuperation of malnourished infants. Mineral requirements of normal infants change according to growth velocity. They are directly associated to needs for obtaining an adequate composition of new tissue, assure an optimal bone mineralization and for maintaining normal plasma mineral levels. Nutritional rehabilitation of malnourished infants determines increased mineral requirements, which may be not satisfied with usual infant formulas. We studied mineral retention (Ca, P, Mg, Zn and Cu) during nutritional recovery of 9 malnourished male infants (age: 2-7 mo; weight/age <70%), fed two formulas, both with 85 Kcal/dL (356 KJoule/dL): the first based on whole cow's milk (LP) and the second on a modified cow's milk containing mineral recommendations for normal infants (LPM); balances were compared to normal for age and for length. Infants received each formula for 6 days, with the last 3 days on a metabolic balance Ca, Mg, and P showed high intakes and very low urinary excretions, calcium retention ($68,5 \pm 22,7$ and $61,4 \pm 16,7$ mg/kg/d, for LP and LPM, respectively) were 3 times over normal mean for age (130 mg/d) and 2,5 times over the normal for length (155 mg/d). Mg retention ($7,4 \pm 2,0$ and $3,4 \pm 1,2$ mg/kg/d), for LP and LPM) were higher than normal for age (2,7 mg/d) or length (3,3 mg/d) and also those of P (LP: $74,8 \pm 7,1$; LPM: $52,2 \pm 9,3$ mg/kg/d), compared to a mean of 66 mg/d for the same age, or 79 mg/d for length. Zn retentions were comparable with both formulas (LP: $0,14 \pm 0,07$ vs LPM: $0,18 \pm 0,06$ mg/kg/d) and over normal requirements for age (0,3 mg/d) or length (0,5 mg/d). Copper retentions were significantly lower with LP than LPM ($13,8 \pm 14,0$ vs $40,0 \pm 13,2$ μ g/kg/d; $p < 0,01$), due to low intake with LP.

We conclude that a high mineral retention is observed in infants recovering from malnutrition, when they are fed formulas with mineral content over its normal recommendations.

1. Instructor, INTA.

2. Profesor Asociado, INTA.

3. Director INTA.

mínimo de retención superior al de un niño que recibe alimentación parenteral (20 µg/kg/d).

Respecto del Zn a pesar de que la ingesta con LPM fue mayor que con LP (531,8±70,9 µg/kg/d vs 452,9±62 µg/kg/d, $p < 0,001$), con ambas el promedio resultó bajo los 5 mg/d recomendados para lactantes sanos alimentados con fórmula. Las retenciones fueron similares (0,14±0,07 mg/kg/d con LP y 0,18±0,06 mg/kg/d con LPM) y en ambos casos los promedios sobrepasaron los 0,5 mg/d referidos como adecuados para un niño de igual talla 6 0,3 mg/d de igual edad. Concluimos que, los lactantes en recuperación nutricional muestran una alta capacidad de retener minerales, cuando estos se aportan en concentraciones superiores a las recomendadas para un niño sano. Cuando se aportan en concentraciones insuficientes, como ocurrió con el cobre y zinc en este estudio, las absorciones se elevan y las excreciones urinarias disminuyen, pero no logran compensar los requerimientos adicionales impuestos por el aumento en la velocidad de crecimiento. Nuestros resultados sugieren que para el período de recuperación nutricional, fórmulas con concentraciones de Ca, P y Mg mayores que las recomendadas por la RDA para niños sanos y similares a las de la leche de vaca, pueden ser más adecuadas. Con respecto a Cu y Zn las fórmulas deben aportar al menos la recomendación de la RDA.

INTRODUCCION

El tratamiento de la desnutrición energético-proteica debería, idealmente, permitir reponer reservas de nutrientes, alcanzar un crecimiento acelerado y un desarrollo psicomotor normal, reparar alteraciones producidas en la composición corporal y asegurar una mineralización ósea adecuada.

Whitehead (1) estimando la cantidad de proteína requerida para distintas tasas de crecimiento concluía que los niños que ganan 1 a 2 g/kg/d requieren aproximadamente 115 kcal/kg/d (481 KJoule/kg/d) y, de esta energía, un 6,7% como proteínas de alto valor biológico; mientras que aquellos que ganan 10 g/kg/d requieren 145 kcal/kg/d (606 Kjoule/kg/d) y un 11% de la energía como proteínas, considerando un costo energético de 4 Kcal (17 KJoule) por gramo de tejido ganado y de éste un 20% como tejido magro. Fjeld y cols (2) han reportado que la composición corporal de niños desnutridos, durante la fase temprana de recuperación nutricional, con tasas de ganancia de peso de 12 g/kg/d, es similar a la de aquellos que ganan 6 g/kg/d, cuando la dieta aporta un 11% de la energía como proteínas.

De esta manera podemos observar que si bien en el período temprano de recuperación de la desnutrición, tanto los requerimientos de energía como los de proteínas están aumentados en forma significativa, no lo hacen proporcionalmente, ya que cuando el requerimiento de energía aumenta en aproximadamente un 40%, el de proteínas aumenta en un 100%.

Del mismo modo como ocurre con las proteínas, niveles adecuados de macrominerales y minerales traza deberían estar disponibles para reponer reservas y ser incorporados al nuevo tejido sintetizado, de modo que no se altere la composición corporal, ni sean un limitante en la velocidad de recuperación.

Mientras no se disponga de mayor información acerca de

los requerimientos de estos minerales, las dietas usadas para el tratamiento de la desnutrición deben al menos satisfacer las recomendaciones de la RDA (Recommended Dietary Allowances) (3), reconociendo que ésta es sólo una aproximación a las necesidades reales en niños con desnutrición severa (4).

Pocos estudios han evaluado el balance de minerales durante este período, pero un número importante (5-8) ha sugerido que las fórmulas disponibles no aportan cantidades suficientes de zinc y de cobre para permitir una tasa de ganancia de peso máxima, durante la recuperación nutricional, haciéndose necesario por lo tanto, aportarlos como suplementos a la dieta si ésta es fundamentalmente láctea.

Las fórmulas en uso para la recuperación nutricional son en su mayoría a base de leche de vaca, la cual tiene un contenido excesivo de calcio, fósforo y magnesio para lactantes con velocidad de crecimiento normal (9-12), pero no se conoce qué tan inadecuadas pueden ser éstas para la rehabilitación nutricional en períodos en que la ganancia de peso puede llegar a ser varias veces la de un niño sano (13-14).

El propósito de este estudio fue evaluar la retención de minerales durante el período de recuperación nutricional. Estudiamos el balance de minerales en lactantes en recuperación nutricional alimentados con dos fórmulas lácteas: una a base de leche de vaca entera en polvo y otra modificada, que aporta la densidad de minerales propuesta por las recomendaciones internacionales para lactantes sanos (3). Para conocer posibles excesos y/o deficiencias en el balance de estos minerales durante un período de crecimiento rápido, como es el de recuperación de la desnutrición calórico-proteica, se compararon los resultados con las retenciones de referencia para niños de la misma talla y edad, con crecimiento y composición corporal normales (15-17, 20).

MATERIAL Y METODOS

Para este estudio se seleccionaron 9 lactantes de sexo masculino, con desnutrición primaria, hospitalizados por más de un mes en un centro cerrado de recuperación nutricional perteneciente a la Corporación para la Nutrición Infantil de Chile (CONIN). Previo al inicio del estudio se solicitó la autorización de los padres, mediante la firma de un consentimiento escrito e informado.

El peso promedio (±DE) al ingreso del estudio fue de 5,8±1,0 kg, la talla promedio de 60,5±5,4 cm. y la relación peso/talla (P/T) sobre el 85% del estándar de la OMS. Los lactantes tenían entre 3 y 10 meses de edad (promedio 7 meses), y una velocidad de crecimiento acelerada en relación a su edad (incremento observado 27,8% g/día, contra un incremento de peso esperado según estándar OMS -para la edad promedio- de 12,6 g/día). Se exigió que el peso de nacimiento fuera mayor de 2.000 g y que no se presentaran enfermedades agudas o crónicas.

Cada niño se sometió a dos períodos sucesivos de balance.

En uno de ellos recibió exclusivamente fórmula basada en leche de vaca en polvo (LP) y en otro sólo leche de vaca en polvo modificada (LPM). El orden en que fueron suministradas las fórmulas se asignó al azar. Cada período de alimentación tuvo una duración de 6 días, reservándose los tres primeros a adaptación a la fórmula y los tres siguientes a determinar el balance. Durante estos últimos se efectuó recolección de orina de 24 horas mediante recolectores fijados a la piel con aerosol adhesivo, para evitar filtraciones, las deposiciones se recolectaron con papel filtro agregado a pañales desechables, de modo de evitar la inmovilización del niño. Al mismo tiempo se midieron los volúmenes de leche ingeridos, por diferencia en el peso de las maderas antes y después de cada alimentación. Las pérdidas de alimentación, así como las de orina y de heces, se registraron adecuadamente.

Las fórmulas utilizadas para este estudio fueron a base de leche de vaca: la LP reconstituida al 10% con agregados de sacarosa 5%, maltosa-dextrina 1% y aceite 1%, mientras que la LPM se reconstituyó al 15%, con agregados de maltosa-dextrina al 2,5%, siendo ambas fórmulas isoérgicas, 85 Kcal/dL (356 KJoule/dL). En cuanto a la concentración de minerales de cada fórmula, a la LP no se le hizo cambios -de modo que fue la habitual de la leche de vaca, pero con disminución en la densidad de estos nutrimentos en relación a la energía, dada por el hecho de agregar hidratos de carbono y lípidos, y a la LPM se le disminuyó la concentración de calcio, fósforo y magnesio en aproximadamente un 30% y se le aumentaron las concentraciones de cobre (60%) y zinc (25%), con el propósito de que el contenido de estos minerales, por cada 100 calorías (418 KJoule), fuera el recomendado por la RDA (3) (Tabla 1). Se debe señalar, sin embargo, que en lo que se refiere al zinc, la fórmula fue diseñada para tener una concentración de 5 mg/L y en la práctica resultó tener sólo 4 mg/L.

TABLA 1
MINERALES DE LAS FORMULAS EN ESTUDIO (100 KCAL ó/418 K JOULE DE LECHE RECONSTITUIDA), EN RELACIÓN A LAS RECOMENDACIONES PARA LACTANTES.

Mineral	Recomendación (RDA, 6-12 meses)	Leche de vaca (+H.C.+ lípidos)	Leche Modificada
Calcio (mg)	70-90	112	88
Fósforo (mg)	60-70	80	56
Magnesio (mg)	7-9	11	7
Zinc (mg)	0,6-0,7	0,35	0,47
Cobre (µg)	60	34	80

Se tomaron alícuotas de los alimentos ingeridos, heces y orina para medir el contenido de calcio, fósforo, magnesio, cobre y zinc, mediante espectrofotometría de absorción atómica (18) para el caso de cobre, zinc, calcio y magnesio; y una técnica fotocolorimétrica (19), para el caso de fósforo.

Las muestras de deposiciones tomadas para el análisis del fósforo resultaron escasas en algunas recolecciones, por lo que los resultados de retención, en el caso de este mineral, corresponden a 5 niños de los 9 niños estudiados.

Como patrón de normalidad, contra el cual comparar los resultados obtenidos, se tomaron el aumento de peso y la composición del tejido ganado esperados para la edad y la talla, según Fomon et al (17), en consideración a que la edad es un factor determinante de la composición corporal tratándose de niños eutróficos, teniendo en cuenta además, que los niños que se recuperan de una desnutrición energético-proteica deben ganar proporcionalmente un mayor porcentaje de tejido no grasa, para que junto con recuperar peso, alcancen una composición corporal adecuada a la talla, lo que determina que las retenciones de minerales esperables sean mayores que para la edad cronológica y al menos adecuadas a la talla que presentan. Como estándares de balance y retención de calcio, magnesio y fósforo de lactantes con crecimiento y composición corporal normales para la edad y la talla, se usaron los valores comunicados por Fomon y cols (16); para zinc los de Ziegler et al (21) más los de Krebs et al (22); y para cobre, los resultados de estudios de balance en niños sometidos a nutrición parenteral (23), dada la escasez de datos de balance en niños de esta edad. La ingesta de estos nutrimentos para lactantes menores de 1 año recomendada por la RDA (3) fue considerada como el mínimo necesario para satisfacer los requerimientos durante este período de recuperación de la desnutrición. El análisis estadístico incluyó determinaciones de promedios y desviaciones estándares y pruebas de t de student entre variables seleccionadas.

RESULTADOS

Antropometría: El peso promedio de los niños durante los períodos de balance, con ambas fórmulas, fue similar, con una relación P/E promedio de 69% del estándar OMS (5,75 kgs y 5,85 kg respectivamente) (14), una talla promedio de 60,5 cm, con relación T/E de 87% y P/T de 100% del estándar OMS. El incremento de peso mientras recibían LP fue de 26,6 g/día (4,45±5,1 g/Kg/d) y con LPM 29,6 g/día (5,05±5,7 g/Kg/d), incremento que corresponde a lo esperado para la talla y que es el doble de lo esperado para la edad, según valores de referencia de Fomon et al (16), (29,9 g/d para un niño de una talla de 60,5 cm y 12,6 g/d para un niño de 7 meses).

Calcio: Como era de esperar, la ingestión de este mineral fue significativamente mayor cuando los lactantes recibían LP (143,5±19,6 mg/kg/d para LP, vs 106,3±14,1 mg/kg/d para LPM, p<0,001); y, con ambas fórmulas de ingestión fue una y media veces la recomendación de 60 mg/kg/d para lactantes normales menores de 1 año (3). A pesar de esta ingesta en teoría excesiva, las excreciones urinarias resultaron extremadamente bajas (0,82±0,5 mg/kg/d con LP y 0,78±0,5 mg/kg/d con LPM, fluctuando el valor normal en la literatura entre

2 y 8 mg/kg/d»15"). El porcentaje de absorción fue mayor con LPM (48±14,6% con LP y 59,4±16,7 % con LPM), sin alcanzar significación estadística, pero si lo suficiente para permitir que la retención fuera similar durante ambos periodos del estudio (68,5±22,7 mg/Kg/d con LP y 61,4±16 mg/Kg/d con LPM) (Tabla 2), y aproximadamente 3 veces lo esperado para niños de igual edad y 2,5 veces para la talla (16) (Tabla 2 y Figura 1).

Magnesio: La retención de magnesio con LP fue significativamente mayor que con LPM (7,4±2,0 mg/Kg/d con LP y 3,4±1,2 mg/Kg/d con LPM, p<0,01), lo que se relaciona con una ingesta significativamente mayor con la fórmula no modificada (13,8±1,9 mg/k/d con LP y 8,5±1,2 mg/k/d con LPM) más que con cambios significativos en los porcentajes de absorción aparente o niveles de excreción urinarios. Las retenciones reportadas en la literatura para niños sanos (igual talla 3,3 mg/d, igual edad 2,7 mg/d) (16) son muy inferiores a las observadas en este grupo de niños en recuperación nutricional (42,9 mg/d con LP y 19,7 mg/d con LPM), lo que puede relacionarse con la incertidumbre existente de la estimación de el aumento esperado de este mineral a las diferentes edades (Tabla 2).

TABLA 2
BALANCE DE CALCIO, MAGNESIO Y FOSFORO, EN LACTANTES DESNUTRIDOS EN RECUPERACION NUTRICIONAL, SEGUN FORMULAS EN ESTUDIO (N=9)*

	LP X±DE	LPM X±DE	p< t pareado
Calcio (mg/kg/día)			
Ingerido	143,5±19,6	106,3±14,1	0.001
Absorbido	69,3±22,9	62,1±16,1	NS
Absorción (% de ingesta)	48,0±14,6	59,4±16,7	NS
Excreción urinaria	0,82±0,5	0,78±0,5	NS
Retenido	68,5±22,7	61,4±16,0	NS
Retención (% de ingesta)	47,4±14,6	59,0±16,7	NS
Magnesio (mg/kg/día)			
Ingerido	13,8±1,9	8,5±1,2	0.001
Absorbido	7,5±2,1	3,5±1,2	0.001
Absorción (% de ingesta)	54,6±15,7	42,1±15,6	NS
Excreción urinaria	0,1±0,1	0,1±0,1	NS
Retenido	7,4±2,0	3,4±1,2	0.01
Retención (% de ingesta)	53,6±15,1	40,9±16,1	NS
Fósforo (mg/kg/día)			
Ingerido	110,2±8,8	70,5±7,6	
Absorbido	78,8±7,8	54,2±9,9	
Absorción (% de ingesta)	71,4±2,5	76,9±11,8	
Excreción urinaria	3,96±1,7	1,96±0,69	
Retenido	74,8±7,1	52,2±9,3	
Retención (% de ingesta)	67,8±1,3	74,1±11,5	

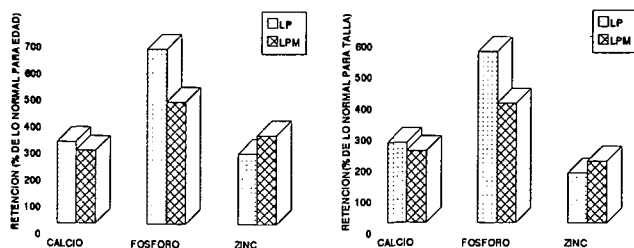
*Referidos a 9 estudios de balance con cada fórmula, excepto para fósforo en que se estudiaron 6.

Fósforo: Los resultados analizados para este mineral están referidos a sólo seis niños y no al total de los niños estudiados, por lo que no se efectuó estudio de significación. La ingesta fue mayor cuando recibían LP (110,2±8,8 mg/kg/d con LP y 70,5±7,6 mg/kg/d con LPM) y en ambos casos superior a los 40 a 60 mg/kg/d recomendados para menores de 1 año (Tabla 2). Los porcentajes de absorción y excreción urinaria fueron similares mientras recibían LP o LPM, lo que determinó retenciones 4 a 5 veces las esperadas para un niño sano de la misma talla; y hasta 6 veces superior a la esperada para la edad cuando recibían LP (retenciones esperadas para la edad 66 mg/d y para la talla 79 mg/d) (16) (Figura 1).

Retención de macrominerales de promedio diaria (calcio, magnesio y fósforo): la composición del tejido ganado varió según la retención promedio diaria de estos minerales, con las dos fórmulas. Mientras recibían LP el nuevo tejido tenía mayor concentración de estos minerales que con LPM (875 mg/d y 678 mg/d respectivamente), y superior a los 600 mg/d que retiene un niño sano a igual ganancia de peso; o los 400 mg/d que retiene un niño sano de igual edad (17).

FIGURA 1

Porcentaje de retención de minerales Ca, P y Zn con ambas fórmulas en estudio, en lactantes desnutridos (n=9), en fase de recuperación nutricional, en comparación a lo normal para lactantes de la misma edad y de la misma talla.



Cobre: La Tabla 3 muestra que tanto la ingestión de cobre (44,4±6,1 µg/kg/d para LP y 97,2±12,7 µg/kg/d para LPM), como su retención (13,8±14 µg/kg/d con LP y 40,0±12,7 µg/kg/d con LPM) son mayores con LPM (p<0.001). Cuando los lactantes recibieron LP las retenciones resultaron insuficientes, lo cual no ocurrió con la LPM ya que todos los balances fueron positivos y con un mínimo de retención superior al de un niño que recibe nutrición parenteral (20 µg/kg/d) (23).

Zinc: A pesar de que la ingesta de zinc con LPM fue significativamente mayor que con LP (531,8±70,9 µg/kg/d vs 452,9±62 µg/kg/d, p<0.001), con ambas la ingesta promedio de zinc fue insuficiente en relación a los 5 mg/d (3) recomendados para lactantes alimentados con fórmula. Las retenciones fueron similares (14,01±76 µg/kg/d con LP y 179,6±62,9 µg/kg/d con LPM) y en ambos casos los promedios sobrepasaron el nivel indicado como adecuado para

lactantes que reciben nutrición parenteral (100 µg/kg/d) (23) (Tabla 3); o los 0,5 mg/d referidos como adecuados para un niño de igual talla y 0,3 mg/d a igual edad (22) (Figura 1).

TABLA 3
BALANCE DE COBRE Y ZINC, EN LACTANTES
DESNUTRIDOS EN RECUPERACION NUTRICIONAL,
SEGUN FORMULAS EN ESTUDIO*

	LP X±DE	LPM X±DE	p< t pareado
Cobre (µg/kg/día)			
Ingerido	44,4±6,1	97,2±12,7	0.001
Absorbido	13,9±14,1	40,1±13,2	0.01
Absorción (% de ingesta)	33,4±30,1	41,2±12,4	NS
Excreción urinaria	0,1±0,1	0,1±0,1	NS
Retenido	3,8±14,0	40,0±13,2	0.01
Retención (% de ingesta)	33,2±30,1	41,0±12,4	NS
Zinc (µg/kg/día)			
Ingerido	452,9±62,0	531,8±70,9	0.01
Absorbido	140,4±76,0	179,8±63,0	NS
Absorción (% de ingesta)	30,0±13,8	35,0±15,4	NS
Excreción urinaria	0,24±0,16	0,20±0,13	NS
Retenido	140,1±76,0	179,6±62,9	NS
Retención (% de ingesta)	29,9±13,9	34,9±15,3	NS

* Referidos a 9 estudios de balance con cada fórmula.

DISCUSION

Los requerimientos de minerales en los lactantes varían según la tasa de crecimiento, relacionándose directamente con las demandas para permitir una adecuada composición del tejido ganado, asegurar una mineralización ósea óptima y mantener niveles plasmáticos normales (20).

Combinando datos de varias fuentes y usando algunos supuestos, Fomon et al (17) han establecido la composición corporal y la composición del tejido ganado en un niño normal a las distintas edades, desde el período de recién nacido hasta los 10 años de edad. Considerando estos antecedentes, un lactante de talla similar a la de los niños bajo estudio crece en promedio 1,1 cm/d; gana en peso 29,9 g/d y la composición del tejido ganado es 12,9 g/d de tejido graso y 17 g/d de tejido magro -del cual 600 mg/d corresponden a minerales- Observamos que este grupo de lactantes incrementó en peso lo esperado para la talla, pero retuvo un 45% más de minerales cuando la fórmula aportaba concentraciones de calcio, fósforo y magnesio superiores a las recomendadas por la RDA. Al tomar como valores de referencia los reportados para lactantes de igual edad (edad promedio 7 meses), observamos que el aumento de peso esperado es 12,6 g/d y la retención de minerales promedio diaria de 400 mg, de modo que el aumento de peso y la retención de minerales observada, cuando los lactantes recibían LP, corresponden a valores superiores al doble de lo esperado, lo que sería indicativo de una composición más adecuada del tejido ganado que con

LPM, en que el aumento de peso fue mayor del doble de lo esperado para la edad y la retención de minerales no alcanzó a doblar la esperada.

El balance de estos minerales mostró que, a pesar del corto período de adaptación y de las ingestas teóricamente excesivas, las absorciones aparentes con leche de vaca tendieron a ser más altas que las esperadas y las excreciones urinarias más bajas, ambas compatibles con las observadas durante períodos de adaptación a ingestas insuficientes o requerimientos aumentados por crecimiento acelerado, como es el período de recuperación de la desnutrición (3, 24).

El valor promedio observado por nosotros en la fracción de absorción de calcio no fue tan alto como el reportado por Portela y cols (25) en niños en recuperación nutricional (65,2±15,8%), probablemente debido a que su grupo de lactantes se encontraba en el período inicial de la recuperación nutricional, en que la ganancia de peso es mayor que en periodos posteriores, y el tejido ganado es principalmente magro (26) y por lo tanto rico en minerales.

En ningún caso se observaron excreciones urinarias de calcio, magnesio y/o fósforo sobre los valores normales, de modo que no podríamos asumir que la absorción de estos nutrientes resultara excesiva respecto a los requerimientos, ni tampoco que con los niveles de aporte señalados se produjeran efectos deletéreos en niños en recuperación nutricional. Dado que no se han encontrado evidencias que una mayor mineralización ósea pueda tener efectos adversos (13), nuestros resultados sugieren que para el período de recuperación nutricional fórmulas con concentraciones de éstos minerales mayores que las recomendadas por la RDA, pueden ser más adecuadas.

En relación al cobre, las retenciones fueron absolutamente insuficientes mientras recibían LP, incluso al compararlas con los valores de referencia para niños sanos con ganancia de peso normal, lo cual confirma una vez más lo reportado repetidamente en la literatura, en relación a los insuficientes aportes de cobre de las dietas basadas en leche de vaca, para la recuperación nutricional (27, 29, 30). La concentración de 0,6 mg/L recomendada por la RDA (3) y usada en este estudio en la LPM, mostró retenciones adecuadas para niños sanos. Estudios más prolongados relacionados con períodos de recuperación nutricional son necesarios para asegurar que esta concentración resulta suficiente para prevenir los riesgos que hemos observado en estudios anteriores relativos a lactantes desnutridos alimentados con leche de vaca, como menor velocidad de crecimiento, leucopenia, neutropenia, alteraciones en la función inmune y mayor riesgo de infecciones severas (8, 29).

Las fracciones de absorción de zinc observadas en este estudio se ubican en el rango normal alto del reportado como habitual con fórmulas lácteas en lactantes normales (24, 25), hecho que indica que los principales factores en el control de la homeostasis y regulación en la absorción de zinc en las células de la mucosa intestinal, son la ingesta de zinc y las reservas tisulares (3, 22). En este caso las ingestas fueron insuficientes y los depósitos probablemente estaban depletados

por tratarse de desnutridos en recuperación. Gracias a tales absorciones elevadas y excreciones urinarias mínimas, la retención promedio para este mineral fue adecuada para un lactante sano con ambas fórmulas, pero podría no ser suficiente para mantener una velocidad de crecimiento acelerada (5, 6), con adecuada composición corporal y función inmune.

Concluimos que cuando los minerales son aportados en concentraciones más elevadas que las recomendadas para lactantes sanos (calcio, magnesio y fósforo), los lactantes en recuperación nutricional muestran una alta capacidad de retenerlos, probablemente relacionada con la ganancia de peso acelerada y reposición de depósitos depletados. Cuando se aportan en concentraciones insuficientes, como ocurrió con el cobre y zinc en este estudio, las absorciones se elevan y las excreciones urinarias disminuyen, pero no logran compensar los requerimientos adicionales impuestos por el aumento en la velocidad de crecimiento, siendo esta situación la que puede explicar los signos de deficiencia de minerales observados durante la recuperación nutricional en nuestro medio.

Nuestros resultados sugieren que para el período de recuperación nutricional, fórmulas con concentraciones de Ca, P y Mg mayores que las recomendadas por la RDA para niños sanos y similares a las de la leche de vaca, pueden ser más adecuadas. Con respecto a Cu y Zn las fórmulas deben aportar al menos la recomendación de la RDA.

REFERENCIAS

- Whitehead RG. Protein and energy requirements of young children living in the developing countries to allow for catch-up growth after infections. *Am J Clin Nutr* 30:1545-1547, 1977.
- Fjeld CR, DA Schoeller, KH Brown. Body composition of children recovering from severe protein-energy malnutrition at two rates of catch-up growth. *Am J Clin Nutr* 50: 1266-1275. 1989.
- Food and Nutrition Board: Recommended Dietary Allowances 10th ed. Washington, DC, National Academy Press, 50:1266-1275. 1989.
- Brown KH. Appropriate diets for the rehabilitation of malnourished children in the community setting. *Acta Paediatr Scand Suppl* 374:151-159, 1991.
- Golden MHN, Golden BE. Effect of zinc supplementation on the dietary intake, rate of weight gain, and energy cost of tissue deposition in children recovering from severe malnutrition. *Am J Clin Nutr* 34:900-908, 1981.
- Castillo-Durán C, G. Heresi, M. Fisberg, R. Uauy. Controlled trial of zinc supplementation during recovery from malnutrition: effects on growth and immune function. *Am J Clin Nutr* 45:602-608, 1987.
- Khauman S., AN Alam, I. Anwar, M. Akbar Ali, M. Mujibur Rahaman. Effect of zinc supplementation on the dietary intake and weight gain of Bangladeshi children recovering from protein-energy malnutrition. *Eur J Clin Nutr* 42:709-714, 1988.
- Castillo-Durán C., R. Uauy. Copper deficiency impairs growth of infant recovering from malnutrition. *Am J Clin Nutr* 47:710-714, 1988.
- De Vizia B, SJ. Fomon, SE Nelson, BE. Edwards, EE. Ziegler. Effects of dietary calcium on metabolic balance of normal infants. *Pediatr Res* 19:800-806, 1985.
- King J., S. De Pablo, F. Montes de Oca, R. Uauy. Formulación, fabricación y evaluación de una fórmula láctea para el Programa de Alimentación Complementaria en Chile. *Rev Chil Pediatr* 62: 1-7, 1991.
- Clark I. Metabolic interrelations of calcium, magnesium, and phosphate. *Am J Physiol* 217:871-877, 1969.
- Castillo-Durán C., V. Marín, G. Barrera, V. Gattás, R. Uauy. Absorción de minerales de una nueva fórmula láctea propuesta para el Programa Nacional de Alimentación Complementaria *Rev Child Ped.* 63:245-249, 1992.
- Greer FR. Calcium, phosphorus, and magnesium: How much is too much for infant formulas. *J Nutr.* 119:S1846-S1851, 1989.
- OMS. Medición del cambio del estado nutricional Publicaciones OMS, Ginebra 1983.
- Proessman W., N. Favere, L. Goos. Urinary Calcium Creatinine ratio in healthy newborns symposium, Ninth congress of the International Pediatric Nephrology Association, 1992.
- Fomon SJ. Infant Nutrition, 2nd ed. WB Saunders, Philadelphia: 273. 1974.
- Fomon SJ, F. Haschke, E. Ziegler, S.E. Nelson. Body composition of reference children from birth to age 10 years. *Am J Clin Nutr* 32:1169-1175. 1982.
- Fernández EJ., HL. Kahn. Clinical method for atomic absorption spectroscopy. *Clin Chem Newslett* 3:24028, 1971.
- Boltz DF., Mellon MG. Spectrophotometric determination of phosphorus as molybdiphosphoric acid. *Anal Chem* 20:749, 1948.
- Hillman L. Mineral and vitamin D adequacy in infants fed human milk or formula between 6 and 12 months of age *J Pediatr* 117: S134-S142, 1990.
- Ziegler EE., BB. Edwards, RL. Jensen et al. Zinc balance studies in normal infants. En: Kirchgessner M (ed), Trace Elemental Metabolism in Man and Animals-3. Universitat Munchen, Fresing-Weihenstephan, pp292-295. 1978.
- Krebs N.F., Hambidge K.M. Zinc requirements and zinc intakes of breast-fed infants. *Am J Clin Nutr* 45:288-292, 1986.
- American Medical Association. Guidelines for essential trace elements preparations for parenteral use. *JAMA* 241:2051-2054, 1976.
- Fraser D.R.: Nutritional growth retardation: experimental studies with special reference to calcium. In: Linear Growth Retardation in Less Developed Countries. J.C. Waterlow (Ed) Nestec, Vevey/Raven Press, New York, pp 127-141. 1988.
- de Portela ML., S. Zeni, N. Piazza, ME. Rio. Calcium balance in infants recovering from undernutrition. *Nutr Rep Int* 26:1045-1051, 1982.
- Uauy R. Metabolismo energético: Aspectos teóricos y prácticos. Comentario. *Nutrición Clínica en la Infancia.* Nestlé Nutrition, Raven Press, New York, pp 92-94. 1985.
- Lönnerdal B., JG Bell, CL. Keen. Copper absorption from human milk, cow's milk, and infant formulas using a suckling rat model. *Am J Clin Nutr* 42:836-844, 1985.
- Milner JA. Trace minerals in the nutrition of children *J Pediatr* 117:S147-S155, 1990.
- Heresi G., C. Castillo-Durán, C. Muñoz, M. Arévalo, L. Schlesinger. Phagocytosis and immunoglobulins levels in hypocupremic infants *Nutr Res* 5:1327-1334, 1985.
- Naveh Y, A. Hazani, M. Berant. Copper Deficiency with cow's milk diet. *Pediatr* 68:397-400, 1981.

Recibido: 09-05-1994

Aceptado: 02-06-1995

Mineralización ósea e ingesta de calcio en escolares chilenos

Laura Leiva¹, Raquel Burrows², Ricardo Lillo³, Hugo Pumarino⁴ y Santiago Muzzo⁵

Universidad de Chile

RESUMEN. Se evaluó la mineralización ósea en 36 escolares con ingesta de calcio menor del 50% de la recomendación para la edad. Se compararon con 28 escolares con ingesta sobre el 100% de la recomendación de la RDA. El rango de edad de los escolares estuvo entre 86 y 178 meses. La ingesta de calcio se determinó mediante 3 encuestas recordatorias de 24 hrs. Se determinó el porcentaje de adecuación de la talla para la edad (T/E) y peso para la talla de acuerdo al percentil 50 de las tablas OMS y el grado de desarrollo puberal alcanzado de acuerdo a los estadios de Tanner. Mediante un densitómetro óseo modelo Norland 2600 (Gd153) se determinó la densidad mineral ósea (DMO) y la masa ósea total (MOT) a nivel de cuerpo entero, columna lumbar y cuello femoral. Se encontró que el grupo con ingesta de calcio menor del 50% tenía un porcentaje de adecuación de la T/E ($97,7 \pm 4,0\%$), de la MOT ($98,9 \pm 17,9\%$) y de la DMO ($97,8 \pm 7,9\%$) de cuerpo entero significativamente menor que la del grupo con consumo mayor del 100% ($115,9 \pm 17,4\%$), ($109,7 \pm 18,0\%$) y ($104,7 \pm 11,1\%$) respectivamente. En columna se apreció una marcada tendencia a una menor adecuación de la MOT y de la DMO en los de baja ingesta, sin que las diferencias alcanzaran a ser estadísticamente significativas entre ambos grupos. Los datos obtenidos demuestran que el grupo con baja ingesta de calcio tiene un crecimiento estatural y una mineralización ósea menor que el grupo con consumo de calcio por sobre la recomendación. Se discuten las causas y el rol del calcio en estas diferencias.

SUMMARY. Bone mineralization and calcium intake in school age children. Bone mineralization was evaluated in 36 school age children with calcium intake below 50% of Recommended Dietary Allowances (RDA), and compared with 28 school age children with calcium intake higher than 100% of the RDA. The total group was aged between 86 and 178 months. The calcium intake was evaluated by 24 hours recordatory survey. Height for age and weight for height were evaluated according to WHO tables. Puberal development was evaluated according to Tanner stages. Bone mineral density (BMD) and total bone mas (TBM) of whole body, spine and femoral neck were measured with Norland 2600 densitometer. School age children with intakes below 50% of RDA had lower height for age adequation ($97,7 \pm 4,0\%$), whole body TBM adequation ($98,9 \pm 17,9\%$) and BMD adequation ($97,8 \pm 7,9\%$) than those ingesting more than 100% of the RDA ($115,9 \pm 17,4\%$), ($109,7 \pm 18,0\%$) and ($104,7 \pm 11,1\%$) respectively. In spine, however, there was a clear tendency to be lower, there were no significant differences between both groups. There were no differences in femoral necks BMD adequation, or TBM adequation between both groups. These results show that children with calcium intake below 50% of the recommendation has lower adequation of statural growth and bone mineralization. The role of calcium in the differences founded in this study is discussed.

INTRODUCCION

Durante la edad escolar y la adolescencia, la mineralización y el crecimiento óseo de niños normales presenta tres fases: una prepuberal con velocidad de crecimiento estatural y mineralización ósea moderada, una segunda fase durante el

estirón puberal con intenso crecimiento estatural y mineralización ósea y una tercera fase con una baja tasa de crecimiento lineal acompañada de una intensa mineralización (1). En estas etapas de la mineralización ósea influyen factores genéticos, no modificables y factores ambientales, susceptibles de modificar, como el estilo de vida (actividad física, nutrición, hábito de fumar, ingesta de alcohol, entre otros). Entre los factores nutricionales se ha sugerido que el calcio jugaría un rol fundamental en la obtención de la masa ósea máxima (2). La adquisición de una masa ósea óptima durante las dos primeras décadas de la vida constituiría la mejor prevención de la osteoporosis en la vida de adulto mayor (3). En la población norteamericana, se ha descrito que el consumo de

1 Unidad de Endocrinología. Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA). Universidad de Chile.

2 Departamento de Medicina Nuclear. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

3 Departamento de Endocrinología. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

calcio disminuye a medida que aumenta la edad y que esta disminución de la ingesta comenzaría a edades en que aún la masa ósea está en formación (4).

La Recommended Dietary Allowances (RDA) (5), recomienda una ingesta diaria de calcio de 800 mg/día para los escolares menores de 11 años y de 1200 mg/día para el grupo de 11 a 19 años.

En un estudio efectuado en una población de escolares chilenos, encontramos que solo un 36% de los escolares mayores de 11 años tenía una ingesta de calcio igual o superior a la recomendación de la RDA (6).

El propósito del presente trabajo fue evaluar, mediante densitometría ósea bifotónica la mineralización ósea de escolares de ambos sexos, pre puberes y puberes, de acuerdo a su ingesta de calcio.

MATERIAL Y METODO

Se seleccionaron en forma dirigida 64 escolares, de ambos sexos con edades entre los 86 y los 178 meses, de acuerdo a su ingesta de calcio, la que se determinó mediante 3 encuestas de recordatorio de 24 horas, efectuadas en días hábiles no consecutivos, de modo de considerar un día de fin de semana. Para el cálculo de nutrientes se utilizó la tabla chilena de composición de los alimentos (7). La adecuación de la ingesta de calcio se calculó según la recomendación para la edad de la RDA, quedando formados dos grupos, uno de 36 niños con ingestas bajo el 50% de la recomendación y otro de 28 niños cuyas ingestas estaban por sobre la recomendación (>100%). La talla se evaluó mediante un cartabón y el peso con una balanza de precisión. Se calculó el porcentaje de adecuación de la talla para la edad y del peso para la talla de acuerdo al percentilo 50 de las tablas OMS. Se evaluó el grado de desarrollo puberal alcanzado de acuerdo a los estadios de Tanner. La mineralización ósea se midió utilizando un densitómetro óseo radioisotópico con fuente de Gd153, modelo Norland 2600 (Dicromatic Bone Densitometer, Norland Corporation 1987). Las mediciones se realizaron en cuerpo entero, cadera y columna lumbar (L2-L4). La masa ósea total (MOT) y la densidad mineral ósea (DMO) se expresaron como porcentaje de adecuación y desviación típica (puntaje z) del valor promedio obtenido en una población normal de escolares de igual edad y sexo (7). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba de t Student.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra algunas características antropométricas de los escolares de acuerdo a su ingesta de calcio y al grado de desarrollo puberal alcanzado. Se observa que tanto los escolares prepúberes como los púberes con ingesta de calcio bajo el 50% de la recomendación presentaron una adecuación de la talla para la edad significativamente menor que los que tuvieron

una ingesta por sobre la recomendación ($p < 0,05$). No se encontró una diferencia significativa en la adecuación del peso para la talla entre ambos grupos.

TABLA 1
ADECUACION NUTRICIONAL Y ESTADUAL DE LAS ESCOLARES, SEGUN INGESTA DE CALCIO Y DESARROLLO PUBERAL

Estadio puberal	Ingesta Calcio < 50 %		> 100 %	
	P/T	T/E	P/T	T/E
Prepuberes	114,4 ± 15,6 (10)	110,8 ± 16,5 (17)	96,6 ± 4,8 (10)	101,8 ± 4,1 (17)
Puberes	106,6 ± 18,4 (25)	126,8 ± 74,3 (11)	97,8 ± 3,8 (25)	101,3 ± 4,3 (11)
TOTAL	115,9 ± 17,4 (35)	117,1 ± 48,9 (28)	97,7 ± 4,0 (35)	101,6 ± 4,2 (28)

a= X ± D.E. (Número de casos)

* = Significancia ($p < 0,05$) según t de Student <0,05 entre <50 vs <100 %

La Tabla 2, presenta la mineralización ósea a nivel de cuerpo entero. Al analizar el grupo total se encontró una MOT y una DMO significativamente menor en el grupo con consumo de calcio bajo el 50%, comparado con los de consumo sobre el 100% de la recomendación ($p < 0,025$ y $< 0,01$ respectivamente). Del mismo modo, se aprecia una desviación típica significativamente más alejada y por debajo del promedio en el grupo con consumo menor al 50%. De acuerdo al grado de desarrollo puberal alcanzado, solo se encontró una densidad mineral significativamente menor en los escolares púberes. En los escolares prepúberes se aprecia una tendencia a una menor mineralización en el grupo con menor ingesta, sin que esta diferencia alcance a ser estadísticamente significativa.

TABLA 2
MINERALIZACION OSEA EN CUERPO ENTERO DE ESCOLARES SEGUN INGESTA DE CALCIO Y DESARROLLO PUBERAL

Ingesta	M. O. T.					
	PREPUBERES		PUBERES		GRUPO TOTAL	
	%	z	%	z	%	z
<50 %	97,3 ± 12,9 (10)	-0,16 ± 0,77 (10)	100,0 ± 19,7 (25)	-0,008 ± 1,02 (25)	98,9 ± 17,9 (36)	-0,0,7 ± 0,96 (36)
>100 %	108,1 ± 17,8 (17)	0,48 ± 1,04 (17)	112,2 ± 17,9 (11)	0,63 ± 0,98 (11)	109,7 ± 18,0 (28)	0,54 ± 1,02 (28)
	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	p<0,025	p<0,02
	%	z	D. M. O. %	z	%	z
<50 %	97,0 ± 7,9 (10)	-0,4 ± 1,1 (10)	98,4 ± 7,8 (25)	-0,14 ± 0,82 (25)	97,8 ± 7,9 (36)	-0,25 ± 0,92 (36)
>100 %	103,0 ± 10,5 (17)	0,22 ± 1,04 (17)	107,3 ± 11,4 (11)	0,74 ± 1,01 (11)	104,7 ± 11,1 (28)	0,42 ± 1,06 (28)
	N.S.	N.S.	p<0,005	p<0,025	p<0,01	p<0,02

a= X D.E. (número de casos)

* = Significancia (p<0.05) según t de Student entre <50 % vs. > 100 %

Tanto en columna lumbar (Tabla 3) como en cuello femoral (Tabla 4) se encontraron diferencias en el porcentaje de adecuación del CMO y de la DMO entre ambos grupos, pero sin llegar a ser significativas.

TABLA 3
MINERALIZACION OSEA EN COLUMNA LUMBAR (L2-L4) DE ESCOLARES SEGUN LA INGESTA DE CALCIO Y DESARROLLO PUBERAL

	M. O. T.			
	PREPUBERES		PUBERES	
	%	z	%	z
<50	99,3 ± 14,3 (10)	-0,03 ± 0,7 (10)	99,5 ± 23,5 (26)	0,02 ± 1,2 (26)
>100	106,8 ± 21,2 (16)	0,30 ± 0,9 (16)	111,3 ± 19,4 (11)	0,47 ± 1,0 (11)
	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	%	D. M. O. z	%	z
<50	104,7 ± 8,9 (10)	0,25 ± 0,6 (10)	99,0 ± 13,5 (26)	-0,09 ± 1,0 (26)
>100	103,6 ± 20,1 (16)	0,24 ± 1,1 (16)	106,1 ± 13,5 (11)	0,70 ± 1,4 (11)
	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

a= X D.E. (número de casos) b = Significancia según t de Student

TABLA 4
MINERALIZACION OSEA EN CUELLO FEMORAL DE ESCOLARES SEGUN LA INGESTA DE CALCIO Y DESARROLLO PUBERAL

	M. O. T.			
	PREPUBERES		PUBERES	
	%	z	%	z
<50	99,4 ± 7,7 (10)	-0,02 ± 0,36 (10)	100,9 ± 13,8 (25)	0,05 ± 0,8 (25)
>100	91,9 ± 23,7 (16)	-0,42 ± 1,2 (16)	111,6 ± 17,2 (10)	0,50 ± 0,7 (10)
	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	%	D. M. O. z	%	z
<50	97,8 ± 5,3 (10)	-0,08 ± 0,46 (10)	100,4 ± 11,9 (25)	0,07 ± 0,9 (25)
>100	100,2 ± 12,9 (16)	0,03 ± 0,9 (16)	104,3 ± 10,9 (10)	0,37 ± 0,8 (10)
	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

a= X ± D.E. (número de casos)

b = Significancia según t de Student

La Tabla 5 muestra la ingesta de proteínas y de calorías expresadas como promedio del porcentaje de adecuación a la recomendación para la edad y sexo. Los escolares con consu-

mo de calcio bajo el 50% de la recomendación, tuvieron una adecuación del consumo de proteínas significativamente menor que los de consumo de calcio por sobre la recomendación. En cuanto a la adecuación del consumo de calorías, no se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos. El consumo de calcio, expresado como mg Ca/Kg/día y como promedio de adecuación fue significativamente menor en el grupo con bajo consumo de calcio.

TABLA 5
INGESTA DE NUTRIENTES DE LAS ESCOLARES

	Kcal (%)	Proteínas (%)	Calcio mg/Kg/día	%
	(a)			
<50%	96 ± 21 (34)	95 ± 28 (37)	10 ± 3 (37)	38 ± 8 (37)
>100%	98 ± 28 (28)	174 ± 57 (28) * *	33 ± 9 (28) *	131 ± 31 (28)

a= X ± D.E. (número de casos)

* = p<0,001 según t de Student entre <50% vs >100%

DISCUSION

Recientemente se publicaron las características de la ingesta de calcio en una población de escolares chilenos, mostrando que un alto porcentaje de los menores de 11 años cumplen con la recomendación de calcio de la RDA, mientras que sólo el 40% de los niños mayores de 11 años tienen un consumo adecuado (6). Dadas estas características resultó difícil, en el presente trabajo, reunir un mayor número de escolares menores de 11 años con ingesta baja y mayores de 11 con ingesta por sobre la recomendación. Por este motivo, para analizar los resultados del presente trabajo, se expresó la ingesta de calcio como porcentaje de adecuación de la recomendación de la RDA para la edad. El punto de corte utilizado corresponde aproximadamente a la ingesta de calcio que cubriría los requerimientos mínimos en las edades analizadas (9).

El hecho de encontrar que los escolares con ingesta de calcio por sobre la recomendación para la edad, tuvieron una MOT y una DMO de cuerpo entero significativamente mayor y un porcentaje de adecuación de la talla para la edad mayor, que los escolares cuyo consumo de calcio era menos del 50% de la recomendación, indicaría que una ingesta de calcio por sobre la recomendación para la edad permitiría un crecimiento estatural y una mineralización ósea mayores. Por otro lado, los escolares con mayor ingesta de calcio también tienen una mayor ingesta proteínica, lo que también podría estar influyendo en el mayor crecimiento esquelético. Sin embargo la influencia de la mayor ingesta proteica sobre la mineralización ósea debe interpretarse con cautela. Se sabe que la absorción de calcio

intestinal es favorecida por la presencia de proteínas en el lumen intestinal (10), pero por otro lado los regímenes hiperproteicos favorecen la excreción renal de calcio por aumento de la filtración glomerular (11).

El hecho de haber demostrado que, sólo los escolares púberes con baja ingesta de calcio tienen en cuerpo entero una MOT y una DMO significativamente menor, que los escolares con ingesta por sobre la recomendación, podría deberse a que el déficit de calcio en los prepúberes podría tener una corta data y por ello no haber producido aún un impacto detectable al momento del estudio o con este tamaño muestral. No obstante, nos parece que la tendencia de los resultados indica claramente que aún en los prepúberes una ingesta de calcio inferior al 50% de la recomendación, afectaría negativamente el desarrollo de estos escolares, lo que se traduce en una talla y mineralización ósea menores.

La falta de diferencias significativas en la mineralización ósea a nivel de columna y cuello femoral podría deberse a que el número de casos estudiados no fue suficiente para detectar el efecto de la ingesta de calcio, especialmente porque se está tratando de demostrar el efecto de un nutriente en la DMO y en la MOT que están dados principalmente por factores genéticos y donde los cambios producidos por las variaciones hormonales son muy marcados.

Por otra parte la falta de diferencias significativas en la mineralización ósea según la adecuación de la ingesta de calcio, tanto en pre púberes como en púberes a nivel de columna y cadera, podría estar dada en parte por la comparación con los valores de una población normal sana de igual edad, pero cuya ingesta de calcio no es la óptima. Si se contara con una población normal en estado de salud y además con consumo de calcio igual o mayor a la recomendación para la edad, haría más marcadas las diferencias con el grupo control.

El efecto del calcio en los resultados encontrados debe ser interpretado con cautela, debido a que se encontró también una ingesta de proteínas significativa menor en los escolares con baja ingesta de calcio. Esto era esperable, ya que el calcio ingerido por los escolares proviene principalmente de los productos lácteos, los que aportan un porcentaje importante de los requerimientos proteicos.

Los resultados de la literatura respecto a la ingesta de calcio y la mineralización ósea muestran resultados divergentes, lo que puede explicarse por diferencias en las metodologías utilizadas, o al hecho que la mineralización ósea esta influyen múltiples factores (1, 3, 12, 13).

El efecto de una suplementación de calcio en la mineralización ósea de individuos que aún están adquiriendo su masa y densidad mineral ósea, permitiría comprobar en mejor forma el efecto aislado del calcio en la mineralización y a la vez evaluar la adecuación de la actual recomendación de calcio.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con financiamiento de los proyectos M 3259-9212 del Departamento Técnico de Investigación de la Universidad de Chile (DTI) y Proyecto N° 91-1063 del Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONDECYT) y por el Laboratorio Lumiere.

Los autores agradecen la excelente labor secretarial de la Srta. *Elizabeth Gana*, la valiosa revisión y comentarios del Profesor *Samuel Middleton*, como también la valiosa participación de alumnos de los colegios D200 y Nuestra Señora del Pilar de la comuna de Macul.

REFERENCIAS

1. Kroger H., A. Kotaniemi, L. Kroger, E. Alhava. Development of bone density of the spine and femoral neck. A prospective study in 65 children and adolescents. *Bone Miner* 23:171-182, 1993.
2. Matckovic V. Calcium intake and peak bone mass. *N Engl J Med*. 327 (2):119-120, 1992.
3. Matckovic V., D. Fontana, C. Tominac, P. Goel, Ch. Chesnut. Factors that influence peak bone mass formation: a study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females. *Am J Clin Nutr*. 52:878-888, 1990.
4. Chan G. Dietary calcium and bone mineral status of children and adolescents. *Am J Dis Child* 145: 631-634, 1991.
5. Recommended Dietary Allowances Subcommittee on the Tenth Edition of the RDA S. Food and Nutrition Board, Commission on Life Sciences, National Research Council (U.S.)
6. Leiva L., R. Burrows, S. Muzzo. Ingesta de calcio en escolares de 10 a 14 años. *Rev Chil Nutr* 20 (3):207-211, 1992.
7. Schmidt-Hebbel H., I. Pennachiotti, L. Masson, M.A. Mella y cols. Tabla de composición química de los alimentos chilenos. 8 Ed. Santiago U. de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Departamento de Ciencias y Tecnología Química. 1990.
8. Muzzo S., L. Leiva, R. Burrows, A. Jara, M. Pozo, R. Lillo, H. Pumarino. Mineralización ósea en niños determinada por densitometría ósea bifotónica. *Arch Lat Nutr* (en prensa).
9. Schaafsma G. The scientific basis of recommended dietary allowances for calcium. *J Int Med* 231:187-194, 1992.
10. Mykkanen H.M., R.H. Wasserman. Enhanced absorption of calcium by casein phosphopeptide in rachitic and normal chicks. *J Nutr* 110:2141-2148. 1980.
11. Schuette S.A., M. Hegsted, M.B. Zemel, H.M. Linkswiler. Renal acid, urinary cyclicamp, and hidroxyproline excretion as affected by levels of protein, sulphur amino acid, and phosphorus intake. *J. Nutr.* 111:2106-2116. 1981.
12. Toss G. Effect of calcium intake vs. other life style factors on bone mass. *J Inter Med* 231:181-186. 1992.
13. Heaney R. Calcium intake in the osteoporotic fracture context: introduction. *Am J Clin Nutr* 2425-2445, 1991.

Recibido : 04-08-1994

Aceptado: 07-04-1995

Mineralización ósea en adolescentes que padecieron desnutrición postnatal temprana

Santiago Muzzo¹, Laura Leiva², Ricardo Lillo³, Hugo Pumarino⁴, Renata Ernst⁵, y Raquel Burrows⁶

Universidad de Chile

RESUMEN. Se analizó el grado de adecuación de la mineralización ósea en 6 adolescentes de sexo masculino y 18 de sexo femenino, que habían padecido de desnutrición calórico proteica severa en su primer año de vida y cuyo promedio de edad fue de 12 años 11 meses. Estos niños han sido controlados en nuestro Instituto desde el inicio de su rehabilitación nutricional. La mineralización ósea se estudió en cuerpo entero, columna y caderas por medio de un densitómetro isotópico de doble haz (Gd 153). Se compararon los resultados con los de niños normales de igual edad y sexo. Se encontró que los adolescentes que padecieron desnutrición temprana no presentaron diferencias en la adecuación de su peso para la talla comparado con los normales, estando ambos sobre el 100% de adecuación. El porcentaje de adecuación de la talla para la edad fue significativamente menor en los con antecedentes de desnutrición. Las densitometrías mostraron una menor masa ósea total en cuerpo total, columna y cuello femoral en los desnutridos comparados con los normales, diferencias que perdieron la significancia al expresarlas por 100 cm de estatura. No se encontraron diferencias en la densidad mineral ósea en las áreas medidas. Se concluye que la posible alteración de la mineralización ósea que produce la desnutrición postnatal temprana se podría recuperar con una adecuada rehabilitación, vigilancia con apoyo nutricional y de salud de estos niños.

SUMMARY. Bone mineralization of adolescents that suffered of early postnatal undernutrition. The bone mineralization of 6 male and 18 female adolescents with a mean age of 12 years and 11 months, who had suffered severe, early, postnatal protein-energy undernutrition, was analyzed. These patients have been followed up at our Institute since their nutritional rehabilitation. Bone mineralization was measured by bone dual isotopic densitometry (Gd 153). These results were compared with those of normal school-age Chilean children of the same age and sex. Weight for height of adolescent who had suffered from undernutrition was similar to the controls, and both were over 100% of the standard. Adequation of height for age was significantly less in those with previous history of undernutrition. Densitometries showed that adolescents with a past history of undernutrition had lower total bone mass in whole body, spine and femoral neck; differences disappeared when expressed per 100 cm of body height. There were no differences in bone mineral density in the different area measurements. It is concluded that the possible alterations that undernutrition produces in bone mineralization probably recover after nutritional rehabilitation, adequate nutritional follow up and health support.

INTRODUCCION

Se conoce que una ingesta de calcio, una actividad física y un estado de salud adecuados son factores esenciales para obtener una mineralización ósea normal (1). Se ha demostrado que un peso muy bajo de nacimiento (2), una baja ingesta de calcio (3) padecer de desnutrición postnatal temprana en la vida (4), de anorexia nerviosa (5), de otras enfermedades crónicas, la ingestión de medicamentos como los glucocorticoides y anticonvulsivantes y el hábito de fumar (6) son factores que disminuyen la mineralización ósea.

La acreción de calcio por el hueso varía en los diferentes períodos de crecimiento, siendo especialmente rápida en los

1 Médico, Profesor Titular. 2. Tecnólogo Médico, Instructor, Unidad de Endocrinología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.

3 Médico, Profesor Asistente, Departamento de Medicina Nuclear, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

4 Médico, Profesor Titular, Departamento de Endocrinología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

5 Médico, Centro de Recuperación de la Desnutrición Secundaria (CREDES).

6 Médico, Profesor Asistente, Unidad de Endocrinología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile.

primeros seis meses de vida y durante la adolescencia. Hemos observado que a las mujeres en el momento del inicio de la pubertad aún les falta por obtener un 35% de su masa ósea para llegar a la masa ósea máxima que tienen las mujeres en la segunda y tercera década de la vida. En el ser humano, desde la cuarta década de la vida se produce una disminución irreversible de la masa ósea, que se estima en un 0,5 a 1% anual. Durante los 3 años que siguen a la menopausia en la mujer se produce una pérdida más rápida de la masa mineral ósea, la que puede llegar a un 2 % anual. Este explicaría la mayor frecuencia de problemas de déficit de mineralización ósea en la mujer que el varón (1).

La osteoporosis del adulto mayor constituye actualmente en nuestro país un importante problema de salud pública, dada la alta morbimortalidad con altos costos para los servicios de salud, especialmente por las fracturas de columna y caderas que se pueden producir (7-8).

Se sabe que el tratamiento de la osteoporosis sólo logra detener esta situación pero no revertirla. Por este motivo, las medidas preventivas juegan un importante rol en el tratamiento de este serio problema. Para ello es fundamental conocer los factores que favorecen una adecuada mineralización ósea para incentivarlos y los factores que pueden desfavorecerla para evitarlos. Sin duda, que para prevenir esta enfermedad se deberá actuar sobre estos factores especialmente durante la vida de crecimiento del niño y del adolescente, período en el cual aún sería posible revertir un déficit de mineralización, para así poder obtener una masa ósea máxima a la edad de adulto joven, y retrasar al máximo la edad a la que se puede llegar a una densidad mineral ósea de riesgo de fracturas.

En lactantes con desnutrición grave se ha descrito en radiografía de carpo y rodilla que presentan rarefacción ósea, adelgazamiento de la cortical, engrosamiento de la línea de calcificación provisoria, lo que se ha atribuido especialmente a la carencia de proteínas. Por otra parte se ha demostrado que los lactantes que tienen una obesidad exógena adelantan su maduración ósea y los desnutridos la retrasan, tanto más mientras más severa sea la desnutrición. Este retraso es más severo al asociarse a una desnutrición intrauterina, potenciándose su efecto desfavorable sobre la maduración ósea (9-10).

Durante la rehabilitación nutricional de lactantes desnutridos se ha observado un efecto de la ingesta proteica sobre la excreción urinaria de calcio. Además el balance de calcio fue lineal y directamente proporcional al calcio absorbido, independiente de la edad y del estado nutricional, sin que se observase un plateau. Estos hallazgos han sido interpretados como una mayor acreción de calcio durante la etapa de recuperación de la desnutrición, probablemente debido al déficit previo que los pondría en un alto nivel de requerimiento, el que no sería cubierto por la dieta habitual de rehabilitación de los desnutridos y por lo tanto se intensificaría el déficit previo a la rehabilitación (11).

La excreción urinaria de calcio depende por un lado de la ingesta y por otro de la velocidad de recambio óseo. Al correlacionar la excreción con la ingesta de calcio en niños desnutridos de 3 a 36 meses y compararlos con niños normales de igual edad, se vio que los desnutridos no presentaron variación a pesar del gran aumento en la ingesta. Esto implicaría que los desnutridos no alcanzan a cubrir sus requerimientos incluso con ingesta muy superiores a la recomendación actual (11).

La anorexia nerviosa es una desnutrición de causa psicopatológica que afecta especialmente a las mujeres jóvenes. Esta enfermedad presenta diferentes grados de severidad pudiendo presentarse en un número importante de personas. Se ha visto que esta enfermedad disminuye la mineralización ósea, medida por densitometría de doble haz (5).

Nos interesó conocer el grado de adecuación de la mineralización ósea de adolescentes que presentaron una desnutrición calórico proteica postnatal temprana, de etiología primaria y de grado severo, con la finalidad de analizar la posibilidad de recuperación de las deficiencias que ocasiona esta noxa nutricional cuando se produce durante la etapa más activa del crecimiento.

MATERIAL Y METODO

En el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, de la Universidad de Chile, se está efectuando un seguimiento por más de 16 años, de un grupo de lactantes que padecieron de desnutrición calórico proteica primaria severa (grado 3) durante su primer año de vida. Estos niños fueron tratados integralmente con una dieta de rehabilitación, una estimulación psicosensorial y motora durante un promedio de estadía de 150 días, y luego han continuado con controles frecuentes para evitar las recaídas.

De este seguimiento longitudinal se tomaron 24 adolescentes (6 varones y 18 mujeres) con un promedio de edad de 12 años y 11 meses. El peso se determinó mediante una balanza de pesas bien calibrada, la estatura mediante un cartabón, la circunferencia de cráneo con una huincha no distensible y el segmento corporal superior (talla sentada), mediante una silla diseñada especialmente. La calidad del estado nutricional se expresó como el porcentaje de adecuación peso al percentilo 50 del peso que le corresponde a su talla, la calidad estatural como el porcentaje de adecuación al percentilo 50 de talla para su edad, todas ellas de acuerdo a las tablas de la O.M.S.

La masa ósea total (MOT) expresada en g, y la densidad mineral ósea (DMO) en g/cm², se midieron en cuerpo total, columna y caderas, mediante un densitómetro de doble haz isotópico (Gadolinio), marca Norland. En caderas estas mediciones se efectuaron en cuello femoral, trocanter y triángulo de Ward.

Todos estos valores se compararon con los de 51 adolescentes (29 varones y 22 mujeres) de similar edad, sexo y pertenecientes a un nivel socioeconómico similar, sin ante-

cedentes de enfermedades nutricionales y crónicas, que tuvieron un peso de nacimiento mayor de 2500 g, y sin antecedentes de haber recibido medicamentos que pueden alterar la mineralización ósea. El análisis estadístico de los resultados se efectuó mediante el t de Student y el chi cuadrado.

RESULTADOS

La Tabla 1 muestra las características antropométricas de los adolescentes que padecieron de desnutrición temprana, comparados con adolescentes normales y separados por sexo. Se aprecia que tanto los varones como las mujeres que padecieron de desnutrición temprana, comparados con adolescentes normales y separados por sexo. Se aprecia que tanto los varones como las mujeres que padecieron de desnutrición tenían un porcentaje de adecuación significativamente menor de la talla/edad que los adolescentes controles ($p < 0,0005$), sin presentar diferencias en el porcentaje de adecuación del peso/talla.

TABLA 1
CARACTERISTICAS ANTROPOMETRICAS DE ADOLESCENTES QUE SUFRIERON DESNUTRICION POSTNATAL TEMPRANA

	Varones		(b)	Mujeres		(c)
	Controles	Desnutridos		Controles	Desnutridos	
			p			p
	(a)					
% P/T	105,1 ± 10,1 (26)	99,2 ± 8,9 (7)	N.S.	109,3 ± 16,8 (20)	106,6 ± 13,1 (18)	N.S.
% T/E	98,6 ± 3,9 (26)	92,7 ± 4,3 (7)	<0,005	99,9 ± 5,1 (20)	92,3 ± 5,1 (18)	<0,0005

(a) X ± D.E. (Número de casos)

(b) Significancia según t Student de varones controles vs. desnutridos

(c) Significancia según t Student de mujeres controles vs. desnutridas

La Tabla 2 muestra los resultados de la mineralización ósea medida por densitometría efectuadas en columna (L2-L4) y cuerpo entero. Se aprecia una significativa menor MOT ($p < 0,01$) en columna en los adolescentes que fueron desnutridos al compararlos con los controles. No se encontró diferencias en la DMO de columna de los adolescentes de ambos grupos. En cuerpo entero la MOT fue significativamente menor en los desnutridos que en los controles ($p < 0,01$), sin apreciarse diferencias en la DMO.

TABLA 2
ADECUACION DE LAS DENSITOMETRIAS OSEAS DE COLUMNA Y CUERPO ENTERO DE ADOLESCENTES DE AMBOS SEXOS, QUE SUFRIERON DESNUTRICION POSTNATAL TEMPRANA

	COLUMNA		CUERPO ENTERO	
	MOT (g)	DMO (g/cm ²)	MOT (g)	DMO (g/cm ²)
	(a)			
Desnutridos	83,6 + 28,7 (22)	93,0 + 16,7 (22)	83,6 + 24,9 (22)	96,3 + 11,4 (22)
Controles	101,4 + 23,0 (40)	99,9 + 13,4 (40)	99,8 + 17,3 (49)	100,1 + 7,9 (49)
(b)				
P	<0,01	N.S.	<0,01	N.S.

(a) X ± D.E. (Número de casos)

(b) Significancia según t Student

La Tabla 3 muestra la mineralización ósea de caderas, medidas en cuello femoral, trocánter y triángulo de Ward. Se aprecia que los adolescentes con desnutrición sólo presentaron una significativa menor MOT en cuello femoral ($p < 0,005$) que los controles, 86,1 ± 16,4% vs 100,8 ± 18,5% respectivamente, sin haber diferencias en la DMO de cuello, ni en la MOT y DMO de trocánter y triángulo de Ward.

TABLA 3
ADECUACION DE LAS DENSITOMETRIAS DE CADERA DE ADOLESCENTES DE AMBOS SEXOS, QUE SUFRIERON DESNUTRICION POSTNATAL TEMPRANA

	Cuello Femoral		Trocánter		Triángulo de Ward	
	MOT (g)	DMO (g/cm ²)	MOT (g)	DMO (g/cm ²)	MOT (g)	DMO (g/cm ²)
	(a)					
Desnutridos	86,1 + 16,4 (19)	96,2 + 14,0 (19)	107,9 + 38,7 (19)	101,0 + 18,6 (19)	93,6 + 17,6 (19)	102,6 + 18,3 (19)
Normales	100,8 + 18,5 (37)	100,6 + 11,4 (37)	98,4 + 34,6 (38)	101,6 + 10,9 (36)	100,6 + 19,7 (36)	101,6 + 18,0 (36)
(b)						
P	<0,005	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

(a) X ± D.E. (Número de casos)

(b) Significancia según t Student

DISCUSION

El menor porcentaje de adecuación de la talla/edad que presentaron los adolescentes que padecieron de desnutrición temprana, señala la irrecuperabilidad de este parámetro constituyendo una secuela de esta deficiencia nutricional cuanto se produce en un período de rápido crecimiento, consecuencia que ya había sido comunicadas en la literatura (12-13).

Los promedios de los porcentajes de adecuación del peso/talla fueron elevados en los adolescentes de sexo femenino que fueron desnutridos y en los controles de ambos sexos, sólo los varones con desnutrición temprana tuvieron una adecuación peso/talla normal. Estos resultados coinciden con la situación nutricional que hemos descrito en el escolar chileno en el cual el problema nutricional más prevalente es el exceso de peso, especialmente en las mujeres (14).

Las diferencias significativas detectadas en las mediciones densitométricas óseas efectuadas a estos adolescentes se encontraron sólo en la MOT de columna, cuello femoral y cuerpo entero. Estas diferencias significativas se pierden al expresar los resultados por 100 cm de estatura. La menor estatura con que quedaron los adolescentes que padecieron desnutrición temprana explicaría la menor MOT detectada en estos pacientes, constituyendo tal vez un mecanismo de compensación para evitar un mayor daño por parte de la noxa nutricional temprana.

Las investigaciones actuales del metabolismo óseo en la desnutrición postnatal temprana indicarían que produce una disminución de la mineralización ósea durante la etapa aguda de desnutrición y durante la rehabilitación nutricional (4). El haber encontrado una mineralización ósea normal en los adolescentes que padecieron de desnutrición temprana en nuestro estudio, se podría deber a los frecuentes controles de salud a que fueron sometidos, los que habrían evitado muchas enfermedades. Además recibieron aportes nutricionales mejores que niños de igual edad y nivel socioeconómico, lo que habría influido en la recuperación del posible déficit de mineralización ósea de la etapa aguda de la desnutrición. Esta aseveración implicaría que un déficit de mineralización ósea producido por una desnutrición temprana del lactante podría corregirse y así permitir a estos niños obtener una masa ósea normal a la edad de adulto joven, dejando de constituir un grupo de riesgo de osteoporosis a la edad de adulto mayor.

Financiado por Fondecyt, proyecto N° 91-1063

REFERENCIAS

1. Avioli L.V., and R.Lindsay. The female osteoporotic syndrome. In: *Metabolic bone disease*. Avioli and Krane (eds). Second edition. Saunders company. Philadelphia, pp. 397-451. 1990.
2. Chan G.M., L. Mileur and J. Hansen. Calcium and phosphorus requirements in bone mineralization of preterm infants. *J. Pediatr.* 113:225-9. 1988.
3. Matkovic V. Calcium intake and peak bone mass. *N. Engl. J. Med.* 327:119-120. 1992.
4. Portela M.L., S. Zeni, N. Piazza, H. García and M.E. Rio. Calcium balance in infants recovering from undernutrition and dietary calcium-protein ratio. *Nutr. Reports Int.* 28:1091-1099. 1983.
5. Biller B.M.K., V. Saxe, D.B. Herzog, D.I. Rosenthal, S. Holzman and A. Klibanski. Mechanisms of osteoporosis in adult and adolescent women anorexia nervosa. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 68:548-554. 1989.
6. Michnovicz J.J., R.J. Hershcopf, H. Naganuma et al. Increased 2-hydroxylation of estradiol as a possible mechanism for the anti-estrogen effect of cigarette smoking. *N. Engl. J. Med.* 315:1305-1309. 1986.
7. Pumarino H., P. González, S. Oviedo y R. Lillo. Densidad y contenido mineral óseo y su relación con parámetros antropométricos en población normal chilena. Estudio de mujeres. *Rev. Med Chile.* 119:279-286. 1991.
8. Contreras L., A. Kirschbaun y H. Pumarino. Epidemiología de las fracturas en Chile. *Rev. Med Chile* 191:92-8, 1991.
9. Alcazar M.L., J. Alvear y S. Muzzo. Influencia de la nutrición en el desarrollo óseo del niño. *Arch. Latinoam. Nutr.* 34: 298-307, 1984.
10. Alvear J., C. Artaza, M. Vial, S. Guerrero y S. Muzzo. Physical growth and bone age of survivors of protein energy malnutrition. *Arch. Dis. Child.* 61:257-262. 1986.
11. Portela M., S. Zeni, N. Piazza, H. García. y M.E. Rio. Calcium balance in infants recovering from undernutrition and dietary calcium-protein ratio. *Nutr. Rep. Int.* 28(5): 1091-1099. 1983.
12. Barja I., M. De la Fuente, D. Ballester, F. Monckeberg y G. Donoso. Peso y talla de preescolares chilenos de 3 niveles de vida. *Rev. Chilena Pediatr.* 36: 525-9, 1965.
13. Graham G. Effect of infantile malnutrition on growth. *Fed. Proc.* 26:139. 1967.
14. Leiva L., A. Mauricci, R. Burrows, A. Zvaighaft, A. Kauschanski y S. Muzzo. Estado nutricional durante el desarrollo puberal de escolares del Area Metropolitana de Chile. *Rev. Chilena Nutr.* 14:206-214. 1986.

Recibido: 04-08-1994

Aceptado: 05-05-1995

Evaluación química y nutricional de un alimento para adultos a base de soja y cereales

María Catalina Olguín¹, Susana Agnese Calderari², María Delia Posadas², Gilda Celina Revelant¹, María del Carmen Gayol², María Isabel Zingale¹, Miryam Elsa Vignale¹, Verónica Beatriz Labourdette², Mariela Balseiro², y Andrés Agustín Torriggino²

Universidad Nacional de Rosario, Argentina

RESUMEN. Las leguminosas y los alimentos vegetales con gran contenido de fibra suelen mejorar aspectos del control de la diabetes humana por ser fuentes potenciales de carbohidratos de «liberación sostenida». Se evaluó química y nutricionalmente una mezcla de soja y cereales de fabricación panadera local, de interés por su palatabilidad, su elevado contenido de glúcidos no amiláceos y su tipo particular de fibra. Se establecieron comparaciones con un alimento comercial para roedores y una mezcla de cafetería. Cada una de estas tres dietas fue ofrecida a ratas adultas de la línea IIMb/Fm β (β), afectadas de obesidad, hipertrigliceridemia e intolerancia glucídica o diabetes. Los tratamientos duraron tres meses y se efectuaron en machos de dos edades: a) a partir de los 100 días, con marcado crecimiento, b) a partir de los 200 días. Las dietas fueron similares en cuanto a cantidad de glúcidos y aporte energético, pero la mezcla panadera con soja requirió hidrólisis enzimática ácida para liberar glúcidos simples. La mezcla de cafetería resultó deficitaria en fibra, rica en grasa saturada y sodio, y generó hiperfagia. Las ratas de cada grupo ingirieron la misma cantidad de alimento en ambas edades, pese a que el aumento de biomasa fue significativamente mayor en las jóvenes. En éstas los valores de respuesta glucémica no difirieron significativamente entre las dietas. En las de mayor edad la mezcla de cafetería resultó marcadamente hiperglucemiante mientras que la mezcla panadera con soja generó una respuesta glucémica ostensiblemente menor, que en un caso fue significativamente inferior a la de la mezcla comercial. De esta manera la edad puso más en evidencia la acción de las diferentes dietas. Los resultados de los análisis de las heces demostraron una mayor proporción de agua fecal en el grupo alimentado con la mezcla vegetal, probablemente atribuible al contenido de fibra indigerible, con efectos favorables sobre el funcionamiento del intestino grueso.

SUMMARY. Chemical and nutritional assessment of soybean and cereal mixture for adults. Legume seeds and fibre rich plant foods usually improve aspects of human diabetes control as they are potential sources of «delayed release» carbohydrates. A regional bakery mixture of soybean and cereals, interesting for its palatability and high content in non starch polysaccharides was chemically and nutritionally evaluated. Comparisons were made with the usual commercial laboratory chow and with a cafeteria mixture. Each one of the three diets was offered ad libitum to adult rats of line IIMb/Fm β (β), affected by obesity, hypertriglyceridemia and glucose intolerance or diabetes. Treatments lasted three months and were performed on two groups of male rats: (a) From 100 days old growing significantly. (b) From 200 days old. Meals had similar carbohydrate and calory contents but acid followed by enzymatic hydrolysis was required to free monosaccharides from the soybean mixture. Cafeteria mixture lacked in fibre, was rich in saturated fats and sodium, and it caused hyperphagia. Each group of rats showed similar food intakes in both ages although weight gain was significantly higher in the younger animals. In the latter, values of glycemc response showed no difference between diets. Cafeteria mixture caused significant hyperglycemia to the elder rats, while the soybean bakery mixture produced a remarkably lower glycemc response; in one case it was even lower than the one produced by the commercial chow. Differential response showed more clearly with age. The results of the feces analysis demonstrated an increased proportion of fecal water for the bakery mixture group, probably due to the amount of undigestible fibre, inducing beneficial effects on large bowel functionality.

INTRODUCCION

El consumo de alimentos vegetales ha sido recomendado en los últimos años debido a numerosos estudios epidemiológicos que establecen una relación negativa entre la

1 Cátedra de Química Analítica de Alimentos. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas.

2 Cátedra de Biología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Rosario.

ingestión de fibra y la incidencia de patologías intestinales así como de metabopatías. La fibra comprende un grupo muy complejo y heterogéneo de sustancias que no pueden ser dirigidas sin la acción de la microflora digestiva (1). Sus propiedades funcionales y efectos nutricionales varían con la composición, la estructura y el tratamiento de la fuente (2), pero es claro que ella puede jugar un rol importante en la regulación de muchos aspectos de la patología intestinal (3,4). La variabilidad de los efectos de la fibra dietaria sobre el metabolismo glucídico en pacientes con diabetes mellitus no insulino dependiente estaría influenciada por factores tales como: tipo y dosis de fibra (5), composición global de la dieta, tiempo de tratamiento, edad y características metabólicas de los pacientes. Numerosos trabajos indican que las leguminosas en particular y los glúcidos «complejos» con gran contenido de fibra, en general, reducen el aumento agudo de la glucemia y por lo tanto mejoran en el largo plazo muchos aspectos del control de la diabetes humana (4, 6, 7). Asimismo, las legumbres se consideran fuentes potenciales de carbohidratos de digestión lenta o de «liberación sostenida», adecuados para la dieta del diabético (7). Antes de iniciar un estudio es importante tener en cuenta que un hábito de ingestión de fibra sólo puede lograrse si ella es palatable y si su ingestión no exige modificaciones drásticas de los hábitos alimentarios preestablecidos (7). Por otra parte, algunas proteínas vegetales, como las de la soja, tienen la doble ventaja de su alto valor biológico unido a un costo esencialmente menor que las de origen animal.

El objetivo de este trabajo fue analizar una mezcla de soja y cereales de fabricación panadera local, que tiene la ventaja de presentar a la leguminosa, poco palatable como semilla, en forma de un alimento más deseable y consumible como es el pan. Esta mezcla fue considerada de interés por su elevado contenido en glúcidos no amiláceos, su tipo particular de fibra, y por ser palatable, tanto por seres humanos como por ratas. Su alto contenido proteico, que la hace valiosa de por sí, permitió que la misma fuera administrada a ratas como único alimento. Dicha mezcla vegetal se ofreció a ratas genéticamente obesas y diabéticas con el objeto de detectar eventuales modificaciones en la respuesta glucémica y en el metabolismo del intestino grueso mediante el estudio de la materia fecal. Se establecieron comparaciones con un alimento comercial para roedores como dieta testigo, y con una mezcla de bocadillos palatables propios de la dieta occidental de la abundancia, con el objeto de remedar el hábito alimentario nocivo de las comidas rápidas, que se conoce corrientemente como dieta de cafetería (8,9).

MATERIAL Y METODOS

Alimentos y técnicas analíticas: Se analizaron: 1) Balanceado comercial para roedores (AC). 2) Mezcla totalmente vegetal de fabricación panadera hecha con harina de porotos de soja enteros, cocidos y tostados, previamente sometidos a un tratamiento térmico húmedo para inactivar factores antinutricionales, harina de trigo, trigo entero molido, cente-

no, salvado de avena y margarina vegetal (AN). Esta combinación requirió hidrólisis ácida y enzimática para liberar glúcidos simples. 3) Mezcla de cafetería, consistente en triturado de papas fritas, queso de rallar, jamón cocido, huevo duro, galletitas dulces y sacarosa (ACaf). Se midieron: a) Humedad: pérdida de peso a 105 °C. b) Nitrógeno proteico: Kjeldhal (10), factor para AN:5.75, para ACaf y AC:6.25 c) Materia grasa: extracto etéreo. d) Fibra: detergente neutro y método enzimático A.O.A.C. (11). e) Glúcidos: azúcares reductores sin y con hidrólisis en medio clorhídrico. Para la determinación de AN se debió recurrir a tratamiento con HCl 3M en caliente, neutralización y acción enzimática dado que con la hidrólisis clorhídrica no se obtenía la totalidad de la concentración presente (12). f) Minerales: se analizó el contenido de Ca y P con métodos espectrofotométricos, y de Na y K por fotometría de llama en cada una de las dietas, utilizando las cenizas disueltas en medio HNO₃ 0,3M.

Animales: Se utilizaron 30 ratas macho adultas de la cepa IIMb/Fm β (B) (13, 14): 15 de 100 días de edad (jóvenes) y 15 de 200 días (maduras), que se mantuvieron en jaulas individuales en condiciones estándar de luz y temperatura. Cada grupo etario se dividió en tres subgrupos, cada uno de los cuales ingirió ad libitum AC, AN o ACaf durante tres meses. La línea endocriada de ratas β muestra sobrepeso debido al aumento de grasa total (31%), hipertrigliceridemia y, en edad adulta, hiperglucemia o diabetes (15). Esto configura un cuadro de obesidad moderada y diabetes del tipo no insulino dependiente, supuestamente poligénico. En comparaciones establecidas con testigos no obesos de la línea IIM α /Fm (α), derivados del mismo núcleo de cría original, los valores de glucemia basal α vs. β fueron: 1,00 vs. 1,53 g/l ($p < 0,05$).

Determinaciones fisiológicas: Se verificaron diariamente la biomasa y la ingestión de alimento. Bajo ayuno de 12 horas se efectuaron: a) Prueba de tolerancia glucídica suministrando oralmente 200 mg de glucosa por cada 100 g de biomasa de rata. b) Respuesta glucémica post prandial ofreciendo a cada rata su alimento durante 20 min. En ambas pruebas se midió la glucemia en ayunas y a los 30, 60, 120 y, en las de mayor edad, 180 min. Las áreas bajo las curvas se calcularon geoméricamente y los resultados se expresaron mmol x min/l. En b) el resultado se dividió por los gramos de glúcido ingeridos. Para la determinación de glucemias y glucosurias se utilizó un método enzimático. Periódicamente se recolectó la materia fecal de cada rata y se determinó el contenido acuoso mediante la pérdida de peso a 42 y 105 °C (16). Sobre muestra seca se efectuó dosaje de lípidos por medio de extracciones con cloroformo-metanol (40:60) y posterior gravimetría (17). En la muestra seca y desgrasada se dosó el contenido de fibra dietaria con la técnica de Van Soest (18). Para obtener los valores de digestibilidad de la proteína se secaron, molieron y homogeneizaron las heces, determinándose su contenido de nitrógeno por el método de Kjeldahl (10). Se calculó la

digestibilidad aparente con fórmula estándar (19). Asimismo se determinó la digestibilidad de la fibra aportada en forma considerable por AC y AN, ya que las técnicas corrientes de análisis no necesariamente permiten predecir la solubilidad de la fibra en condiciones fisiológicas (4, 20).

Diseño y análisis estadístico: Se efectuó un diseño completamente aleatorizado, aplicando tres tratamientos a ratas de dos edades diferentes. Todos los datos se presentaron como media \pm error estándar ($X \pm ES$). Las comparaciones se efectuaron mediante prueba de t de Student para muestras independientes y apareadas. Todo valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Composición de los alimentos: Las mezclas alimenticias fueron similares en cuanto a cantidad de glúcidos y aporte energético. La mezcla de cafetería fue deficitaria en fibra (Tabla 1) y muy rica en Na (Tabla 2).

TABLA 1
COMPONENTES (g/100g) Y ENERGIA (kcal/g)
DE LAS DIETAS

Componentes	DIETAS		
	AC	AN	ACaf
Proteínas	31	36	13
Glúcidos	31	31	29
Grasas	6,2	13	14,5
Humedad	9	7	37
Fibra diaria	13,6	6,5	2,8
Fibra A.O.A.C.	18,4	12,4	3,5
(kcal/g)	3,03	3,85	2,99

TABLA 2
CONTENIDO MINERAL DE LAS DIETAS

Dietas	CENIZAS TOTALES (g/100g)	MINERALES (mg / 100g)			
		Ca	P	Na	K
AC	8,3	1130	980	334	613
AN	3,6	225	776	275	566
ACaf	2,8	172	170	619	219

Ingestión de alimentos: La ingestión en gramos fue igual en ambas edades para cada uno de los tratamientos. Entre dietas, tanto en g/día como en kcal/día, las diferencias estadísticas fueron: AC vs. AN (ns); AC + AN vs. ACaf ($p < 0,01$). Las únicas diferencias significativas entre AC y AN consistieron en que con AN se ingirió más materia grasa ($p < 0,001$) y menos fibra dietaria ($p < 0,001$) (Tabla 3). Con ACaf las ratas ingirieron más grasas y glúcidos, menos fibra y más Na que con las

otras dos dietas. La cantidad de proteínas ingerida con ACaf fue aceptable para la edad, pero menor que con AN y AC.

TABLA 3
INGESTION DE ALIMENTOS (g/día) Y CALORICA EN
RATAS MACHO β JOVENES Y MADURAS CON
DIFERENTES DIETAS

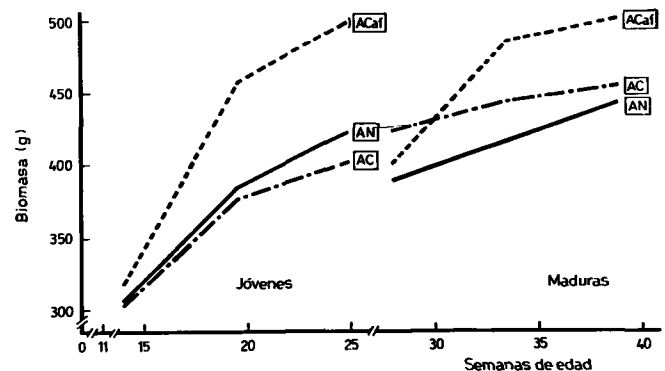
Componentes	DIETAS		
	AC (9)	AN (12)	ACaf (9)
Totales	28,4 \pm 0,85 ^a	22,8 \pm 0,92 ^a	37,6 \pm 1,31 ^a
Glúcidos	8,8 \pm 0,26 ^a	7,1 \pm 0,28 ^a	11,0 \pm 0,38 ^b
Proteínas	8,8 \pm 0,26 ^a	8,2 \pm 0,33 ^b	4,9 \pm 0,08 ^c
Grasas	1,7 \pm 0,04 ^a	2,9 \pm 0,11 ^a	5,4 \pm 0,18 ^b
Fibra diaria	3,8 \pm 0,11 ^a	1,5 \pm 0,05 ^b	1,05 \pm 0,02 ^c
(kcal/día)	86,2 \pm 2,6 ^a	88,1 \pm 3,5 ^a	112,4 \pm 3,9 ^b

Los valores indican media \pm error estándar. Las cifras con igual superíndice en sentido horizontal no son significativamente diferentes.

Digestibilidad de los alimentos: Se evidenció una buena digestibilidad para las proteínas en todos los casos: AC 87 %, AN 90 % y ACaf 93 % ($p > 0,05$). Utilizando el método de Van Soest para el dosaje de fibra y calculando su digestibilidad aparente, se verificó para AC 34,4 \pm 4,59 % y para AN 14,3 \pm 3,53 % ($p > 0,05$).

Crecimiento: El aumento de biomasa desde los 100 hasta los 190 días de edad (jóvenes) fue significativamente mayor que desde los 200 hasta los 290 días (maduras), en concordancia con el crecimiento esperado en cada lapso etario (Figura 1). En las maduras el aumento de biomasa no fue significativo, salvo para las alimentadas con ACaf ($p < 0,05$). Esto último se debería en parte a retención líquida, atribuible a la gran ingestión de Na.

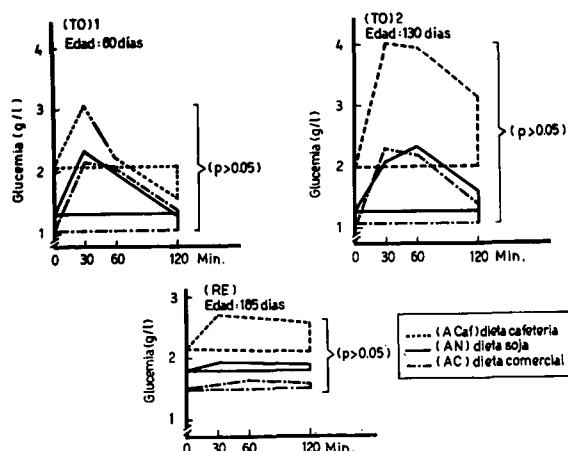
FIGURA 1
Biomasa de ratas β macho adultas en función del tiempo.
El crecimiento es mucho más intenso en las jóvenes



Respuestas glucémicas: Estas pruebas fueron repetidas en el transcurso de los tratamientos para ir detectando los efectos de los mismos. En las ratas jóvenes (Figura 2) la prueba de tolerancia glucídica con AC y con AN no se modificó al comparar valores previos a la iniciación del experimento: AN 303±116; AC 480 ± 156 mmol x min/l, con los de 30 días de tratamiento: AN 465±81; AC: 514 ± 68 mmol x min/l. Con ACaf hubo aumento significativo en el mismo lapso: 125 ± 109 vs. 1018 ± 285 mmol x min/l (p<0,001). En la prueba de respuesta glucémica post prandial a los 85 días de tratamiento, las diferencias entre dietas no fueron significativas: AN 33 ± 36; AC 42 ± 23; ACaf 246 ± 99 mmol x min/l.

FIGURA 2

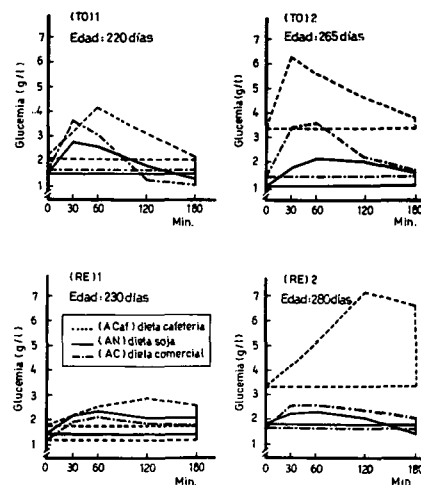
Areas promedio (X±ES) bajo curvas de respuesta glucémica (mmol x min/l) en ratas macho β jóvenes. (TO)1: tolerancia glucídica previa al tratamiento. (TO)2: tolerancia glucídica a los 30 días de tratamiento. Para ACaf: (TO)1 vs. (TO)2: (p<0,001). (RE): respuesta glucémica post prandial a los 85 días de tratamiento



En la edad madura (Figura 3), a los 20 días de tratamiento la tolerancia glucídica no mostró diferencias significativas entre dietas: AN 478 ± 143; AC 461 ± 173; ACaf 1107 ± 231 mmol x min/l. A los 65 días de tratamiento los valores fueron: AN 767 ± 128; AC 1080 ± 108; ACaf 1513 ± 248 mmol x min/l, y la diferencia AN vs. ACaf resultó significativa (p<0,05). Comparando las respuestas glucémicas post prandiales, a los 30 días de tratamiento no hubo diferencias significativas entre dietas: AN 442 ± 66; AC 632 ± 89; ACaf 746 ± 247 mmol x min/l. A los 80 días, en cambio, los valores fueron AN 126 ± 85; AC 724 ± 203 y ACaf 1204 ± 31 mmol x min/l (Figura 3). Esto evidenció que el transcurso del tratamiento produjo un pronunciado aumento de absorción con ACaf y una disminución significativa de los valores con AN: 443 vs. 126 mmol x min/l (p<0,01).

FIGURA 3

Area promedio (X+ES) bajo curvas de respuestas glucémicas (mmol x min/l) en ratas macho β de edad madura con diferentes dietas. (TO)1: tolerancia glucídica a los 20 días de tratamiento: (ns) entre dietas. (TO)2: tolerancia glucídica a los 65 días de tratamiento: AN vs. AC (ns); AC vs. ACaf (ns); AN vs. ACaf (p<0,05). (RE)1: respuesta glucémica post prandial a los 30 días de tratamiento: (ns) entre dietas. (RE)2: respuesta glucémica post prandial a los 80 días de tratamiento: AN vs. AC (p<0,05); AC vs. ACaf(ns); AN vs. ACaf (p<0,001)



Glucemias basales: En la edad madura los valores típicos de la línea β, que inicialmente no mostraron diferencias significativas, permanecieron inmodificados con AC y AN (Figura 3), pero se elevaron con ACaf (p<0,05).

Glucosuria y signos de diabetes: En la edad madura no se verificó glucosuria al iniciarse los tratamientos. Al finalizar los mismos se evidenció una elevada glucosuria con ACaf: 71 ± 9 g/l, acompañada de polidipsia y poliuria extremas. Con AC la glucosuria fue de 0,13 ± 0.1 g/l con AN la orina no tuvo glucosa en ninguna rata.

Material fecal: En los animales jóvenes y en los maduros el peso de materia fecal fue significativamente mayor para los alimentados con AC respecto de AN (p<0,01), así como con AC respecto de ACaf (p<0,05). La proporción de agua fue mayor con AN respecto de AC (p<0,01) (Tabla 4). Las proporciones de materia grasa en las heces fueron superiores en AN y ACaf comparados con AC. Asimismo, hubo un incremento de excreción de grasa fecal en las maduras respecto de las jóvenes, que para AN resultó significativo (p<0,01). La concentración de fibra en heces fue alta y similar para AC y AN, pero mucho menor para ACaf (p<0,001).

TABLA 4
COMPOSICION DE MATERIA FECAL DE RATAS
MACHO β ADULTAS TRATADAS CON DIETAS
DIFERENTES

Dieta	Edad (n)	Peso (g/día)	Humedad (g/100g)	Mat. grasa (g/100g)	Fibra (g/100g)
AC	Jóvenes (4)	8.8±0.9 ^a	23±1.5 ^a	3.4±0.2 ^a	41±3.1 ^a
	Maduras (5)	6.4±0.5 ^a	23±2.4 ^a	4.2±0.4 ^a	42±2.7 ^a
AN	Jóvenes (6)	4.2±0.3 ^b	40±3.4 ^b	8.1±0.6 ^b	38±2.0 ^a
	Maduras (6)	3.1±0.6 ^b	38±2.6 ^b	11±0.7 ^c	40±2.1 ^a
ACaf	Jóvenes (5)	1.6±0.1 ^c	12±1.0 ^c	9.7±0.9 ^{bc}	3.7±0.2 ^b
	Maduras (4)	1.4±0.1 ^c	16±3.1 ^{ac}	11±0.3 ^c	4.4±0.3 ^b

Los valores con una letra igual en el superíndice en sentido vertical no son significativamente diferentes. Las cifras indican media \pm error estándar

DISCUSION

Ambos grupos etarios, tratados durante 90 días, fueron sometidos a sedentarismo forzoso por el hecho de permanecer en pequeñas jaulas individuales, lo cual implicó mínima disipación energética. Tanto las ratas jóvenes como las maduras ingirieron igual cantidad de alimento dentro de cada dieta, pero el crecimiento, que fue pronunciado en las jóvenes, prácticamente no se evidenció en las maduras. Por lo tanto, el destino del alimento ingerido no fue el mismo en ambos casos. En las jóvenes, en que una parte importante de lo ingerido se materializó en crecimiento, los valores de respuesta glucémica no difirieron significativamente entre dietas, aunque fueron mayores con ACaf (Figura 2). Durante el crecimiento podrían suponerse una demanda glucídica mayor, conjuntamente con una regulación de la glucemia más ajustada y una funcionalidad absorptiva óptima para todo tipo de complejos glucídicos a nivel del intestino delgado. Algo diferente habría ocurrido en la edad post crecimiento, cuando casi todo lo ingerido se destinó a mantener biomasa. Con ACaf, la edad acentuó significativamente el efecto hiperglucemiante ya esbozado en las jóvenes. Puede suponerse que la mezcla de cafetería, inductora de hiperfagia, en una edad en que la demanda energética para crecer estuvo ausente, produjo un aumento pronunciado de la glucemia, que puso de manifiesto el deterioro de los mecanismos reguladores. Las diferencias desfavorables para la dieta de cafetería consistieron en la alta ingestión de grasa tipo saturado, mayor ingestión de Na así como de glúcidos fácilmente digeribles y déficit de fibra, cuya acción sobre el medio intestinal produjo un área de respuesta

glucémica significativamente aumentada, seguida de un incremento significativo de los valores basales de glucemia, glucosuria muy elevada y signos clínicos de diabetes acentuados en extremo.

Al comparar las otras dos dietas, más semejantes entre sí en algunos aspectos, se verificó con AC mayor ingestión de fibra y menor de materia grasa que con la mezcla vegetal. La respuesta glucémica indicaría una absorción glucídica más obstaculizada con la mezcla vegetal en edad post crecimiento, que podría atribuirse en parte a la composición de la fibra de AN: riqueza en lignina y hemicelulosa aportadas por la leguminosa, y de fibra de tipo «viscoso» de la avena, provocando retardo en la absorción de monosacáridos a nivel intestinal (21). El hecho de que el retardo en la respuesta glucémica se haya evidenciado mejor en la edad post crecimiento indicaría, junto con el incremento de materia grasa observado en las heces de las ratas maduras, un cierto deterioro en algunos mecanismos enzimáticos y/o fisicoquímicos de absorción en el intestino delgado. Por otra parte, hay evidencia de modificaciones en la absorción intestinal de lípidos en la rata, como respuesta adaptativa a ciertos componentes de la fibra dietaria, si se ingieren en forma prolongada (4). De esta manera la edad pondría más en evidencia la influencia de ciertos glúcidos no amiláceos de AN, así como de su tipo particular de fibra, interaccionando en el medio complejo del intestino delgado. El retardo del efecto glucemiante fue más evidente en la prueba con el propio alimento en estudio que en la tolerancia glucídica, hecho similar a otro referido en humanos (7). La hiperglucemia basal típica de la línea β no disminuyó bajo la influencia de AN y AC, pero los signos clínicos de diabetes fueron atenuados y con AN ninguna rata evidenció glucosuria en edad madura. La menor digestibilidad de la fibra de AN, si bien no alcanzó significado estadístico, evidenciaría una mayor proporción de componentes indigeribles tales como lignina, hidratos de carbono no almidón (NSP), almidón resistente (amilosa retrodegradada), que estarían presentes en la mezcla vegetal ya sea en forma original o como resultado del procedimiento panadero aplicado. Los compuestos de la mezcla vegetal merecen ser identificados y estudiados en forma especial. Los presentes resultados preliminares establecen que esta mezcla vegetal compuesta principalmente por soja, es fisiológicamente activa y tendría la doble función de disminuir el ritmo de absorción glucídica en el intestino delgado (22) y de participar en el aumento significativo de la proporción de agua de las heces, lo cual conlleva una modificación implícita en el metabolismo del intestino grueso. El hecho de que esto ocurra sobre todo en edades post crecimiento es de importancia, si se tiene en cuenta que la mayoría de los diabéticos humanos integran los grupos de mayor edad (7).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo formó parte del PID de CONICET «Obesidad hipertriglicéridémica e hiperglucemia en una línea endocriada de ratas. Características cronobiológicas y efectos de modificaciones ambientales».

Agradecemos a la firma Soyanic-E Nicolosi la provisión de la mezcla vegetal estudiada y a Wiener Lab. la donación de reactivos químicos.

Por su valiosa colaboración técnica, a los docentes de la Cátedra de Biología, señores Héctor Ledezma, Mauro Páez y Santiago Porfiri.

REFERENCIAS

1. Van Soest P.J. Some Physical Characteristics of Dietary Fibre and their influences on Microbial Ecology of the Human Colon. *Proc. Nutr. Soc.* 43:25-33, 1984.
2. Hansen I. Dietary Fibre Products, their characteristics and gastrointestinal implication. En: *Dietary Fibre: Chemical and Biological Aspects*. Southgate, Waldron, Johnson & Fenwick (Ed). Cambridge, England, The Royal Society of Chemistry, p.264-276. 1990.
3. Bingham S. Mechanisms and Experimental and Epidemiological Evidence Relating Dietary Fibre (NSP) and Starch to Protection Against Large Bowel Cancer. *Proc. Nutr. Soc.* 49:153-171. 1990.
4. Johnson I.T. The Biological effects of dietary fibre in the small intestine. En: *Dietary Fibre: Chemical and biological aspects*. Southgate, Waldron, Johnson & Fenwick (Ed). Cambridge, England, The Royal Society of Chemistry. p.151-163. 1990.
5. Siljestrom M. & I. Bjlorck. Digestible and undigestible carbohydrate in autoclaved legumes, potatoes and corn. *Food Chem.* 38:145-152. 1990.
6. Wood P.J., J.T. Braaten, F.W. Scott, D. Riedel & L.M. Poste. Comparisons of viscous properties of oat and guar gum and the effects of these and oat bran on glycemic Inde. *J. Agric. Food Chem.* 38:753-757. 1990.
7. Jenkins D.J., T.M.S. Wolever, M.J. Thorne, A.L. Jenkins, G.S. Wong, R.G. Josse & A. Csima. The Relationship between glycemic response, digestibility and factors influencing the dietary habits of diabetics. *Am J. Clin Nutr.* 40:1175-1191. 1984.
8. Scalfani A. & D. Springer. Dietary obesity in adult rats: Similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Beha.* 17:461-471, 1976.
9. Rolls B.J. & E.A. Rowe. Dietary obesity: Permanent changes in body weight. *J. Physiol. (London)* 272,2P. 1977.
10. Association of Official Analytical Chemists. Protein (crude) in animal feed. 15th ed. Washington D.C., The Association. 1990.
11. Prosky L., N.G. Asp., T.F. Schweizer, J.W. Devries & I. Furda. Determination of insoluble, soluble and total dietary fibre in food and food products. *J.A.O.A.C.* 71:1017-1023. 1988.
12. Chang M.C. & W.C. Morris. Effectt of heat treatments on chemical analysis of dietary fiber. *J Food Sci.* 55:1647-1650. 1990.
13. Caldeari S.A., M.T. Font, O. Garroq, S.M. Martínez, J.C. Morini, R.c. Puche & M.C. Tarrés. The inbred IIM/Fm stock. *Rat News Letter.* 25:28-29, 1991.
14. Festing M.F.W. International index of laboratory animal, 6th ed. Leicester, England, Ed. M. Festing p.57. 1993.
15. Calderari S.A., A.C. González & M. Gayol. Spontaneous hypertriglyceridemic obesity and hyperglycemia in an inbred line of rats. *Int. J. Obesity* 11:571-579. 1987.
16. Forsum E., C. Eriksson, H. Göranzon & A. Sohlström. Composition of faeces from hum an subjects consuming diets based on conventional foods containing different kinds and amounts of dietary fibre. *Brit J. Nutr.* 64: 171-186. 1990.
17. Association of Official Analytical Chemists. Chloroform metanol extraction methods 15th ed. Washington D.C., The Association, 1990.
18. Rasper V.F., J.M. Brillouet, D. Bertrand & L. Mercier. Analysis of dietary fibre in feces of rats fed with fiber supplemented diets. *J. Food Sci.* 48:559-563, 1981.
19. Nutritional Evaluation of Protein Foods. Pellet P.L. and V.R. Young (Eds). Tokyo, The United Nations University. Food and Nutrition Supplement 4 (United Nations University World Hunger Programme) (WHTR-3/UNUP-129). p. 26. 1980.
20. Englyst H.N. & J.H. Cummings. Digestion of the polysaccharides of some cereal foods in the human small intestine. *Am J. Clin Nutr.* 42:778-787. 1985.
21. Wahlqvist M.L. Dietary fiber and carbohydrate metabolism. *Am J. Clin Nutr.* 45:1232-1236. 1987.
22. Gee J.M., R.M. Faulke & I.T. Johnson. Physiological effects of retrograded alpha-amylase-resistant cornstarch in rats. *Am J Nutr.* 121:41-49, 1991.

Recibido: 13-09-1994

Aceptado: 21-04-1995

Alterações histológicas de glândulas submandibulares e testículos induzidas por dietas à base de soja e dieta zinco deficiente em ratos

Vanderlei L.C.M.¹, Arruda Veiga M.C.F.², Reis N.S.³ y Tambeli C.H.²

RESUMO. Este trabalho teve por objetivo verificar, em ratos, as alterações histológicas das glândulas submandibulares e testículos induzidas por dietas à base de soja e dieta deficiente em zinco. A indução da deficiência de zinco produziu alterações testiculares incluindo atrofia de túbulos seminíferos, degeneração do epitélio germinativo e alterações na espermatogênese, e a nível de glândulas submandibulares uma significativa atrofia, com ácinos pouco delimitados. A dieta à base de soja sem complementação também comprometeu o processo de espermatogênese, com túbulos seminíferos atrofiados e redução do epitélio germinativo. A dieta à base de soja complementada, com mistura salina e vitamínica, não produziu alterações testiculares, mas a nível de glândulas submandibulares, induziu uma hipertrofia do componente ductal, principalmente com relação ao seu componente granular.

SUMMARY. Histologic alterations of the submandibular glands and testicles induced by soy and zinc deficient diets. The purpose of this study was to examine in rats the histologic alterations of the submandibular glands and testicles induced by soy diets and zinc deficient diet. The zinc deficiency produced testicles alterations including seminiferous tubulus atrophy, germinative epithelium degeneration, spermatogenesis alterations and a significant atrophy of the submandibular glands which presented no much delimited acines. The soy diet without complementations also compromised the spermatogenesis by showing seminiferous tubulus atrophied and a reduction of the germinative epithelium. The soy diet complemented by saline and vitaminic mixtures didn't produced testicles alterations but its induced in the submandibular glands a hypertrophy of the ductal component mainly in relation to the granular component.

Key words: Soy bean, Zinc deficiency, Submandibular glands, testicles.

INTRODUÇÃO

A soja é uma leguminosa de alto valor nutritivo (1) que têm sido largamente utilizada na alimentação humana sob várias formas (2) contudo, a presença de fatores antinutricionais pode comprometer a sua utilização como fonte alimentar.

Um dos principais fatores antinutricionais presentes na soja é o ácido fítico, que associado com proteínas vegetais é um dos responsáveis pela baixa biodisponibilidade de zinco nas leguminosas (3). Portanto é possível que a presença da soja na alimentação humana, possa tornar o consumo de zinco submarginal produzindo como consequência a deficiência desse mineral. O zinco é um oligoelemento fundamental em várias funções biológicas do organismo (4) e a sua deficiência produz uma série de alterações, tanto nos animais quanto nos

seres humanos (5). Os testículos são estruturas bastante sensíveis à deficiência de zinco e o hipogonadismo têm sido associado à deficiência desse mineral (6). Dentre as alterações produzidas pela deficiência de zinco no sistema reprodutor podemos destacar a atrofia de túbulos seminíferos, diminuição do número de células do epitélio germinativo, redução acentuada do número de espermatozoides, alterações na espermatogênese e diminuição dos níveis séricos de prolactina e testosterona (7,8,9).

A deficiência de zinco também tem sido relacionada à redução da secreção salivar e aumento da susceptibilidade à cárie dental (10), redução da fosfatase alcalina e danos nas células mioepiteliais das glândulas submandibulares (11) e, atrofia das glândulas submandibulares com diminuição do volume citoplasmático dos grânulos secretores (12). Este trabalho teve por objetivo verificar, em ratos, as possíveis alterações histológicas a nível testicular e das glândulas submandibulares induzidas por dietas à base de soja e dieta deficiente em zinco.

1 Departamento de Fisioterapia, FCT/UNESP. Brasil.

2 Departamento de Ciências Fisiológicas, FOP/UNICAMP. Brasil

3 Departamento de Histologia, IBC/UNICAMP. Brasil.

MATERIAL E METODOS

Formas utilizados para o presente trabalho 24 ratos machos, recém desmamados, pesando em média 55 gramas que foram distribuídos em gaiolas individuais de aço inox, separados em quatro grupos e submetidos às dietas A (controle padrão), B (deficiente em zinco), C (soja sem complementação) e D (soja complementada).

A dieta controle padrão (A) foi composta de 15 % de proteína (albumina), 5 % de óleo de milho, 5 % de fibra, 3,5 % de mistura salina isenta de zinco (13), 1 % de mistura vitamínica (14), 0,3 % de D.L. metionina, 0,15 % de cloreto de colina, 0,002 % de biotina, 0,6 % de mistura de zinco (15) e maizena para completar 100 %. A suplementação de biotina nesta dieta foi necessária devido à presença na albumina de avidina, uma glicoproteína que liga-se à biotina impedindo sua absorção (16). A dieta deficiente em zinco (B) foi composta de 15 % de proteína obtida através da caseína lavada com EDTA e o restante de sua composição foi semelhante à dieta A, como exceção da biotina e da mistura de zinco.

A soja utilizada para elaboração das dietas C e D foi da variedade IAC-8. A dieta (C) foi composta de farinha de soja integral (coação por 5 minutos e moída após secagem em estufa), com teor proteico de 42 %. A dieta de soja complementada (D) continha, além da farinha de soja integral 3,5 % de mistura salina isenta de zinco, 1,0 % de mistura vitamínica, 0,3 % de D.L. metionina e 0,15 % de cloreto de colina, com teor proteico de 40 %.

Os animais foram mantidos com suas respectivas dietas por um período de 69 dias, durante os quais foi realizado o controle de crescimento dos mesmos. Após esse período os animais foram sacrificados por hipovolemia e tiveram seus fêmures retirados, limpos e colocados em estufa por aproximadamente 12 horas a 105 °C. Posteriormente os mesmos foram moídos com o auxílio de um graal e levados à estufa para nova secagem por 4 horas, sendo então utilizados na preparação da solução de cinzas para a determinação de zinco que foi feita através de um espectrômetro de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente.

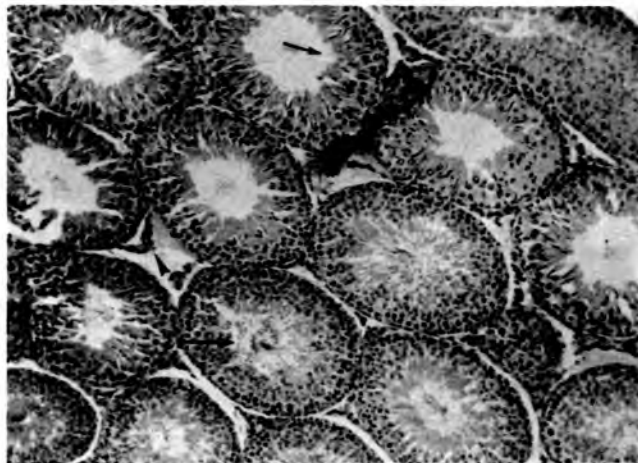
Foram também retirados o testículo esquerdo e as glândulas submandibulares, que foram fixadas em Bouin por um período de 24 horas e a seguir incluídas segundo técnica histológica de rotina, cortadas na espessura de 7 µ e coradas com HE e tricrômio de Mallory para o estudo histológico.

RESULTADOS

A análise histológica dos testículos dos animais submetidos à dieta à base de soja complementada (D) apresentaram aspectos de normalidade, semelhante ao grupo padrão (A) com túbulos seminíferos de tamanho normal e epitélio germinativo desenvolvido evidenciando-se os estádios 1, 7 e 14, característicos da espermatogênese da espécie (Figura 1)

FIGURA 1

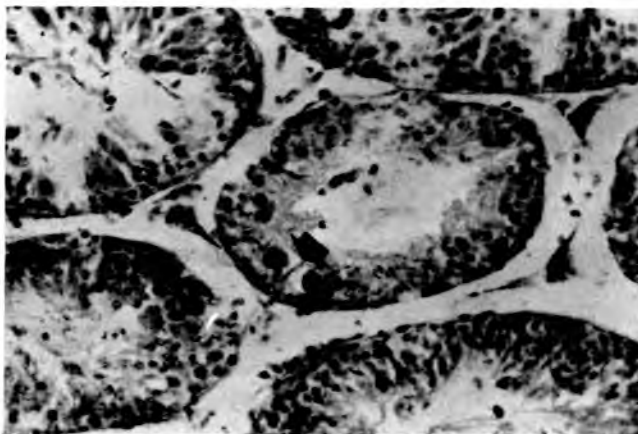
Corte transversal de túbulos seminíferos - Grupo D (soja complementada): Tecido intersticial (seta sem haste), estádios: 1 (seta pequena), 7 (seta média) e 14 (seta grande). HE aumento 160,5x



Os animais alimentados com a dieta deficiente em zinco (B) apresentaram atrofia de túbulos seminíferos, degeneração do epitélio germinativo e presença de espermátides multinucleadas com núcleos picnóticos. A espermatogênese nesses túbulos atrofícos vai até Cito I sendo raras as imagens características do estádio 7 (Figura 2).

FIGURA 2

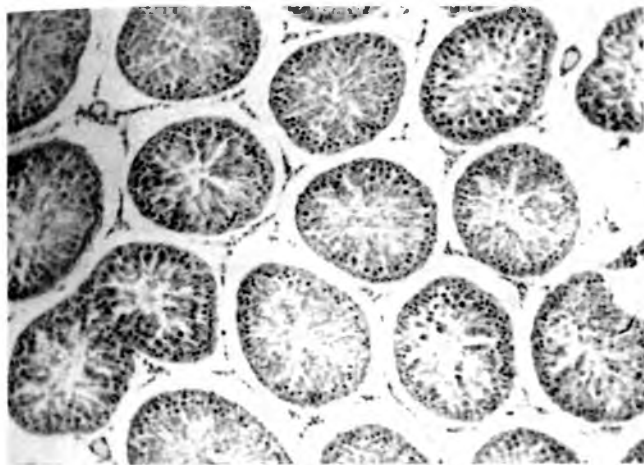
Corte transversal de túbulos seminíferos - Grupo B (Dieta deficiente em zinco): atrofia moderada e espermátides multinucleadas com núcleo picnóticos (seta). HE aumento 160,5x



Os animais submetidos à farinha de soja sem complementação (C) apresentaram túbulos seminíferos atrofiados quanto ao seu tamanho e espessura do epitélio germinativo sendo que, nesses animais não evidenciaram-se os estádios característicos da espermatogênese própria da espécie, notando-se a ausência principalmente do estádio 7. Os animais apresentaram alguns túbulos seminíferos com hiperacromatose (Figura 3).

FIGURA 3

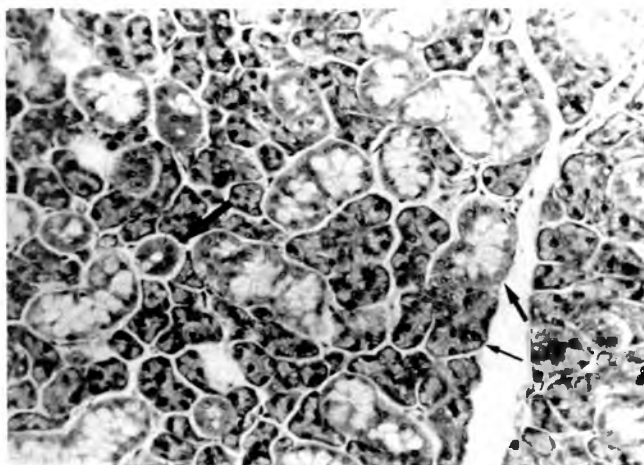
Corte transversal de túbulos seminíferos - Grupo C (soja sem complementação): epitélio germinativo atrofico, células com hiper cromatose. HE aumento 160,5x



A análise histológica das glândulas submandibulares dos animais submetidos à dieta padrão apresentou aspectos de normalidade. Observam-se ácinos serosos, ácinos mistos com crescente seroso e ductos intralobulares (Figura 4). Os animais submetidos à dieta deficiente em zinco mostraram atrofia das glândulas submandibulares sem distinção entre os elementos seroso e mucoso com ácinos pouco delimitados (Figura 5).

FIGURA 4

Fotomicrografia de glândula submandibular - Grupo A (dieta padrão): ácinos serosos (seta pequena), ácinos mistos com crescente seroso (seta média e ductos intralobulares (seta grande). HE aumento 321x



Os animais alimentados com soja sem complementação apresentaram glândula submandibulares com atrofia incipiente de ácinos e ductos com alguns núcleos picnóticos (Figura 6). Entretanto, nos animais submetidos à farinha de soja complementada observou-se uma hipertrofia do componente ductal, principalmente com relação ao seu componente granular (Figura 7).

FIGURA 5

Fotomicrografia de glândula submandibular - Grupo B (dieta deficiente em zinco): ácinos pouco delimitados, atrofia aparente em especial do componente ductal. HF aumento 321x

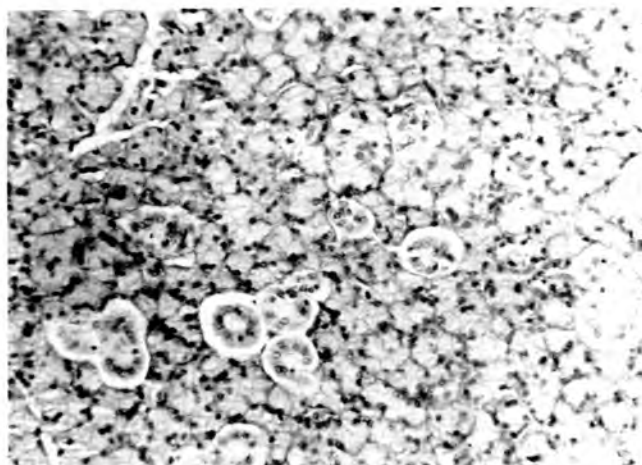
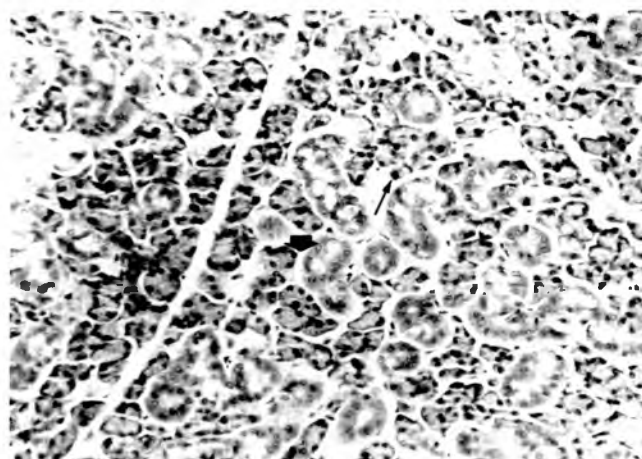


FIGURA 6

Fotomicrografia de glândula submandibular - Grupo C (soja sem complementação): núcleo celulares picnóticos (seta pequena), ácinos e ductos com atrofia incipiente (seta maior). HE aumento 321x

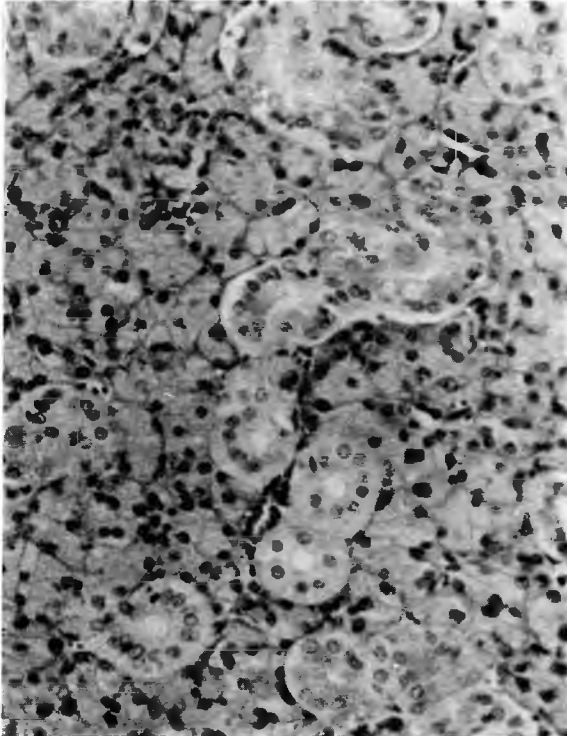


Em relação à concentração de zinco no lêmur podemos observar uma redução significativa nos animais submetidos às dietas B e D quando comparados com o grupo controle, como pode ser visualizado no Gráfico 1.

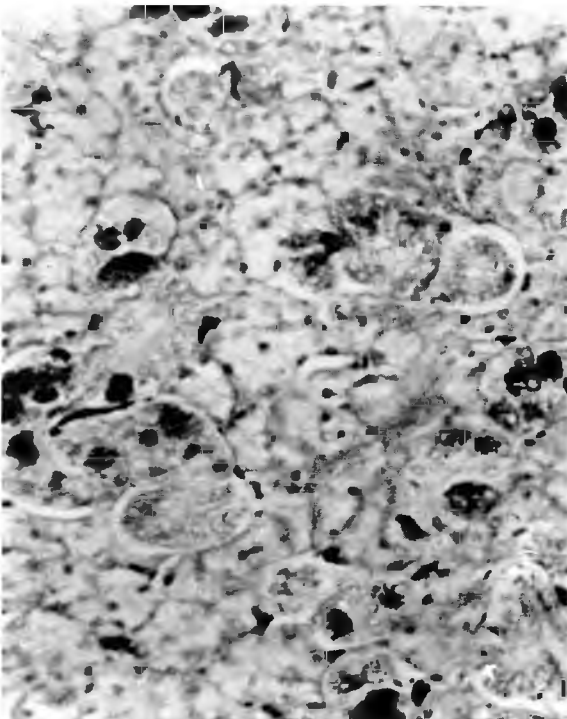
Os animais submetidos às dietas B e C tiveram uma redução significativa do ganho de peso em relação aos outros grupos (Gráfico 2).

FIGURA 7

Fotomicrografia de glândula submandibular (composição)
- Grupo D (soja complementada): hipertrofia de ductos
granulosos. Aumento 321x



HE



TRICRÔMIO

GRAFICO 1

Média do nível de zinco no fêmur dos animais submetidos às dietas A, B, C e D.

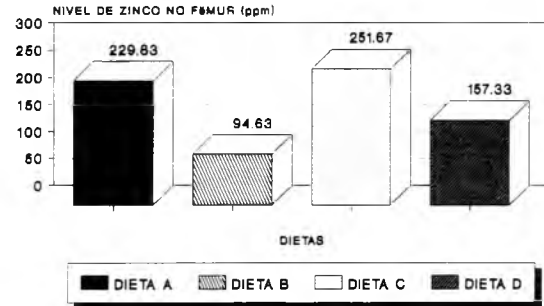
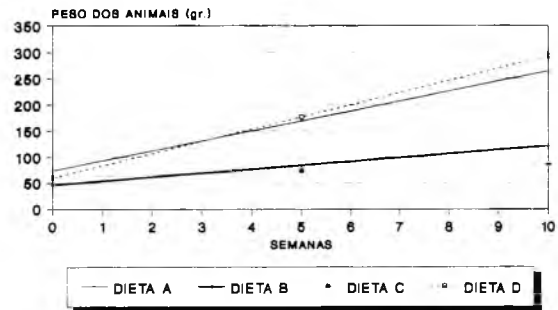


GRAFICO 2

Evolução dos pesos semanais dos animais submetidos às dietas A, B, C e D.



DISCUSSAO

Os animais alimentados com soja complementada com mistura salina e vitamínica, embora tenham apresentado uma redução de zinco a nível ósseo, esta não foi suficiente para comprometer o crescimento e o desenvolvimento testicular, uma vez que os mesmos foram semelhantes aos observado em animais submetidos à dieta padrão.

O requerimento de zinco necessário para o desenvolvimento normal de ratos alimentados com isolado protéico de soja é de 18 ppm (17), bem inferior ao valor encontrado para essa dieta que foi de 62 ppm.

Os animais submetidos à dieta deficiente em zinco apresentaram uma redução do crescimento, do nível de zinco no osso e alterações testiculares semelhantes às relatadas por outros autores (7, 8, 18). O hipogonadismo associado á deficiência de zinco está provavelmente relacionado a um comprometimento das células de Leydig (6).

Por outro lado, as alterações glândulares observadas nos animais alimentados com o a dieta à base de soja sem complementação, demonstram um comprometimento da

espermato gênese e uma atrofia incipiente de ácinos nas glândulas submandibulares que podem ser atribuídas as deficiências vitamínicas da soja (19) e ao quadro de anorexia desenvolvido por esses animais uma vez que os mesmos não apresentaram redução dos níveis de zinco no fêmur, provavelmente devido a drástica redução do crescimento.

A atrofia das glândulas submandibulares apresentada pelos animais deficientes em zinco pode estar relacionada, em parte, ao hipogonadismo uma vez que estas glândulas são andrógeno-dependentes (20) e foi encontrado uma desestabilização na interação do complexo andrógeno-receptor em células nucleares de glândulas submandibulares em animais deficientes em zinco (21). Porém, não podemos descartar a existência de outros mecanismos incluindo um efeito direto do zinco no desenvolvimento dessas glândulas uma vez que, a administração de testosterona em animais deficientes em zinco foi menos eficiente em produzir reversão das alterações observadas nessas glândulas do que uma dieta suplementada com zinco (12) e, têm sido demonstrado que o zinco têm um papel importante no desenvolvimento dos grânulos secretores das glândulas submandibulares (22).

As alterações observadas nas glândulas submandibulares dos animais alimentados com a farinha de soja complementada sugerem uma hiperfunção dessas glândulas. Esse aumento da atividade glandular pode estar relacionado ao elevado nível protéico apresentado por essa dieta (42%), uma vez que, entre os fatores ativos que as células dos ductos granulosos possuem estão incluídos proteases (23).

Portanto, a alimentação à base de soja sem complementação, causa uma drástica redução do crescimento e um comprometimento no desenvolvimento do testículo e das glândulas submandibulares de ratos. Por outro lado os animais alimentados com soja complementada com mistura salina e vitamínica apesar de apresentar uma leve redução do nível de zinco no osso apresentaram crescimento e desenvolvimento normal e uma hipertrofia de glândulas submandibulares.

REFERENCIAS

1. Carrão-Panizzi M.C. Soja proteína para milhões. *Ciências Hoje*, 6(33): 25-31. 1987.
2. Anonymus. Temos a soja, mais poucos sabem o que fazer com ela. *Aliment. & Nutr.* 2(4):14-9, Abr/Jun. 1981.
3. O'Dettl B.L., Burpo C.E., Savage J.E. Evaluation of zinc availability in foodstuffs of plant and animal origin. *J Nutr* 102:653-60. 1972.
4. Wada L.L., King J.C. Clinical, tissue and biochemical signs of zinc deficiency. *Comprehensive Therapy* 9(4):45-50. 1983.
5. Halsted J.A., Smith Jr. J.C., Irwin M.E. A conspectus of research on zinc requirements of man. *The Journal of Nutrition*, 104 (3):345-78. 1974.
6. Mansour M.M.S., Hafiez A.A., El-Kirdassy Z.h.M., El-Malkh M.N., Halawa F.A., El-Zayat E.M.I. Role of zinc in regulating the testicular function. Part 2. Effect of dietary zinc deficiency on gonadotropins, prolactin and testosterone levels as well as 3-hydroxysteroid dehydrogenase activity in testes of male albino rats. *Die Nahrung* 33(10):941-47. 1989.
7. Hafiez A.A., El-Kirdassy H.M., El-Malkh N.M., El-Zayat E.M.I. Role of zinc in regulating the testicular function. Part 3. Histopathological changes induced by dietary zinc deficiency in testes of male albino rats. *Die Nahrung*, 34(1):65-73. 1990.
8. Hambidge K.M., Casey C.E., Krebs N.F. Trace elements in human and animal nutrition. New York: Academic Press p.499. 1987.
9. Hafiez A.A., El-Kirdassy Z.H.M., Mansour M.M.S., Sharada H.M., El-Zayat E.M.I. Role of zinc in regulating the testicular function. Part I. Effect of dietary zinc deficiency on serum levels of gonadotropins, prolactin and testosterone in male albino rats. *Die Nahrung*, 33(10):935-40. 1989.
10. Fang M.M., Lei K. Y., Kilgore L.T. Effects of zinc deficiency on dental caries in rat. *J Nutrition*, 110:1032-36. 1980.
11. Chaudhry I.M., Meyer J. Response of submandibular gland of the rat to nutritional zinc deficiency. *J. Nutr.* 109:316-20. 1979.
12. Kondo I., Ozono S., Sato K., Ito Y. Histology of the submandibular gland in experimentally induced zinc-deficient mice. *Bull. of Kanagawa Dent. Col* 17(2):159-63. 1989.
13. Report of the American Institute of Nutrition. Ad Hoc. Committee on Standards for Nutritional Studies. *J Nutr* 17:1340-48. 1977.
14. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 11 ed., Washington: AOAC. 1970.
15. Stuart S.M.A. et al. Absorption of zinc and iron by rats fed meals containing sorghum food products. *J of Cereal Science* 6:81-90. 1987.
16. Gilman A.G. et al. As Bases Farmacológicas da Terapêutica 8. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1025. 1991.
17. Forbes R.M., Yoke M. Zinc requirement and balance studies with the rat. *J. Nutr.* 70:53-57. 1960.
18. Mason K.E., Burns W.A., Smith Jr. J.C. Testicular damage associated with zinc deficiency in pre and postpubertal rats: response to zinc repletion. *J Nutr* 112:1019-028. 1982.
19. Rackis J.J. Biological and physiological factors in soybeans. *J Am Oil Chem Soc.* 51:161A-174a. 1974.
20. Minetti C.A.S.A. et al. Differential actions of testosterone and its metabolites on mice submandibular gland. *Jour. Biol. Buccale*, 13:205-13. 1985.
21. Minetti C.A.S.A. et al. Androgenic expression in the submandibular gland of zinc-deficient mice. *Ann. Nutr. Metab.* 36(3):167-74. 1992.
22. Frederickson C.J., Pérez-Clausell J., Danscher G. Zinc-containing 7s-NGF complex. Evidence from zinc histochemistry for localization in salivary secretory granules. *J. Histochem. Cytochem.* 35:579-83. 1987.
23. Gresik E.W., Schenkein I., Barka T. Immunocytochemical localization of proteases in mature and developing mouse submandibular glands. *Anat. Rec.* 193:554. 1979.

Recibido: 10-10-1994

Aceptado: 29-04-1995

Zinc, copper and iron and their interrelations in the growth of sickle cell patients

Josefina A. Pellegrini Braga¹, José Kerbaury², Mauro Fisberg³

Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, Brazil.

SUMMARY. In this study we evaluated the nutritional status of 34 children with sickle cell disease (SS). Results were compared to 9 siblings with sickle cell trait (AS) and 35 eutrophic children who presented normal hemoglobin and normal hemoglobin electrophoresis (AA). All of them came from low socioeconomic level.

Analysis of the growth velocity curves revealed in SS group, tendency to increase deficit in weight and height with age. There was no relation between weight/height (W/H) and height/age (H/A) percentile and hemoglobin levels. There was no significant relation between nutritional status and severity of the disease. SS group showed significant skeletal maturation delay, the same did not occur with the siblings (AS group).

Plasma zinc levels were significantly lower in SS group than in AS and AA groups. In SS group there was some association between lower plasma zinc levels and H/A percentile lower or equal to 10. Plasma copper levels were significantly greater in SS group than in AS and AA ones, and there was no relation between plasma copper levels and serum ferritin levels.

In conclusion, our patients with sickle cell disease showed indexes of malnutrition, iron deficiency, hypercupremia and low plasma zinc levels related to low stature.

RESUMEN. Zinc, cobre, hierro y su interrelación con el crecimiento de niños con anemia falciforme. El estado nutricional de 34 niños con anemia falciforme fue evaluado. El grupo estudio (SS) fue comparado a un grupo de 9 hermanos de los pacientes, portadores de trazo falciforme (AS) y con un grupo control de 35 niños eutróficos, con hemoglobina y electrofóresis de hemoglobina normales (AA). Todos pertenecían a una clase socio económica baja.

El análisis de las curvas de velocidad de crecimiento reveló un standard de déficit progresivo en el peso y la talla en el grupo SS, con el incremento de la edad. No hubo relación entre los índices de percentiles peso/estatura y talla/edad con los niveles de hemoglobina. No se encontró una relación significativa entre el estado nutricional y la severidad de la enfermedad. El grupo SS presentó retraso significativo en la edad ósea, lo que no ocurrió con el grupo AS.

Los niveles plasmáticos de zinc fueron significativamente más bajos en el grupo SS que en los grupos AS y AA. Hubo alguna asociación entre bajos niveles de zinc y talla inferior al percentil 10. Los niveles de cobre fueron significativamente superiores, en el grupo SS comparados con AS y AA. No hubo correlación entre los niveles de cobre y ferritina sérica.

En conclusión, los pacientes con anemia falciforme presentaron índices elevados de malnutrición, ferropenia, hipercupremia y bajos niveles plasmáticos de zinc relacionados con baja estatura.

INTRODUCTION

The occurrence of growth and development delay in patients with sickle cell anemia (SS) has been recognized by many authors for some years (1-10). Kramer et al (11) have reported precocious assault in the growth curves of these patients, and these findings were confirmed later on by Platt et al (4) and Stevens et al (12), when they described in these individuals a presence of progressive decreased growth velocity up to adolescence. There has been also observed incidence of delay in the bone maturation in SS children, followed by delay in the epiphysis fusion during puberty (2, 12, 14, 15); however, the

1. Physician of Department of Pediatrics, Division of Clinical Pediatric, Department of Pediatric, Federal University of São Paulo (Escola Paulista de Medicina), São Paulo, Brazil.
2. Professor and Head of Division of Hematology, Department of Medicine, Federal University of São Paulo (Escola Paulista de Medicina), São Paulo, Brasil.
3. Professor and Head of Division of Nutrition and Metabolism, Department of Pediatrics, Federal University of São Paulo (Escola Paulista de Medicina), São Paulo, Brazil.

age in which this delay starts is still not well established. In the evaluation of the post-natal growth in patients with sickle cell anemia, Kramer et al (11), observed the occurrence of delay in bone maturation, increasing progressively with age.

In the last two decades, some studies have emerged trying to explain what would determine the growth delay in individuals with sickle cell disease. Hormonal, metabolic, intestinal absorption and nutritional evaluations, were performed (16-21).

Due to certain clinical similarities between individuals suffering from sickle cell anemia and those with zinc deficiency described by Prasad et al (22) since the 70's decade, it was suggested the hypothesis of occurring deficiency of this trace element in the sickle cell individuals.

Although not all studies are considered unanimous, several works have confirmed the existence of zinc deficiency in these patients (23-28).

The relation between the state of zinc and the growth delay in these patients was studied by Phebus et al (27), being related the presence of lower levels of serum zinc in patients who presented height-for-age below 5th percentile than those with normal growth. Others authors have also observed that there is a relation between lower levels of carbonic anhydrase (zinc-dependent enzyme) and the growth delay, in individuals with sickle cell anemia (29).

However, Russel et al (30) have not found an evident correlation between zinc concentration and the individual's growth, although they have observed lower levels of plasmatic zinc in SS patients with age below 12 years.

The interrelations between zinc and trace elements copper and iron, although very known, have been scarcely studied in these patients. Some works report the finding of hypercupremia in individuals with sickle cell anemia (14, 31, 32, 33). Some studies have demonstrated that the iron deficiency is not rare in sickle cell anemia (26, 34, 35) and 'the excessive iron accumulation can be related or not to the number of transfusions received (6, 36, 37, 38, 39).

So, this study was done aiming the evaluation of a group of children with sickle cell anemia, their growth and the zinc, copper and iron status and their possible interrelation.

MATERIAL AND METHODS

The population studied consisted of 34 children suffering sickle cell anemia (SS), whose ages varied from 1 to 11 years, 16 of them (47%) were male. All were attended in the Hematology Sector, Federal University of São Paulo (Escola Paulista de Medicina), in São Paulo, Brazil.

The control group consisted of two distinct groups. One of them consisted of 9 sibling of the patients with sickle cell trait (AS), whose ages varied from 3 to 11 years. The other one consisted of 35 eutrophic children (AA), from the same environment, whose ages varied from 1 to 11, all of them with normal dosages of hemoglobin and electrophoresis hemoglobin.

The diagnosis was established through the electrophoresis of hemoglobin in cellulose acetate, pH=8,0. Fetal hemoglobin was assayed by method of Betke (40).

All patients were supplemented with folic acid (5 mg per day) from the diagnosis (41), the patients did not received any blood transfusion in the last three months.

Anthropometry: Weight and stature were measured by one observer. The children were without shoes and wearing light clothes. To evaluate nutritional status, weight/height (W/H) and height/age (H/A) indices were analysed, using the NCHS tables for reference (42), considering as malnourished children presenting W/H below P 10 and stunted the one presenting H/A below P10.

The stature was measured with the stadiometer. The child was put standing erect, with knees together and the line of vision directed horizontally. All children were weight in anthropometric scale, always after previous checking.

Socio-Economical level: The socio-economical level was evaluated through Graffar' method (43), modified by Grunberg et al (44).

Dietary intake analyses: A dietary intake analysis was performed through the 24 hours recordatory method average of three records (45) and analysed later on in relation to the energetic, iron, zinc and copper intake.

Disease's severity: The severity rate was established by the number of hospital admittance occurred caused by the disease's complications until now.

Bone age: The bone ages of the patients and their brothers were obtained through the left wrist and hand radiography, analysed under the Grewlich & Pyle Criteria (46).

Hematological evaluation: the ferritin levels in children with sickle cell disease were analysed in serum by kits (Abbott® Laboratories).

Laboratory: Sediment urinary and stools exams were done in order to evaluate blood loss. Electrophoresis of proteins were done in the patients. In the three studied groups, the zinc and copper levels were determined in plasma. The analysed blood was collected in polypropilen tubes, metal free, followed by the plasma separation in which was stocked to -20 °C until the trace elements could be determined by atomic absorption spectrophotometry (Perkin-Elmer, 5100 PC pattern) (47).

Data analysis: In the statistical analysis, depending on the variables the following tests were used: Fisher's Exact, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, Mc Nemar (48), Statistical significance was set at $p < 0,05$, and when significant it will be should by an. *

RESULTS

Through the socio-economical level it was observed that 73.53% of the patients were in the levels IV and V of Graffar, confirming their low socio-economic situation and 27% of the patients were in the level III.

The SS children presented percentile W/H and H/A significantly lower than the control group AA and was not significant with group AS (Table 1). The malnourishment percentage in the studied patients was 3.9 times higher than the percentage showed by their siblings (Table 2). There was not any significant association between the disease's severity and nutritional state. There was no relation between the hemoglobin values and the W/H and H/A percentiles (Table 3).

TABLE 1
CHILDREN WITH SICKLE CELL ANEMIA (SS) AND CONTROL GROUP (AA), ACORDING WEIGHT -FOR- AGE (W/A) AND HEIGHT -FOR- AGE (H/A) PERCENTILE

Groups	W/H percentile		H/A percentile	
	<or=10	>10	<or=10	>10
SS	11	23	9	25
AA	0	35*	0	35*
AS	1	8	0	9

Fisher's test *P= 0.0002 (significant)

TABLE 2
CHILDREN WITH SICKLE CELL ANEMIA (SS) PAIRED WITH THEIR SIBLINGS (AS) AND CORRELATED WITH NUTRITIONAL STATUS

SS (n=12)	AS (n=12)		Total
	Eutrophic	Malnourished	
Eutrophic	3 (25%)	1 (8%)	4 (33%)
Malnourished	7 (58%)	1 (8%)	8 (67%)
Total	10 (83%)	2 (17%)	12 (100%)

Mac Nemar' test *p = 0.038 (significant)

HbSS-W/H <P10= 8/12= 0,666= 67%

HbAS-W/H ≤P10= 2/12= 0,166= 17%

(a) It was possible to compare 12 patients whithin their families. The 12 patients were paired with their siblings (9 siblings), resulting in 12 pairs- SS X AS.

TABLE 3
HEMOGLOBIN LEVELS AND PERCENTILE HEIGHT -FOR- AGE (H/A) AND WEIGHT -FOR- AGE (W/A) IN CHILDREN WITH SICKLE CELL ANEMIA

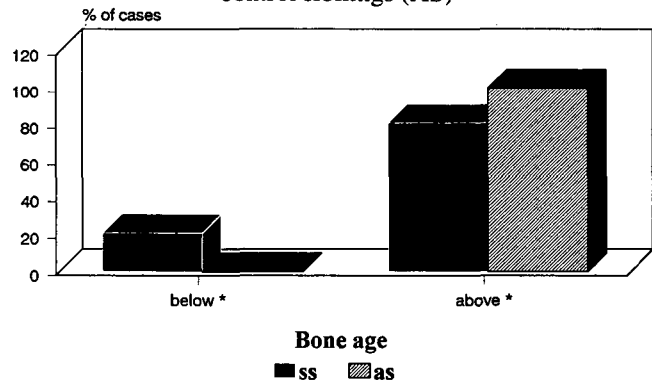
Percentil	Hb g/dl mean (sd)	
	W/H	H/A
<or=P10	7.06 (1,05)	7.14 (0.99)
>P10	7.56(1,21)	7.51(1,2)
Mann-Whitney'test	p=0,14	p=0,25

In the dietary intake analysis (measured by three days recordatory survey), it was concluded that the diet of the patients and their siblings were qualitatively and quantitatively inadequate in energy, iron, zinc and copper intake. Food which could interfere in the absorption of these trace elements (fibers) was consumed in very small quantities (data will be presented in another publication).

All patients presented serum albumin dosage within the normal limits (>3,5 g/dl). Level of serum ferritin lower than 25 ng/ml were observed in 13,3% of the patients. Blood loss was not noticed through urine and stools exams.

There was significantly delay in bone age in the SS group in which 23,5% of the children presented bone age below second standard deviation of normality. In the AS group, all presented bone maturation within the normal standards (Graphic 1).

GRAPHIC 1
Bone ages, below and above the 2nd standard deviation of normality, of children, with sickle cell anemia (SS) and control sibilings (AS)



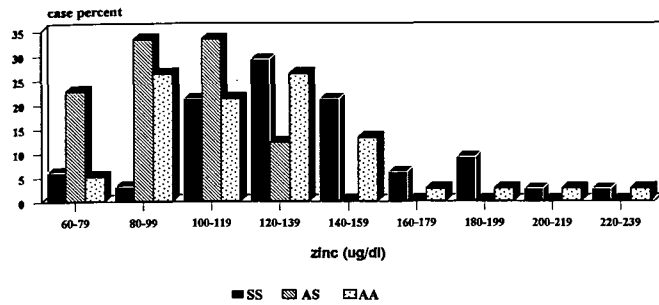
* Second of interior

When we compare the plasmatic levels of the zinc and copper trace elements in the three studied groups, we could verify that in the SS group (98.68 mcg/dl), the zinc level were significantly lower than the AS (123,33 mcg/dl) and AA (145,71 mcg/dl) groups (Graphic 2); and the copper levels

were significantly higher in the SS group (133,24 mcg/dl) than in the other ones (AS-94,44 mcg/dl; AA-117,43 mcg/dl) (Graphic 3).

GRAPHIC 2

Plasma zinc in children with sickle cell anemia (SS), sibilings (AS), and control group (AA)

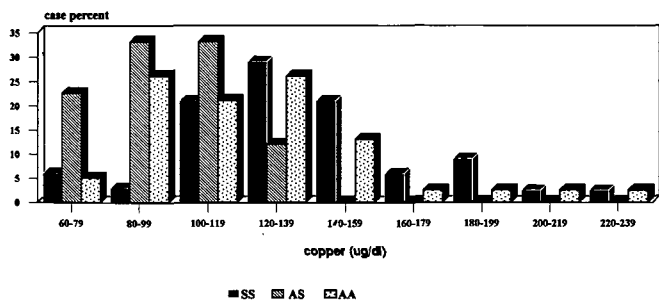


Zinc ug/dl (media)	SS	AS	AA
	98,68	123,33	145,71

KRUSKAL-WALLIS: SS < AS and AA

GRAPHIC 3

Plasma copper in children with sickle cell anemia (SS), sibilings (AS), and control group (AA)



Copper ug/dl (media)	SS	AS	AA
	98,68	123,33	145,71

KRUSKAL-WALLIS: SS > AS and AA

The statistical analyses (Mann-Whitney) showed a significant relation between lower zinc levels and low stature. There was no significant correlation between the copper and ferritin levels.

DISCUSSION

In this study, the SS patients presented significant deficit in height when compared to the controls groups (AS e AA), which increased with age. These results agree with the observations previously related by Phebus et al (3); Platt et al (4); Stevens et al (12), Gray et al (49).

It could be expected a high rate of malnourishment in these

patients, since a low energetic intake in the diet's family was observed and 73,53% of these families belonged to less privileged socio-economical levels (Graffar IV and V). However, this finding is dissonant when we compare the patient's nutritional state with their sibling's. This is because only 1 of their siblings presented malnourishment (W/H<10 percentile).

Then, considering that the two groups have the same genetic patterns and are submitted to be same socio-economic conditions and diet, there must be other factors involved in the malnutrition of the SS children, like chronic anemia, the state of chronic disease itself, a greater requirement of caloric intake or even specific deficit of nutrients.

It is interesting to observe that even though chronic anemia can affect the growth, in the sickle cell anemia little correlation has been found (6,50), and this fact was not observed in our study either.

The presence of a more accelerated metabolism could increase the nutritional necessities in these patients (17) and since the diet of these children has been related as diminished or normal (18), these factors could contribute to the growth deficit. However, in this study, individual reports of some patients refer to normal or increased food intake.

The disease's severity influence on the growth was evaluated by Lowry et al (50), when they observed a trend towards low weight in those patients who presented more hospital admissions. In our study, we did not observe any association between malnutrition and past hospital admission.

The iron deficiency can alter the performance and growth in children. Some works have observed higher prevalence of iron deficiency anemia in children who live in countries in development (35,37,51). The lack of iron observed in our patients was probably due to an inadequate diet concerning iron, since there was no blood loss through stools and urine. There was not any association with iron level and malnutrition, since 100% of these individuals with iron deficiency, were eutrophic.

The observation of significant delay in bone age in SS patients and the fact that this has not happened in their siblings reaffirm the hypothesis that the cause of the growth retardation observed in these individuals probably does not depend on the hereditary and socio-economical factors. So, in the last decades, some studies have emerged trying to correlate the growth delay with zinc deficiency observed in these individuals (27, 52).

The reasons which would determine the presence of low levels of zinc in sickle cell anemia are still not determined. The causes are still questioned, a generalized lack of intake which would cause in these patients, an appetite and/or taste alteration, with a possible worsening of malnourishment, is a possibility.

In our patient's diet evaluation we could notice a low zinc intake, but only this fact could not justify the low levels obtained in our patients since their siblings are also submitted to the same diet and do not present a significant deficit of this trace element.

However, it is also possible that the daily recommendations used in the diet to the healthy population can not be appropriate to children suffering from sickle cell anemia (27,28), since the existence of chronic anemia, increased of reticulocytosis and the state of chronic disease itself could require an increase of caloric requirements and other nutrients.

Another probable mechanism for the zinc deficiency could be the diminution of zinc absorption in diet through the usage of fibres, but when we have evaluated our children's diet we did not notice this factor.

Zinc deficiency in sickle cell anemia may be secondary hyperzincuria. The reason for hyperzincuria in SS patients is not clear, may be resulted of a increased filtration of zinc by the glomeruly, or defect in tubular reabsorption of zinc, or chronic hemolysis of erythrocytes rich in zinc (23,31).

The possibility of the decrease of zinc levels be related to albumin was put aside since the dosage of seric albumin was within the normal patterns, also observed by Phebus et al (27).

Finally, it is important to underline that plasmatic zinc represents only a little part of the total of zinc in the body, so, for a better evaluation of the nutritional state of this element in the organism, it is necessary dosages in the hair, in the erythrocytes, urinary, neutrophils and the zinc dependent enzymes, which is of extreme importance, because this can be the main factor for the disagreement of findings among several authors, since in the majority of the studies it is done only plasmatic or seric zinc dosage.

The finding of elevated levels of plasmatic copper in our patients makes us question a possible interrelation between the iron and copper metabolism in this patients, making a hypercupremia state possible. This hypothesis was also mentioned by Kapu et al (32), however, we have not observed this correlation. It must be considered that other elements also present an interrelation with copper, making possible interference in the levels of this element in the organism, like ascorbate acid and zinc.

The elevation of copper levels could result from decrease of zinc level. Antagonist interaction between zinc and copper were demonstrated in nutritional studies in human beings (53,54). Since zinc and copper compete in the intestinal level through the same place of absorption, the deficit of one of them could promote an elevation of the other and vice-versa.

Since in our patients the other causes that could promote elevations in copper levels (external contamination, inflammatory processes, tobacco, oral contraceptives, estrogens, infection and the usage of corticosteroid in initial phase) were put aside, the elevated levels of copper must probably be related to the interactions of it with zinc and/or iron metabolism.

So we could verify that children with sickle cell anemia present their nutritional state compromised, characterized by growth delay, bone age delay, plasmatic zinc levels diminution and increased in the levels of plasmatic copper. The finding of depletion in zinc levels confirm this trace element can be one

of the probable responsible factor for the growth retardation in SS children.

REFERENCES

1. Gray R.M. Clinical features of homozygous SS disease in Jamaica children. *W. Indian Med. J.*, 20:60, 1971.
2. Mc Cormack M.K., L. Dicker, S.H. Katz, M. Caleb, J. Mc Daniels, A. Humphery, I. Bucherti, B. Lubin. Growth patterns of children with sickle cell disease. *Hum Biol.* 48:429-37, 1976.
3. Phebus C.K., M.F. Gloninger, B.J. Maciak. Growth patterns by age and sex in children with sickle cell disease. *J. Pediatr.* 105:28-33, 1984.
4. Platt O.S., W. Rosenstock, M.A. Espeland. Influence of sickle hemoglobinopathies on growth and development. *N. Engl. J. Med* 311:7-12, 1984.
5. Scott R.B., A.D. Ferguson, M.E. Jenkins, H.M. Clark. Studies in sickle cell anemia. VIII Further observation on the clinical manifestations fo sickle-cell anemia in children. *Am J. Dis Child* 90:6682-91, 1955.
6. Siemes M.A., J.E. Jr. Addiego, P.R. Dallmar. Ferritin in serum: diagnosis or iron deficiency and iron overload in infants and children. *Blood* 43(4):581-90, 1974.
7. Whitten C. Growth status of children with sickle cell anemia. *Am J. Dis Child.* 102:355-64. 1961.
8. Winsor T. & G.E. Burch. Habitus of patients with sickle cell anemia. *Am J. Med Sci.* 307 (6):405-407, 1994.
9. Henderson R.A., J.M. Saavedra, G.J. Dover. Prevalence of impaired in growth in children with homozygous sickle cell anemia. *Am J Med Sci.* 307(6):405-407, 1994.
10. Zago M.A., J. Kerbauy, H.M. Souza, M.S. Figueiredo, F.F. Costa, S.M.P. Cruz, J.A.P. Braga, D. Alvarenga, J.U. Ribeiro, L.G. Tone, B.O. Pinto. Growth and sexual maturation of Brazilian patients with sickle cell diseases. *Trop. Geogr. Med.* 44:317-21, 1992.
11. Kramer M.S., Y. Rooks, L.A. Washington, H.A. Pearson. Pre and post natal growth and development in sickle cell anemia. *J. Pediatr.* 96 :857-60, 1980.
12. Stevens M.C.G., G.H. Maude, L. Cupidore, H. Jackson, R.J. Hayes, G.R. Serjeant. Prepubertal growth and skeletal maturation in children with sickle cell disease. *Pediatrics*, 78:124-32, 1986.
13. Serjeant G.R. & M.T. Aschcroft. Delayed skeletal maturation in sickle cell anaemia in Jamaica. *Johns Hopkins Med. J.* 132: 95-102, 1973.
14. Olambiwonu N.O., R. Penny, S.D. Frasier. Sexual maturation in subjects with sickle cell anemia. Studies of serum gonadotropin concentration, height, weight and skeletal age. *J. Pediatric* 87: 459-64, 1975.
15. Harris V.J., L. Green, R.A. Seeler. Delayed skeletal maturation in young children with sickle cell disease. *J. Pediatr.* 89:855-6, 1976.
16. Abassi A.L., A.S. Prasad, J. Ortega, E. Congco, D. Oberleas. Gonadal function abnormalities in sickle cell anaemia. *Ann Intern. Med.* 85:601-5, 1976.
17. Odonkor P.O. Metabolic and endocrin basis of the growth retardation in sickle cell disease. *Bull. Europ. Hisiopath. Resp.* 19:357-9, 1983.
18. Heyman M.B., R. Katz, D. Hurst, D. Chur, A. Ammann, E. Vichinsky, B. Gaffield, R. Castillo, K. Kleman, M.M. Thaler,

- B. Lubin. Growth retardation in sickle-cell disease treated by nutritional support. *Lancet*: 903-6, 1985.
19. Reed J.D., R. Redding-Sallinger, E.P. Orringer. Nutrition and sickle cell disease. *Am J. Hematol.* 24:441-55, 1987.
 20. Enwonwu C.O. The effect of sickle-cell anaemia on protein, amino-acid, and zinc requirement. *Food and Nutrition Bulletin*, 11:71-8, 1989.
 21. Tangney, C.C.; Phillips, G.; Gell, R.A.; Fernández, P.; Hopkins, R.; WU, S.M. Selected indices of micronutrient status in adult patients with sickle cell anemia (S.C.A.). *Am. J. Hematol.* 32: 161-2, 1989.
 22. Prasad A.S., A.J. Miale, Z. Farid, H.H. Sansteadd, A.R. Schullert. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism. *J. Lab Clin Med.* 61(4):537-49, 1963.
 23. Prasad A.S., E.B. Schoomaker, J. Ortega, G.J. Brewer, D. Oberleas, F.T. Jr. Oelshlegel. Zinc deficiency in sickle cell disease. *Clin. Chem.* 21:582-7, 1975.
 24. Prasad A.S. Zinc deficiency in man. *Am J. Dis. Child*, 130:359-61, 1976.
 25. Niell H.B., B.E. Leach, A.P. Kraus. Zinc metabolism in sickle cell anemia. *J. Am Med Assoc.* 242:2686-7, 1979.
 26. Vichinsky E., M. Heyman, D. Hurts, D. Chiu, B. Gaffield, K. Thompson, K. Kleiman, B. Lubin. Nutrition in sickle cell anemia (HbSS). *Pediatr. Res.* 18 (251-A), 1984.
 27. Phebus C.K., B.J. Maciak, M.F. Gloninger, H.S. Paul. Zinc status of children with sickle cell disease: relationship to poor growth. *Am J. Hematol* 29 (67-73), 1988.
 28. Kilinc Y., M. Kumi, B. Yilmaz, A. Tanyelli. A comparative study of zinc and copper values in serum erythrocytes and urine in sickle cell homozygotes and heterozygotes. *Acta Paediatr.. Scand.* 80:873-874, 1991.
 29. Daeschner III C.W., M.C. Matustik, V. Carpentieri, M.E. Haggard. Zinc and growth in patients with sickle cell growth in patients with sickle cell disease. *J. Pediatr.* 98:778-80, 1981.
 30. Russel M.O., A. Finan, S.R. Moskowitz, M.A. Elmer, F.M. Gill. Nutrition and poor growth in pre-adolescent children with sickling disorders. *Pediatr. Res.* 15:586, 1981.
 31. Prasad A.S., J. Ortega, G.J. Brewer, D. Oberleas, E.B. Schoomaker. Trace elements in sickle cell disease. *J Am Med. Assoc.* 235:2396-8, 1976.
 32. Kapu S.H., A.F. Fleming, B.U. Ezem. Plasma copper in sickle cell anaemia. *Lancet*, 11:153-4, 1976.
 33. Behera S.K., K.N. Satpathy, B.K. Patnaik, C. Panda, D. Das. Serum copper in sickle cell disease. *Indian Pediatrics*, 18:395-9, 1981.
 34. Haddy T.B. & O. Castro. Overt iron deficiency in sickle cell disease. *Arch Intern. Med.* 142:1621-24, 1982.
 35. Rao K.R.P., A.R. Patel, G.R. Honig, L.N. Vida, P.R. MC Ginnis. Iron deficiency and sickle cell anemia. *Arch. Intern Med.* 143:1030-2, 1983.
 36. Peterson C.M., J.H. Graziano, A. Cuitiis, R.W. Grady, A. Cerami, M. Worwood, A. Jacobs. Iron metabolism, sickle cell disease, and response to cyanate. *Blood*, 46 (4):583-90, 1975.
 37. O'Brien R.T. Iron burden in sickle cell anemia. *J. Pediatr.* 92:579-82, 1978.
 38. Davies S., J.S. Henlhorn, A.A. Win, M. Brozovic. Effect of blood transfusion on iron status in sickle cell anemia. *Clin Lab. Haematol.* 6:117-23, 1984.
 39. Adekile A.D., T.B. Haddy, O.L. Castro, R.B. Scott. Correlation of serum ferritin with tests of iron status in sickle cell disease. *Am J. Ped. Hematol. Oncol.* 7(3):295-319, 1985.
 40. Betke K., H.R. Marti, I. Schilght. Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. *Nature* 184:1877-8, 1979.
 41. Watson-Williams E.J. Folic acid deficiency in sickle cell disease. *East African Med. J.* 39:213-21, 1972.
 42. National Center for Health Statistics: NCHS growth curves for children 0-18 years, United States. *Vital and Health Statistics. Series 11, N° 65.* Health Resouces Administration. Washington D.C. 1977. United States Government Printing Office.
 43. Graffar M. Une method de classification sociale d'enchantillons de la population. *Courrier* 6:455, 1956.
 44. Grunberg J., M. Esquivel, A. Sitkewich, Y. Farias. Método de clasificación social de Mc Graffar: instructive como modificacione y definiciones. *Courrier* 31:492-4, 1981.
 45. Flores M. Niveles dietéticos de familias y niños según estado socio-económico en el área rural de Panama. *Arch Latinoamer Nutr.* 25:135-62, 1975.
 46. Grewlich W.W. & S.J. Pyle. Radiografic atlas of skeletal development of the hand wrist. 2° ed. Stanford, Stanford University Press. 256p. 1959.
 47. Fernández F.K. & H.L. Kahan. Clinical methods for atomic absorption spectroscopy. *Clin. Chem Newsletter* 3:24-6, 1971.
 48. Siegel S. Estadística no paramétrica. México, Trillas, 346p. 1975.
 49. Gray N.T., J.M. Bartlett, K.M. Kolasa, S.P. Marcuard, C.T. Holdbrook, R.D. Horner. Nutritional status and dietary intake of children with sickle cell anemia. *Am J Hematol-Oncol*, 14(1):57-61, 1992.
 50. Lowry M.F., P. Desai, M.T. Aschcroft, B.E. Serjeant. Heights and weights of Jamaican children with homozygous sickle cell disease. *Hum Biol.* 49:429-36, 1977.
 51. Vichinsky E., K. Kleman, S. Embury, B. Lubin. The diagnosis of iron deficiency anemia in sickle cell disease *Blood*, 58:963-8, 1981.
 52. Prasad A.S. & Z.T. Cossack. Zinc supplementation and growth in sickle cell disease. *Ann. Inter Med.* 100:367-71, 1984.
 53. Pfeiffer C.C., E.W. Jenny. Excess oral zinc in man lowers copper levels. *Fed. Proc.* 37:324, 1978.
 54. Prasad A.S., G.J. Brewer, E.B. Schoomaker. Hypocupremia induced by zinc therapy in adults. *J Am Med. Assoc.* 240:2166-8, 1978.

Recibido: 21-06-1993

Aceptado: 23-06-1995

Effects of dietary fat and nitrite on plasma and corporal density

Rebeca C. de Angelis ¹, Ilza C.M. Terra ², Julieta H. Scialfa ³, Itamar Klempes F. ⁴

The Nutrition Center, Department of Physiology and Biophysics, Inst. Ciências Biomédicas, University of São Paulo, Brazil.

SUMMARY. Two groups of nine weanling male rats each were fed different diets for 60 days. Group A (control) was fed a full casein diet containing 17% protein. The group B received the same diet plus nitrite, fried bacon and proline. Diet B induced increased body weight gain and increased plasma l-lactic acid and cholesterol levels, as well as a decrease in plasma selenium. We suggest that the adverse effects of diet B are related to peroxidation, with an increased nutritional need for selenium.

Key words: nitric, selenium, needs, lactic acid, cholesterol

RESUMO. Efeitos da gordura e nitrito da dieta na densidade corporal. Dois grupos de nove ratos desmamados foram alimentados com diferentes dietas por 60 dias. O grupo A (controle) recebeu dieta completa com 17% de proteína (caseína). O grupo B, recebeu a mesma dieta adicionada de nitrito, bacon frito e prolina. A dieta B provocou: aumento do ganho de peso; aumento dos níveis plasmáticos de ácido láctico e colesterol, com redução do selênio. Sugere-se que os efeitos adversos da dieta B estejam relacionados à peroxidação, como aumento das necessidades nutricionais de selênio.

Palabras Chave: nitrito, selênio, ácido láctico, colesterol.

INTRODUCTION

Nitrite is present in most foods as a natural component or as an additive. Extensive evidence suggests that nitrite in the body is a precursor of N-nitrosamines and N-nitrosamides which exert a carcinogenic action through nucleic acid methylation. The effects are enhanced by the presence of some amino acids such as proline, and by the ingestion of fried bacon. (1)

The nitrosamine content in consumer products, such as bacon, were significantly reduced in the last years, but it still present. (2) Frying the nitrite-cured bacon (3) results in the formation of some carcinogenic volatile N-nitrosoproline (NPro) which is excreted by the urine. However Wagner and Tannenbaum (4) found no differences of urine NPro among groups consuming lunches of hot dogs containing proline plus nitrite, or, nitrite-free, suggesting that the nitrosation was insignificant compared to endogenously produced nitrite.

The bioavailability of nutrients (BA) reflects their final utilization in the body through the process of digestion,

intestinal absorption, competition and interaction, utilization by the tissues, and excretion. Thus, BA depends not only on the nutrient content of ingested food but also on the entire system of food processing and on the physiological conditions of the organism, i.e., it depends on both extrinsic and intrinsic factors. Under special conditions, the needs for some nutrients can be modified. (5,6,7)

The present experimental study was undertaken to determine whether the presence of nitrite and bacon in diet produce some impairment in the plasmatic selenium and cholesterol levels.

MATERIAL AND METHODS

Animals: Two randomised groups of weanling male wistar rats having an average initial weight of 112.7 ± 5.95 g were fed different diets for 60 days. The animals (9 per group) were maintained in individual cages.

Diets: The basic diet (group A, control) consisted of 200g/Kg casein completed with all nutrients. Group B received the basic diet plus 24 mg/Kg sodium nitrite, 100g/Kg bacon and 10mg proline (Diet NB).

Rats were fed *ad libitum* for 60 days and Food Intake was measured. At the end of the experimental period six animals/group were anesthetized with ether, decapitated and bled.

1 Professor Associado. Presidente da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, SBAN.

2 Técnico Especializado. Biologista Doutor.

3 Técnica Especializada.

4 Técnico Especializado.

Plasma cholesterol, selenium and L-lactic were determined. The composition of the diets is given in Table 1.

TABLE 1
COMPOSITION OF DIETS. DATA ARE REPORTED
PER Kg.

Diet	A Control	B NB
Casein (g)	200	200
Nitrite (mg)	—	24
Bacon* (g)	—	100
Proline (mg)	—	10
Minerals (g)**	40	40
Vitamins (g)**	50	50
Oil (g)	80	—
Starch(+)	<1.000	<1.000
Protein %(++)	17.6	17.9
Fat %(++)	8	8.20
Selenium (ug/g)(++)	0.105	0.105

* Fried Bacon in 10ml oil

+ Starch- to complete 1 Kg

** Minerals, vitamins (8)

++ Determined in diets

Protein - Kjeldahl method (N x 6.25) (8)

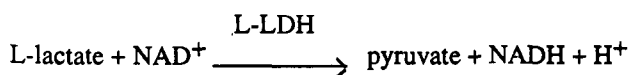
Fat- Extraction of 2g of the diet with chloroform/metanol (2/1)

Selenium - As described in Methods.

Determinations

Dietary protein: Dietary protein was measured by the classical Kjeldahl (9), method (N x 6.25).

Lactic acid. Lactic acid was determined by oxidation in the presence of NAD⁺ and L-lactate dehydrogenase (L-LDH) to pyruvate, which is trapped in the presence of L-glutamate and glutamate-pyruvate transaminase (GPT):



The resulting NADH is measured by absorbance at 340 nm and absorbance is compared to a reference (Boehringer Mannheim Reagents)(10).

Selenium. Selenium was measured by the fluorimetric method, modified (11)*.

* Laboratoire de Controle Nestlé. Selenium fluorometrie. Dosage du selenium par fluorimetric. Ciclobond I (Betacyclodextrin). 1990 (Personal information).

Plasma cholesterol (Ch) was measured using the Signos Diagnostic-cholesterol Enzymatic Determination method (12). Plasma protein was measured by the biuret reaction (13).

Lipids in diet measured by the weight of the dry extract of chloroform/metanol (2/1).

Body density was measured by immersion in water. Three rats/group. Determined by: body weight/difference of the water volume before and after immersion of each animal.

RESULTS

The average variation in body weight and food intake is shown in Table 2.

TABLE 2
THE AVERAGE VARIATION OF BODY WEIGHT
(BWV), FOOD INTAKE (FI), BODY DENSITY (D)
OVER A PERIOD OF 60 DAYS FOR THE CONTROL,
AND NITRITE BACON DIETS

Group	BWV (g)	FI (g/d)	D(g/ml)
A-Control	43.96 (7.57) ^{a*}	24.41 (1.02) ^a	1.32 (0.02) ^a
B-NB	62.38 (7.00) ^b	24.59 (0.87) ^a	1.19 (0.02) ^b

* mean (±sd): different letters -p<0.01 (in column)

The NB diet enhanced final body weight without changing significantly the food intake. The lowest body density value was obtained for the NB diet group (group B), suggesting an increase in fatty mass.

Plasma L-lactic acid, cholesterol, protein and selenium values are given in Table 3.

The NB diet caused an increase in plasma L-lactic acid and cholesterol.

TABLE 3
PLASMATIC L-LACTIC ACID, SELENIUM, PROTEIN
AND CHOLESTEROL OF ANIMALS FED THE
CONTROL AND NITRITE + BACON DIETS.

Group	L-Lactic Acid ⁺ (mmol/l)	Selenium ⁺ (umol/l)	Protein ⁺⁺ (g/dl)	Cholesterol ⁺⁺ (mg/dl)
A-control	0.43(0.02) ^{a*}	1.14 (0.01) ^a	80.3 (4.59) ^a	297.14 (28.86) ^a
B-NB	1.11 (0.02) ^b	0.30 (0.01) ^a	69.6 (4.59) ^b	342.85 (32.31) ^b

* mean ± sd: different letters -p<0.01 (in column)

+ n=6-1 ml blood of two animals selected by draw, mixed- Three mixtures were measured, representing 6 animals/group, in three «pools» (in order to economize reagents)

++n=9 -determined in 9 animals/group

DISCUSSION

The addition of nitrite, bacon and proline to the diet was studied because nitrite has been suggested to form N-nitroso compounds in the organism which are components that probably lead to increased levels of free radicals of peroxidations. Selenium is a component of the structure of glutathione peroxidase (GSHPx)(14) and is therefore essential as a metal cofactor for the activity of the antioxidation enzyme. The scavenger effect of GSHPx probably occurs when the peroxides enter the cell cytosol by reducing the fatty acid hydroperoxides(15). The addition of nitrite to the diet containing fried bacon and proline increased total body weight and probably also fat mass. Considering that the composition of the diets were not sufficiently different to explain the changes in the body weight variations, these were probably due to the different metabolic pathways.

Diet B led to increased plasma L-lactic acid, a reduction of total plasma protein, and increase in total plasma cholesterol as well as a reduction in plasma selenium. Heim et al (16) reported an increase in L-lactate levels from 0.63 ± 0.14 to 1.31 ± 0.1 mmol/l in tumor patients due to a blockade of metabolism at the pyruvate-lactate level.

We suggest that the NB diet provoked impaired carbohydrate metabolism, with a consequent increase in L-lactic acid even with enhancement of the body weight.

By our previous results the diet content of selenium from 0,04 up to 0,105 mcg Se/Kg is adequate for weanling rats (17). These results suggest that the presence of nitrite-bacon led to an increase in selenium utilization perhaps due to the different fatty components of the diet, or because that more selenium may have been necessary for the scavenger action at the cell level, perhaps against peroxidation.

These data are difficult to interpret at the present time but deserve consideration. It appeared that when a diet containing nitrite fried bacon and proline is administered to rats the needs for selenium are enhanced.

This conclusion of this study is that the addition of nitrite, proline and fried bacon to the diet of rats impaired the l-lactic, protein, cholesterol and selenium plasmatic levels.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant N° 407-590187). FAPESP-Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Grant N° 84/01968) and FINEP-Financiadora de Estudos e Projetos (Grant N° 4.3.89.0268.00); Nestlé, Refinações de Milho Brasil Ltda.

REFERENCES

1. Reed PI., CI. Walters. The relationship between food nitrosamines and gastric cancer. In; Hunter JO. Alun Jones V.X. eds. Food and the Gut. London: Bailliere Tindall, 135-149, 1985.
2. Havery DC, T. Fazio. Human exposure to nitrosamines from foods. Food Technol. 39:80-83, 1985.
3. Vecchio A.J., J.H. Hotchiss, C.A. Bisogni. N-nitrosamine ingestion from consumer-cooked bacon. J. Food Sc. 51(3):754-756, 1986.
4. Wagner D.A., S.R. Tannenbaum. In vivo formation of N-nitroso compounds. Food Technol. 39:89, 1985.
5. De Angelis R.C. Bioavailability of nutrient-trace elements; research in Third World Countries. Dubrovnik: IVC, Course Pre-Congress: Tema-8, 1990.
6. De Angelis R.C., I.C.M. Terra, J.H. Scialfa. Prevention of nitrite effect by selenium and vitamin C in diet. In: International Symposium on Trace Elements Metabolism in Man and Animals (7: Dubrovnik: 1990) Trace elements in man and animals 7: Proceedings. p.100, 1990.
7. Hawker F.H., P.M. Stewart, P.J. Snitch. Effects of acute illness on selenium homeostasis Critical Care Medicine 18(4):442-446, 1990.
8. Commonwealth Bureau of Nutrition - Livestock feeds and feeding. Nutr. Abstr. Rev. 49:413-419, 1979.
9. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC Washington, DC: The Association, 1974.
10. Noll F. Determination of lactic acid In: Bergmeyer H.V. ed. Methods of enzymatic analysis 3. ed Weinheim: Deerfield Beach. Fla. v. 7 p. 982. 1983.
11. Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC. 14th ed. Washington, DC: The Association, 1984.
12. Allain C.A., L.S. Poon, C.S.G. Chan, P.C. Richmonds Fu. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem. 20:470, 1974.
13. Gornall A.B., Bardawill J.C., M.M. David. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, J. Biol. Chem. 177:751, 1949.
14. Rostrick J.T., A.L. Pope. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science: 179:588, 1973.
15. Duthie G.G., K.W. Wable, P.T. Jamess. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. Nutr. Res. Rev. 2:51-52, 1989.
16. Heim M.E., E. Holm, J.P. Striebel, J. Blatter. Plasma levels of aminoacids and carbohydrate metabolites in patients with malignant tumors, In: Howard A. MC Lean Baird I. ed Recent advances in clinical nutrition. London: John Libbey. 185-187, 1981.
17. De Angelis R.C., I.C.M. Terra, M.L. Ctenas, J.H. Scialfa, I. Klemps Filho. Bioavailability of selenium. Choice of a simple parameter. In: Trace Elements in Man and Animals. Ed. Anke M. Meissner D., Mills C.F. Verlag Media Touristik. TEMA-8:396-397, 1993.

Recibido: 03-04-1994

Aceptado: 05-12-1994

Comparación de metodologías para la detección y enumeración de bacterias ácido lácticas en el yogurt

Ana Graciela Briceño¹ y Raúl Martínez²

Dpto. Procesos Biológicos y Bioquímicos U.S.B. Inst. Ciencias y Tecnología de Alimentos U.C.V.

RESUMEN. La presencia de las bacterias lácticas del yogurt, activas y viables, en número no menor de 10^6 ufc/g de producto, es una condición establecida en las normas vigentes nacionales e internacionales. La viabilidad y la actividad de la flora láctica hasta el final de la vida útil del yogurt se ve influenciada por varios factores, lo que incide en la enumeración y detección de esta microflora. Para este estudio se seleccionaron los medios de cultivo MRS y agar LEE para el recuento total de bacterias lácticas; el M17 para el *S-salivarius* ssp *thermophilus* y el RCA para *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus*. Se utilizaron diferentes metodologías para la detección y enumeración de esta flora que incluyó siembra directa a partir de diluciones seriadas; tratamiento térmico selectivo y un período de recuperación de las células en caldo Trypticase de Soya. Los recuentos se efectuaron desde el inicio del proceso de fermentación (0 y 3 horas) y durante el almacenamiento del producto (4, 12 y 21 días). Los resultados mostraron excelente recuperación de la flora láctica en los medios y técnicas evaluadas. En el RCA, los recuentos fueron significativamente inferiores, el agar LEE mostró una significativa mejor recuperación. El tratamiento térmico previo a la siembra, ejerció un efecto negativo reversible, mayor sobre los lactobacilos que sobre los estreptococos. La técnica de recuperación mostró su efecto en las muestras de yogurt durante el almacenamiento. Se realizaron determinaciones de pH y acidez durante el proceso de elaboración y durante el almacenamiento del producto. Se observó que a mayor tiempo de almacenamiento mayor disminución de pH, como consecuencia de la producción de ácido láctico, lo que se corresponde con la actividad de la flora láctica presente.

SUMMARY. Comparison of methodologies for the detection and enumeration of lactic acid bacteria in yogurt. It is generally agreed that the population of lactic acid bacteria in yogurt must be not less than 10^6 ufc/g. Viability of the lactic flora until the end of shelf-life is affected for many factors, which has incidence in the recuperability of this microflora. MRS and LEE agar were selected for the total count of lactic bacteria, the M17 was used for the *S salivarius* ssp *thermophilus* and the RCA for *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus*. Different methodologies were used for detection and enumeration of this bacteria: direct plate count; thermal treatment and recuperation of the injured cells in Soy Trypticase broth. The enumeration was done at time zero and 3 hours after the start of the fermentative process and during storage at 4, 12 and 21 days. The results shown an excellent recuperability of the lactic flora in the selected media and methods that were used; however the enumeration was significantly lower in the RCA agar. The counts in the LEE agar shown a better recuperability. The thermal treatment affected negatively the counts of lactic flora and the repair method shown better results in the yogurt sample during storage. pH and acidity were determined at the beginning and during the storage period. It was observed a pH decrease because of the lactic acid production at the end of shelf-life.

INTRODUCCION

Microbiológicamente el yogurt se puede definir como el producto final de una fermentación controlada de leche

completa o descremada con alto contenido de sólidos y con una mezcla simbiótica de *Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* (1), anteriormente denominados *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, respectivamente.

Actualmente, el yogurt es considerado un alimento probiótico ya que es elaborado con microorganismos vivos que tienen un efecto beneficioso en el huésped, por mejorar el balance microbiano intestinal (2). La condición de viabilidad en el tracto intestinal es una de las características deseadas

1 Profesor agregado. Departamento Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Universidad Simón Bolívar.
2. Profesor agregado. Instituto Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

para que ciertos microorganismos sean incluidos en la elaboración de alimentos probióticos(3).

La norma venezolana COVENIN (2393-86) establece que las bacterias lácticas del yogurt deben permanecer viables y estar presentes cada una en cantidad no menor a 10^6 ufc/g de producto, a partir del cuarto día de fabricación, hasta la fecha de su vencimiento, aproximadamente 21 días a 5°C. En la elaboración de yogurt es de considerable importancia mantener un balance adecuado de la flora simbiótica, estreptococcus y lactobacilos, lo cual es determinante en la calidad del producto final.

Se ha establecido que la proporción 1:1 es suficiente para garantizar un producto con «flavor» y textura deseada (4). La calidad del yogurt se debe en parte a la actividad de las bacterias lácticas, cuyo recuento en producto fresco debe ser entre 10^8 - 10^9 ufc/g de producto, pero por efecto de la acidez progresiva, desarrollada durante el almacenamiento, puede ocurrir una reducción de la población, atribuida al «stress» o daño subletal, ocasionado por el ácido láctico a la célula bacteriana (5), la cual puede quedar incapacitada para desarrollarse en los medios de cultivo normalmente usados para el recuento, por lo que se haría necesario incluir una etapa de recuperación en la metodología de enumeración de las bacterias lácticas.

En Venezuela, en los últimos años, se ha observado para algunas marcas comerciales, fluctuaciones significativas de la población de la flora láctica, que en algunos casos está por debajo del criterio establecido en la normativa venezolana (datos sin publicar). En un intento por relacionar esta problemática nacional y la metodología oficial, surge el presente estudio, cuyo objetivo fue evaluar diferentes metodologías y medios de cultivo para la detección y enumeración de las bacterias ácido lácticas del yogurt, en diferentes etapas, desde el proceso de fermentación, hasta el final de la vida útil del producto, almacenado a 5°C.

MATERIALES Y METODOS

Muestras: Se utilizaron un total de 90 muestras comerciales de yogurt firme natural, obtenidas en planta en tres lotes diferentes de producción. En cada lote se seleccionaron seis unidades de 125 gramos para cada uno de los diferentes tiempos de muestreo, 0 y 3 horas del proceso de fermentación y a los 4, 12 y 21 días de almacenamiento a 5°C del producto terminado. Las muestras de yogurt de cada lote de producción fueron elaboradas con el cultivo madre (CM) recién preparado, evaluado en los laboratorios de la planta fabricante, al igual que las muestras correspondientes a las fases iniciales de elaboración del producto; mientras que el estudio del almacenamiento de las muestras de yogurt (4, 12 y 21 días a 5°C) se realizó en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Central de Venezuela.

Preparación de las muestras: Las muestras de yogurt seleccionadas según el plan de muestreo (0 y 3 horas y 4, 12 y 21 días de almacenamiento) se sometieron a las siguientes condiciones: Sin tratamiento térmico, con tratamiento térmico y tratamiento térmico más un período de recuperación. Con las muestras sin tratamiento térmico se prepararon diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1% y se procedió a realizar la siembra en placas de petri. Para las muestras con tratamiento térmico, se preparó la primera dilución en Caldo Trypticase de Soya y se colocó en baño de María a 60°C por 15 minutos y luego se continuó con la preparación de diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1%. Para el caso del tratamiento térmico más recuperación, la primera dilución de la muestra, además del calentamiento indicado (60°C por 15 minutos) se sometió a un período de recuperación de una hora a temperatura ambiente y luego se continuó con la preparación de diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1% y la siembra en placas de petri.

Medios de cultivo: Se utilizaron los medios: De Man Rogosa Sharp (MRS); el agar diferencial LEE; el agar reforzado para clostridios (ARC) pH: 5,5 y el medio M17 con B-glicerofosfato, pH:6,8.

Enumeración de Bacterias Lácticas

Para el recuento total de las Bacterias Acido Lácticas (BAL), Estreptococos y Lactobacilos, se utilizó el agar MRS, en el cual crecen ambos microorganismos sin diferencias apreciables y el medio diferencial Agar LEE que permite la identificación de la flora láctica por cambios de color, las colonias amarillas, se identifican como *S. salivarius* ssp *thermophilus* y las blancas como *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*.

Para el recuento de los estreptococos se utilizó el agar M17 con Beta-glicerofosfato y para los lactobacilos, el ARC. En ambos casos se utilizó la técnica de siembra en profundidad. La misma técnica se empleó con el MRS y para el agar LEE, se utilizó la técnica de siembra en superficie.

Las placas de agar LEE; MRS y ARC se incubaron a 37°C por 48,72 y 96 horas, respectivamente, en condiciones de anaerobiosis, utilizando la técnica GasPak. Las placas de M17 se incubaron en aerobiosis por 48 horas. En todos los casos se verificó la morfología de la flora láctica mediante la coloración Gram.

Análisis Físico Químico

Se realizaron mediciones de pH y acidez, expresada como porcentaje de ácido láctico, tanto al cultivo madre recién preparado como a las 0 y 3 horas del proceso de fermentación y a los 4, 12 y 21 días de almacenamiento del yogurt. El pH se registró con un potenciómetro, calibrado con buffer pH: 4,0 y 7,0 y el porcentaje de ácido láctico se determinó mediante titulación de 10 gramos de muestra con NaOH 0,1 N y fenolftaleína como indicador.

Tratamiento Estadístico:

Los resultados obtenidos de las réplicas de los tres lotes de producción, se procesaron mediante el Análisis de Varianza Multifactorial y el análisis de rango por diferencia mínima significativa (Stat Graphic V. 6,0). Los resultados microbiológicos son reportados en términos de la media logarítmica del número de unidades formadoras de colonias por gramo de producto (\bar{X} log ufc/g).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de la evaluación del CM al momento de la elaboración del yogurt, fueron : pH de 4,2; acidez titulable de 0,90% de ácido láctico y la población de la flora láctica entre $5-10 \times 10^8$ ufc/g, a las tres horas de incubación, lo que refleja óptimas condiciones del cultivo madre, por cuanto su actividad medida en términos de pH y acidez y del número de bacterias viables obtenidas, se corresponden con los valores sugeridos por el fabricante del cultivo láctico liofilizado (CHR, Hansen's. Dairy Cultures) y con los criterios internos establecidos en la planta fabricante. Con estos resultados se puede asumir que el presente estudio se desarrolló sobre las bases de un producto elaborado bajo un proceso representativo y controlado, lo que garantiza la presencia de la flora láctica viable sujeta a ser evaluada y cuantificada.

En la Tabla 1 se muestran los resultados del Recuento total de las BAL en agar LEE y MRS; en las Tablas 2 y 3 se presentan los resultados correspondientes a los recuentos de *S. salivarius* spp *thermophilus* y *L. delbrueckii* spp *bulgaricus*, respectivamente.

TABLA 1

RECuento TOTAL DE LAS BACTERIAS ACIDO LACTICAS (\bar{X} LOG UFC/G) EN EL YOGURT DURANTE LA FERMENTACION Y EL ALMACENAMIENTO A 5 °C UTILIZANDO DOS MEDIOS DE CULTIVO Y DIFERENTES TRATAMIENTOS EN LAS MUESTRAS

Medios/ Tratamientos	TIEMPO				
	Fermentación		Almacenamiento		
	0 hr	3 hr	4 días	12 días	21 días
LEE					
Sin T.T.	6,7	10,5	10,5	9,7	8,7
Con T.T.	6,8	9,5	10,5	7,9	7,5
Con T.T. y T.R.	6,9	10,5	10,5	8,7	8,6
MRS					
Sin T.T.	6,1	7,5	8,8	8,7	7,5
Con T.T.	5,8	7,5	8,1	8,2	7,0
Con T.T. y T.R.	6,5	7,6	8,5	8,5	7,0

T.T.= Tratamiento Térmico (60 °C por 15 min.)

T.R.= Tratamiento de Recuperación (1 hr. en CTS a temperatura ambiente)

TABLA 2
RECuento TOTAL DE *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* SSP. *THERMOPHILUS* (\bar{X} LOG UFC/G) EN EL YOGURT DURANTE LA FERMENTACION Y EL ALMACENAMIENTO A 5 °C UTILIZANDO DOS MEDIOS DE CULTIVO Y DIFERENTES TRATAMIENTOS EN LAS MUESTRAS

Medios/ Tratamientos	TIEMPO				
	Fermentación		Almacenamiento		
	0 hr	3 hr	4 días	12 días	21 días
LEE					
Sin T.T.	6,6	10,5	10,5	9,3	7,7
Con T.T.	6,7	9,4	10,5	7,5	6,5
Con T.T. y T.R.	6,5	10,5	10,5	7,9	7,5
M17					
Sin T.T.	6,6	7,8	8,3	8,2	8,4
Con T.T.	6,7	7,7	8,6	8,1	8,0
Con T.T. y T.R.	7,0	8,3	8,6	8,2	8,3

T.T.= Tratamiento Térmico (60 °C por 15 min.)

T.R.= Tratamiento de Recuperación (1 hr. en CTS a temperatura ambiente)

TABLA 3

RECuento TOTAL DE *LACTOBACILLUS DELBRUECKII* SSP. *BULGARICUS* (\bar{X} LOG UFC/G) EN EL YOGURT DURANTE LA FERMENTACION Y EL ALMACENAMIENTO A 5 °C UTILIZANDO DOS MEDIOS DE CULTIVO Y DIFERENTES TRATAMIENTOS EN LAS MUESTRAS

Medios/ Tratamientos	TIEMPO				
	Fermentación		Almacenamiento		
	0 hr	3 hr	4 días	12 días	21 días
LEE					
Sin T.T.	6,5	10,5	10,5	9,6	8,6
Con T.T.	6,3	9,3	10,5	7,9	7,5
Con T.T. y T.R.	6,9	10,5	10,5	8,6	8,4
ARC					
Sin T.T.	5,3	7,9	7,1	7,5	7,1
Con T.T.	5,0	7,8	7,0	6,5	5,0
Con T.T. y T.R.	5,6	7,1	7,6	7,7	7,2

T.T.= Tratamiento Térmico (60 °C por 15 min.)

T.R.= Tratamiento de Recuperación (1 hr. en CTS a temperatura ambiente)

Al observar los recuentos obtenidos en el Agar LEE y MRS (Tabla 1), se nota que en ambos casos la población láctica se mantuvo viable durante 21 días de almacenamiento refrigerado y en número mayor a 10^6 ufc/g de producto, valor establecido en la Norma venezolana COVENIN (6). Del tratamiento estadístico de estos resultados se desprende que hubo una recuperación significativamente mayor ($p < 0,005$) en agar LEE que en MRS. Sin embargo, en ambos medios se observa una reducción de la población después del 4° día de almacenamiento a 5 °C, siendo ésta más acentuada en el agar LEE.

Con respecto al recuento del *S. salivarius* ssp *thermophilus*, en agar LEE y M17 (Tabla 2), se aprecia que a los 4 y 12 días de almacenamiento de las muestras de yogurt, hay mejor recuperación en agar LEE; mientras que a los 21 días de almacenamiento, se obtienen mejores recuentos en M17. Aún cuando el tratamiento estadístico no reflejó diferencias significativas ($p > 0,005$) de los recuentos en ambos medios, el M17 resultó más efectivo para la recuperación de los estreptococos, al final del almacenamiento.

En cuanto a los valores obtenidos para el recuento de *L. delbrueckii* ssp *bulgaricus* (Tabla 3) se puede apreciar mejor recuperación en el Agar LEE durante el almacenamiento; mientras que en ARC la población se mantuvo con valores bajos durante el proceso de fermentación y el almacenamiento del yogurt a 5 °C. Estos resultados fueron significativamente diferentes ($p < 0,005$), lo que denota la poca efectividad del ARC en la recuperación de este grupo de microorganismos, ya que se espera que los lactobacilos estén viables y en número mayor que los estreptococos, al final del almacenamiento, por su condición de ser más ácido tolerante que los estreptococos (7).

Aún cuando el agar LEE no mostró mejor recuperación para los estreptococos al final del almacenamiento, pero si para los lactobacilos, los resultados reflejan la efectividad del medio para el recuento total de bacterias lácticas. Es de hacer notar que al final del almacenamiento se presenta una condición de sobreacidificación del producto, a la cual son sensibles los estreptococos y por consiguiente más difícil su detección (8).

El recuento en agar LEE se basa en la enumeración diferencial de los estreptococos y los lactobacilos, considerando la capacidad fermentativa de ambos microorganismos, ya que los estreptococos fermentan lactosa y los lactobacilos no utilizan la sacarosa, por lo que la preparación del medio incluye una adecuada combinación de ambos azúcares (9).

La mayor recuperación de las bacterias ácido lácticas en el agar LEE puede atribuirse, a la presencia de los dos azúcares, lactosa y sacarosa, así como a la concentración final de los mismos, lo que ejerce un efecto estimulante en el crecimiento de los estreptococos y lactobacilos (10). Además la presencia de carbonato de calcio en el medio inhibe la difusión del ácido, lo cual contribuye a la mayor recuperación de estos microorganismos cuando están presentes en poblaciones mixtas (9).

El agar M17 contiene sólo lactosa y en menor proporción, pero en su preparación se incluye B-glicerofosfato, el cual es

un potente buffer, lo que le confiere al medio mayor recuperabilidad de los estreptococos en condición de sobreacidificación (11).

Los resultados estadísticos indican que no hubo efecto significativo ($p > 0,005$) de los tratamientos aplicados a las muestras sobre la viabilidad de la flora láctica presente en el yogurt. Sin embargo se aprecia de los datos (Tablas 1, 2 y 3) que el tratamiento térmico a 60 °C por 15 minutos, al final del almacenamiento, afecta negativamente el recuento de la flora láctica, específicamente a los lactobacilos, el cual alcanza poblaciones por debajo de 10^6 ufc/g; mientras que los estreptococos se ven menos afectados con este tratamiento. El efecto del tratamiento térmico podría atribuirse a la combinación de dos factores de daño a la célula bacteriana, la acidez y el calor aplicado.

Resultados similares reporta Torres (12) en un estudio en muestras de yogurt con piña, en los que se observa que en las muestras sometidas a 60 °C por 30 minutos, después de 10 y 20 días de almacenamiento, hubo reducción importante de la población láctica.

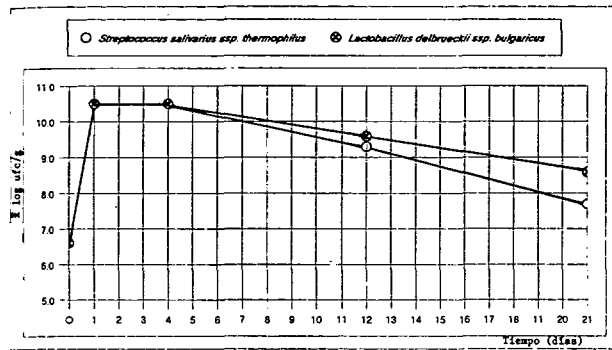
El tratamiento térmico es una condición establecida en la Norma venezolana COVENIN (6) con carácter de recomendación para la enumeración de las BAL del yogurt; lo cual no debería afectar la viabilidad de la flora láctica, por cuanto estos microorganismos son termófilos, pero a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, las células microbianas sufren daños subletales, como consecuencia de la refrigeración sostenida, la progresiva acidificación del sustrato, entre otras, lo que contribuye a reducir la población de estas bacterias. Por esta razón se incluyó la etapa de recuperación después del tratamiento térmico.

Del análisis de estos resultados se sugiere la aplicación del tratamiento térmico como procedimiento opcional en el caso de sospechar presencia de flora acompañante indeseable, además de considerar el período de recuperación de la flora láctica.

En cuanto a efecto del tiempo de almacenamiento sobre los recuentos de la flora láctica se puede asumir de acuerdo a los resultados estadísticos que hubo un efecto significativo ($p < 0,005$) del tiempo de almacenamiento del yogurt sobre la viabilidad y recuperación de los microorganismos evaluados. Se observa de los resultados (Tablas 1, 2 y 3) que al final del proceso de fermentación (3 horas), los recuentos de la flora láctica en el agar LEE están en el rango de 10^9 a 10^{10} ufc/g, alcanzando valores superiores a 10^{10} ufc/g al 4° día de almacenamiento del producto, a partir de este momento se inicia la reducción de la población, la cual decae en 2 a 3 ciclos logarítmicos, al final del almacenamiento. La reducción más drástica se observa para los estreptococos, lo cual es de esperarse en muestras con más de 10 días de almacenamiento, ya que en este período ocurre un mayor descenso de pH que inhibe el crecimiento de estas bacterias.

La dinámica de crecimiento de la flora láctica (recuento en agar LEE) se muestra en la Figura 1, en donde se corrobora lo expuesto en el párrafo anterior.

FIGURA 1



Las variaciones de pH y acidez en el proceso de fermentación y durante el almacenamiento del yogurt, se presentan en la Tabla 4. Se observa un aumento progresivo de la concentración de ácido láctico, desde 0,1% hasta 1,19%. El valor de pH se mantuvo en el rango de 4,2 a 3,8 a partir del 4° día de fabricación, lo que confirma lo reportado por otros autores para muestras comerciales de yogurt (13). Estos valores podrían correlacionarse con los recuentos obtenidos para estreptococos y lactobacilos, los primeros dominan el proceso inicial de fermentación y los segundos, más ácido tolerantes, son favorecidos a valores de pH por debajo de 5,5.

TABLA 4
VALORES DE ACIDEZ Y pH DEL YOGURT
DURANTE LA FERMENTACION Y EL
ALMACENAMIENTO 5 °C

Tiempo	Acidez (% ácido láctico)	pH
0 hr	0,17	6,5
3 hr	0,34	5,5
4 días	0,62	4,2
12 días	1,11	4,0
21 días	1,19	3,8

Esta condición se refleja siempre y cuando se mantenga un adecuado balance de cocos: bacilos, el cual según reporta Tamine y col. (14) debe ser 1:1.

Algunos autores (15) reportan que ciertas combinaciones de coco: bacilos pueden ser inhibitorias, estimuladoras o neutras con relación a la velocidad de producción de ácido láctico, lo que puede traer como consecuencia yogurt rancio y sin aroma, en caso de dominar los estreptococos o una sobreacidificación, si dominan los lactobacilos.

Cabe señalar, según resultados de este estudio, que independientemente de los medios de cultivo utilizados, de los tratamientos aplicados y del tiempo de almacenamiento, la población de las BAL se mantiene en el número establecido (10^6 ufc/g), a partir del 4° día de almacenamiento, lo cual

sugiere que la no detección de estas bacterias en muestras comerciales, obedece a problemas de otra naturaleza, lo que justifica posteriores investigaciones para determinar las posibles causas que afectan la viabilidad y actividad de la flora láctica del yogurt, considerando entre éstas, las condiciones de manejo del cultivo liofilizado. Las Bacterias Acido Lácticas deben mantenerse viables y activas para ejercer su acción probiótica, nutritiva y terapéutica.

CONCLUSIONES

1. El agar LEE fue el más apropiado para la detección y enumeración de los estreptococos, lactobacilos y en general de las bacterias ácido lácticas en el yogurt.
2. En condiciones de sobreacidificación (final del almacenamiento del yogurt) el M17 fue el más efectivo en la enumeración de los estreptococos.
3. El tratamiento térmico aplicado a las muestras de yogurt afectó negativamente el recuento de la población láctica, específicamente los lactobacilos, al final del almacenamiento.
4. El tratamiento de recuperación aplicado fue efectivo en restablecer la flora láctica, después del tratamiento térmico.
5. La población láctica disminuyó durante el período de almacenamiento, siendo más evidente la disminución de los estreptococos, relacionándose con la progresiva acidificación y reducción de pH en el producto.

REFERENCIAS

1. Vedamuthu E. Fermented Milks. En: Economic Microbiology. Rose E.H. (E.d). Bath, Inglaterra. 7:214-217. 1982.
2. Fuller R. Probiotics in man and animals. A Review. J Appl Bacteriol 66: 365. 1989.
3. Gilliland S.E. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans. Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. J Food Prot 42: 164. 1979.
4. Driessen R.M., F. Kningma and J. Stadhouders. Evidence that *L. bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *S. thermophilus*. Netherlands Milk Dairy Journal 36: 135-144. 1982.
5. Ray B. Impact of Bacterial injury and repair in food Microbiology. It's past, present and future. J. Food Prot 49: 651-655. 1986.
6. COVENIN Norma 2393. Yogurt. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma, Caracas. 1986.
7. Moon J.N., C.A. Hamann and G.W. Reinbold. Recovery of *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* on nine commonly used agar media. Appl. Microb. 28:1076. 1974.
8. Lyn-Radke M. and W. Sandine. Associative growth and differential enumeration of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. J Food Prot 47: 245-248. 1984.
9. Lee S.Y., E.R. Vedamuthy y C.J. Washman. An agar medium for the differential enumeration of Yogurt stater bacteria. J. Milk Food Techn 37:272-276. 1974.
10. Sinha R.P. Effect of carbohydrate on the viability of

- Streptococcus thermophilus*. J Food Prot 54:537-541. 1991.
11. Shankar A. y L.A. Davies, Note on the suppression of *L. bulgaricus* in media containing β -glicerophosphate and application of such media selective isolation of *S. thermophilus* from yogurt. J Soc of Dairy Tech 30:28. 1977.
 12. Torres A. Recuperabilidad de bacterias lácticas viables en yogurt con frutas en diferentes medios de cultivo. Trabajo Especial de Grado. USB. 1989.
 13. Vedamuthu E. The Yogurt story. Past, present and future. Part VI. Dairy, Food and Environmental Sanitation 11: 513-514. 1991.
 14. Tamine A. y H. Deeth. Yogurt: Technology and biochemistry. J Food Prot. 43:939-977. 1980.
 15. Moon J. and G.W. Reinbold, citado por Tamine A. and H.A. Deeth. Yogurt: Technology and biochemistry. J Food Prot. 43: 939-947. 1980.

Recibido: 01-12-1994

Aceptado: 31-07-1995

Residuos de antibióticos en leche pasteurizada distribuida en servicios de nutrición hospitalarios de Costa Rica

Rafael Monge¹, Magaly Caballero², y Rita Coghi³

RESUMEN. Se evaluó la presencia de residuos de antibióticos en 200 muestras de leche pasteurizada recolectadas en diez hospitales costarricenses. La detección de antibióticos se efectuó mediante las pruebas de inhibición del crecimiento del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (Delvo test P[®]) y del *Streptococcus thermophilus* (T-101); (Valiotest 101[®]). Los resultados señalan que el 13% (N=200) de las muestras presentaron residuos de antibióticos; no obstante, los porcentajes de positividad de las muestras variaron significativamente entre los hospitales evaluados, oscilando entre cero y 35% (N=20). El mayor número de muestras positivas correspondió a las industrias lácteas que suministran el 70% de la leche requerida en los centros hospitalarios incluidos en el estudio.

SUMMARY. Presence of antibiotic residues in pasteurized milk distributed to hospital's nutrition services in Costa Rica. Two hundred samples of pasteurized milk collected from nutrition services of ten hospitals in Costa Rica, were evaluated for the presence of antibiotics residues. Bacterial inhibitory growth test were used to detect inhibitory substances. It was found that 13% (N=200) of the samples were contaminated, with variations from 0% to 35% (N=20) in the different hospitals tested. The larger number of positive samples corresponds to lactic industries that supply 70% of the hospital's requirements of pasteurized milk.

INTRODUCCION

El uso de los agentes antimicrobianos, especialmente los Beta-lactámicos y las sulfonamidas, han facilitado la intensificación de la producción lechera, debido a la reducción de las pérdidas ocasionadas principalmente por las enfermedades infecciosas de la glándula mamaria (1,2).

Los antibióticos al ser aplicados en el animal se distribuyen y absorben. Posteriormente se eliminan por la orina y la leche, durante un período que varía dependiendo del tipo de antibiótico, vehículo presente, uso simultáneo de varios antibióticos, período de lactancia, estado de la glándula mamaria, duración del tratamiento, dosis utilizada y ruta de administración (3-6). El período de retiro, es decir el tiempo en que la leche procedente de vacas tratadas no debe destinarse para consumo humano o elaboración de subproductos lácteos,

puede variar entre 72 horas y cinco días (5,7); no obstante dadas las reducciones económicas que se generan al descartar la leche por esos períodos, muchos ganaderos optan por reducirlos con la consecuente comercialización de leche contaminada con antibióticos. Asimismo, otras prácticas como la mezcla de leche de animales sanos con la de vaca tratadas y el inicio del ordeño mecánico con el ganado bajo tratamiento, favorece la presencia de los agentes antimicrobianos en la leche (6). El consumo diario de leche contaminada con antibióticos puede generar o desencadenar asma, urticarias, alteraciones en la flora intestinal, resistencia bacteriana, sensibilización, nefrotoxicidad o reacciones de hipersensibilidad entre otros efectos adversos (2,8-12).

Dado lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la presencia de antibióticos en la leche pasteurizada distribuida en los centros de nutrición hospitalarios.

MATERIALES Y METODOS

Durante el período comprendido entre febrero y setiembre de 1993, se evaluó la presencia de antibióticos en 200 muestras de leche pasteurizada distribuida en los servicios de nutrición de diez hospitales costarricenses, seleccionados con probabilidad proporcional al tamaño.

1 Nutricionista, Departamento de Control de Alimentos, Ministerio de Salud, Costa Rica.
2 Bacterióloga, Laboratorio de Bacteriología, PIET, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.
3 Veterinario, Práctica Privada.

Durante el transcurso de los siete meses de estudio, se recolectaron 20 muestras de leche en cada nosocomio, asegurándose la evaluación de diferentes lotes de producción. Las muestras fueron transportadas en frío, en un período menor a las 6 horas, hasta el laboratorio donde se realizó el estudio. La detección de los residuos de antibióticos se realizó mediante las pruebas comerciales Delvotest P® y Valiotest 101®.

La prueba Delvotest P® utilizada como tamizaje, se basa en la inhibición del crecimiento del *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* (ATCC-10149). Para realizar esta prueba se colocaron 100 ul de leche y una tableta nutritiva en una ampolla, conteniendo esporas estabilizadas del microorganismo, agar y púrpura de bromocresol como indicador del pH. Una vez realizado este procedimiento, las ampollas se colocaron en «baño-María» a 64 °C (± 0.1 °C) por 2,45 horas. Transcurrido este tiempo se observó el color del medio de cultivo: amarillo, indicó la ausencia de cualquier antibiótico o sulfamida, mientras que púrpura la presencia de estos. La coloración amarillo/púrpura se consideró resultado dudoso.

En todas las muestras positivas así como, aquellas dudosas se confirmó la presencia de residuos de antibióticos utilizando la prueba comercial Valiotest 101®. Esta prueba, que utiliza esporas de *Streptococcus thermophilus* (T-101), se basa en la conversión del cloruro de trifiniltetrazolium en formazone, un indicador pH dependiente.

Para la ejecución de la misma, se adicionaron 200 ul de leche a una celda conteniendo esporas de *S. thermophilus* en un medio de cultivo con un indicador de pH. Las celdas se incubaron por 4.30 horas a 42 °C. Al leer la prueba el color amarillo indicó que la muestra contenía residuos de antibióticos y el color rosado la ausencia de estos.

El resultado positivo, según la prueba Delvotest®, revela la presencia de penicilina G en niveles que oscilan entre 0,003-0,005 UI/ml. Con la prueba Valiotest®, el resultado positivo refiere niveles, para ese mismo antibiótico, entre 0.004-0.006 UI/ml. Aunque ambas pruebas son específicamente sensibles a los residuos de penicilina, ciertas concentraciones de otros antibióticos determinan un resultado positivo. En la Tabla 1 se muestran los límites de sensibilidad de ambas pruebas, a diversos antibióticos que son empleados en el tratamiento de la mastitis.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tradicionalmente se ha considerado que la leche pasteurizada no representa ningún riesgo para la salud pública. No obstante; nuestros resultados sugieren que esto no es del todo cierto, pues en el 13% (N=200) de las muestras evaluadas se determinó la presencia de residuos de antibióticos; evidenciándose que los porcentajes de positividad oscilaron entre cero y 35% (N=20) en los diferentes centros hospitalarios. (Tabla 2).

TABLA 1
SENSIBILIDAD DE LOS METODOS DELVOTEST-P
Y VALIOTEST-101 T PARA DIFERENTES
ANTIBIOTICOS USADOS EN EL TRATAMIENTO
DE MASTITIS CLINICA

Antibiótico U.I./ml	Delvotest-P	Valiotest 101 T
Penicilina G	0,003-0,005	0,004-0,006
Ampicilina	0,01	0,01
Amoxicilina	DND	0,03-0,05
Cloxacilina	0,05	0,01-0,15
Cefalexina	DND	0,05-0,10
Estreptomocina	3,7-5,0	1,0-1,5
Dihidroestreptomocina	2,5-5,0	0,3-0,5
Eritromicina	0,5-1,0	0,05-1,0
Neomicina	1,0	0,3-0,5
Gentamicina	DND	0,5
Cloramfenicol	10,0	0,5-1,0
Tetraciclina	0,2-0,3	0,2-0,3
Oxitetraciclina	0,2	0,15-0,20

DND: Dato no disponible

Fuente: Coghi R. Residuos de antibióticos en leche bovina pasteurizada suministrada a Hospitales Nacionales y Regionales de Costa Rica. Tesis. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. 67p. 1993.

TABLA 2
PRESENCIA DE RESIDUOS DE ANTIBIOTICOS EN
LECHE PASTEURIZADA DISTRIBUIDA EN 10
HOSPITALES COSTARRICENSES, 1994

Hospital	Nº Muestras	Nº Muestras Positivas	% Positividad
A*	20	7	35,0
B*	20	6	30,0
C*	20	5	25,0
D*	20	1	5,0
E**	20	0	0
F***	20	7	35,0
G**	20	1	5,0
H**	20	0	0
I***	20	0	0
J***	20	0	0
Total	200	27	13

* Leche proveída por la Industria I

** Leche proveída por la Industria II

*** Leche proveída por la industria III

Diversos estudios señalan que la ebullición, pasteurizada y ultrapasteurización no reducen significativamente los niveles de antibióticos. La pasteurización disminuye solamente el 8% de los residuos de penicilina procaínica y la ebullición (90 °C) por 30 minutos el 20% (8,12). Así mismo, estos tratamientos térmicos no afectan los niveles de estreptomycin, neomicina, cloranfenicol y oxitetraciclina entre otros antibióticos usados en el tratamiento de la mastitis clínica (8, 12).

Por tales razones, el administrador de un Servicio de Nutrición, además de considerar el costo de la leche, debe asegurarse que el producto que se adquiere carece de residuos de antibióticos y no asumir que la leche pasteurizada no presenta tales contaminantes, pues debido a esta falacia, el mayor número de muestras contaminadas con antibióticos (26 muestras) correspondió a la leche suministrada por las industrias que proveen el 70% de la leche pasteurizada requerida en los centros nosocomiales incluidos en el estudio (Tabla 2).

Para garantizar la ausencia de antibióticos en la leche, se hace imprescindible que se especifique claramente en el cartel de licitación que el producto debe estar exento de esos agentes antimicrobianos. Además deben realizarse periódicamente pruebas para la detección de estos y rescindir el contrato si se incumple con lo establecido, pues debe considerarse que las regulaciones solo son eficientes cuando el interesado exige su cumplimiento.

REFERENCIAS

1. Beshop J., A. Boudine, G. O'Dell & J. Vansen. Quantitative assay for antibiotics used commonly in treatment of bovine infections. *J Dairy Sci* 68: 3031-3036, 1985.
2. Jones G & E. Seymour. Cowside antibiotics residue testing. *J Dairy Sci* 71:1691-1699, 1988.
3. Oliver S. Antibiotic residues in calostrum milk and meat of dairy cows following antibiotic therapy. 88th Annual Meeting of U.S. Animal Health Association. Fort Word, Texas. October 22, 1984.
4. Paulson G, V. Feil, J.Giddings & C. Lamoureux. Lactose conjugation of sulphonamide drugs in the lacting dairy cow. *Xenobiotico* 22:925-939, 1991.
5. Pepin G. Temps d'attente pour le lait après utilisation d'antibiotiques. *Rev Med Vet* 157:205-221, 1981.
6. Seymour G., G. Jones & M. Gillard. Persistence of residues in milk following antibiotic treatment of dairy cattle. *J Dairy Sci* 71:2292-2296. 1988.
7. Wright W. & C. Harold. Antibiotic residues in milk after parental and oral administration in cows. *J Am Vet Assoc* 179:523-533, 1960.
8. Vautier H. & C. Postigo. Mastitis bovina y residuos de antibióticos en leche: Riesgos para la Salud Pública. *Rev Mund Zootec* 60:111-113, 1986.
9. Milhaud G. & J. Person. Evaluation de la toxicité des résidus d'antibiotiques dans le lait. *Rec. Med Vet* 157:179-185, 1985.
10. Oliver S., J. Maki & H. Dowlen. Antibiotic residues in milk following antimicrobial therapy during lactation. *J Food Protec* 53:693-696, 1990.
11. Tancrede C. Antibiothérapie en médecine vétérinaire et risques pour la santé humaine. *Rec Med Vet* 159:591-594, 1983.
12. Aguilera C. Determinación de sustancias inhibitorias (antibióticos), durante el período de época seca en leche cruda que ingresa a Polac. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Guatemala, 1981.

Recibido: 01-12-1994

Aceptado: 04-07-1995

Caracterización bioquímica de las proteínas de jaiba mora (*Homalaspis plana*)

Lilian Abugoch J.¹, Abel Guarda M.¹, y Mario Chiong L.²

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
Universidad de Chile.

RESUMEN. La jaiba mora (*Homalaspis plana*) es un crustáceo que se da desde la costa de Guayaquil en Ecuador hasta la costa chilena incluyendo el Archipiélago de Juan Fernández. Este recurso es de importancia para Chile porque provee de trabajo a los pescadores artesanales. En Chile no existe diversificación de productos a partir de este crustáceo y ha sido escasamente estudiado desde un punto de vista científico, es por ello que se ha considerado necesario iniciar la investigación de este recurso con la caracterización bioquímica de sus proteínas para posteriormente desarrollar productos a partir de él. En este trabajo se determinó la actividad proteolítica en la carne de jaiba recién extraída y se realizó la caracterización electroforética de sus proteínas.

Respecto a la actividad enzimática, en la carne de pinzas y patas de jaiba recién extraída no se pudo detectar actividad proteolítica, bajo las diferentes condiciones de ensayo usadas en este trabajo.

La caracterización de proteínas se realizó mediante el uso de técnicas electroforéticas, en extracto de carne de pinzas y patas de jaiba, utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas y en presencia de SDS. Se diferenciaron electroforéticamente (PAGE-SDS) las proteínas miofibrilares de las sarcoplasmáticas, obteniendo diferentes perfiles electroforéticos de los extractos a dos fuerzas iónicas diferentes (0,05 y 0,5).

SUMMARY. Biochemical characterization of crab (*Homalaspis plana*) proteins. *Homalaspis plana* is a crab found in the Pacific Ocean coasts from Guayaquil (Ecuador) all the way down to the Strait of Magellan, including all of the Chilean coast. This crustacean is an important resource because it provides jobs for artisanal fishermen. In Chile there is no product diversification from this crab and it has been poorly studied from the scientific point of view. The biochemical characterization of its proteins was initiated to be able to develop several products from its meat. We report the proteolytic activity from freshly extracted crab meat and the electrophoretical characterization of its proteins.

No proteolytic activity was detected in freshly extracted crab meat, under any of the assay conditions used.

SDS Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and native PAGE were carried out with proteins extracted from crab meat. Using extraction solutions at two different ionic strength (0.05 and 0.5), myofibrillar and sarcoplasmic were separated, each showing different electrophoretical patterns in SDS-PAGE.

INTRODUCCION

En los diferentes países del mundo, se hace necesario lograr un uso racional de las proteínas, especialmente las de origen animal y asegurar un adecuado abastecimiento a la demanda industrial. Hoy no sólo son importantes las características físicas, químicas, bioquímicas de las proteínas, sino

que además las propiedades funcionales deben ser las adecuadas para satisfacer las exigencias de los distintos procesos industriales que dan origen a productos nutritivos, seguros y atractivos.

La importancia de las proteínas en la dieta del hombre, radica principalmente en su aspecto nutricional y las proteínas animales tienen un valor biológico superior que las proteínas de origen vegetal (1). La jaiba, especie de interés en este estudio, es un crustáceo cuya composición se destaca por el alto contenido proteico, alrededor de 16 % en base a la carne recién extraída, con un adecuado balance de aminoácidos esenciales y por contener un bajo porcentaje de grasa (2). La

1 Académicas del Dpto. de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Universidad de Chile.

2 Bioquímico

jaiba mora (*Homalaspis plana*) perteneciente a la familia *Xanthidae* se cuenta entre los recursos poco estudiados en Chile y actualmente se clasifica como recurso subexplotado en nuestro país (3,4). Es una de las especies más representativa en las capturas de la V Región de Chile. Este recurso se encuentran distribuido desde Guayaquil en Ecuador hasta el Estrecho de Magallanes e Isla Robinson Crusoe en Chile y desde la orilla de la playa hasta los 272 metros de profundidad (3). El Servicio Nacional de Pesca en 1992, registró un desembarque total artesanal de 3.616 Ton. de jaiba de las cuales 487 Ton. correspondían a jaiba mora (5). El recurso jaiba posee una gran importancia socio-económica, por ser extraído principalmente por el subsector artesanal, constituyendo una fuente de trabajo interesante para un gran número de personas (6).

Existen ciertas especies animales que aún no han sido muy estudiadas y merecen especial atención, como lo son los crustáceos y más especialmente la jaiba. Las formas actuales de procesamiento aplicado a la jaiba consisten básicamente en congelado o en conserva, siendo el congelado la principal forma de comercialización (7,8,9).

En la literatura existen pocos antecedentes acerca de las características y propiedades de las proteínas de estos crustáceos y mucho menos sobre su comportamiento con los diferentes procesos tecnológicos, por lo que constituyen un tema interesante para ser desarrollado. En base a todo lo planteado anteriormente se consideró en una primera etapa la caracterización bioquímica del recurso jaiba. Se ha desarrollado la caracterización bioquímica de la carne de jaiba recién extraída, determinando la actividad proteolítica y la caracterización de los perfiles electroforéticos de proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de carne de pinzas y patas de jaiba.

MATERIALES Y METODOS

Materia prima: Se trabajó con jaibas «mora» hembras y machos (*Homalaspis plana*), adquiridas en el Mercado Central de Santiago, provenientes de la V Región. Para este estudio fue necesario la adquisición de jaibas vivas, de peso entre 500 y 700g aproximadamente y ancho cefalotorácico entre 10 y 15 cm.

Extracción de la carne: La extracción de carne de jaiba se realizó manualmente en jaiba recién muertas, utilizando cuchillos, martillo y tijeras. Todo el proceso se realizó en frío manteniendo la carne recién extraída en hielo. Se extrajo carne de dos secciones anatómicas diferentes de la jaiba: pinzas y patas.

Caracterización bioquímica de la carne de jaiba recién extraída

Determinación de actividad proteolítica

Preparación de la muestra: la carne de jaiba (pinzas y patas

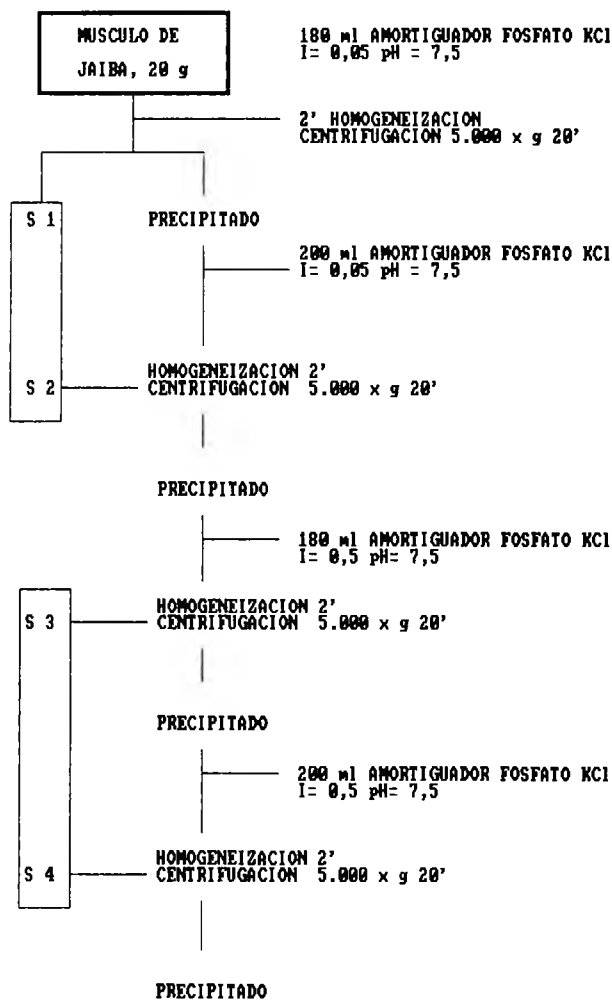
delanteras) recién extraída, se homogeneizó con un equipo tipo «waring blender» con volúmenes iguales de solución de NaCl 0,15 N a 13.000 rpm por 3 minutos. Luego se centrifugó a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, en el que se realizaron los ensayos enzimáticos que se describen a continuación.

Medición espectrofotométrica a 280 nm con seroalbúmina de bovino (BSA) como sustrato: La actividad proteolítica se determinó midiendo la absorbancia de los aminoácidos y/o péptidos liberados en el medio, a 280 nm. La incubación se realizó a 25 y 37 °C durante 10, 30, 60, 90, 120, 180 minutos, en el siguiente medio de ensayo: 0,25 ml de BSA al 1% (p/v), 0,2 ml de amortiguador 0,1 M (ver Tabla 1), 0,02 ml de muestra de concentración aproximada de proteínas de 8,9 mg/ml, 0,53 ml de agua destilada. La reacción se detuvo con 0,1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 100% (p/v). Posteriormente la mezcla se centrifugó por 3 minutos a 12.500 x g y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm (10).

TABLA 1
SOLUCIONES AMORTIGUADORAS UTILIZADAS
PARA LA MEDICION DE ACTIVIDAD
PROTEOLÍTICA, CON BSA COMO SUSTRATO

Amortiguador	pH
KCl/HCl	1,0
KCl/HCl	1,5
KCl/HCl	2,0
Glicina/HCl	2,5
HCl/Glicina y	
ác. Cítrico/Citrato Sodio	3,0
HCl/glicina y	
ác. Cítrico/Citrato Sodio	3,5
ác. Cítrico/Citrato Sodio	4,0
ác. cítrico/Citrato Sodio	4,5
ác. Cítrico/Citrato Sodio	5,0
ác. Cítrico/Citrato Sodio	5,5
Na ₂ HP0 ₃ /NaH ₂ P0 ₄	6,0
Na ₂ HP0 ₃ /NaH ₂ P0 ₄	6,5
Na ₂ HP0 ₃ /NaH ₂ P0 ₄	7,0
Na ₂ HP0 ₃ /NaH ₂ P0 ₄ y HCl/Trizma base	7,5
Na ₂ HP0 ₃ /NaH ₂ P0 ₄ y HCl/Trizma base	8,0
HCl/Trizma base	8,5
HCl/Trizma base	9,0
Na ₂ C0 ₃ /NaHC0 ₃	9,5
Na ₂ C0 ₃ /NaHC0 ₃	10,0
Na ₂ C0 ₃ /NaHC0 ₃	10,5

DIAGRAMA DE BLOQUES N° 1
FRACCIONAMIENTO DE PROTEINAS DE CARNE
DE PINZAS DE JAIBA



Medición espectrofotométrica a 660 nm, usando hemoglobina como sustrato: Para la detección de actividad proteolítica, se realizó la incubación a 37 °C durante 30, 60, 90, 120 y 180 minutos, en el siguiente medio de ensayo: 0,5 ml de hemoglobina al 1,1 % (p/v) en medio alcalino a pH 7,2, 1,5 ml de amortiguador 187 mM citratofosfato pH 7,2 y 0,5 ml de muestra de concentración aproximada de proteínas de 8,9 mg/ml. La reacción se detuvo adicionando 2,5 ml de TCA al 5 %. Posteriormente la mezcla se centrifugó por 3 minutos a 12.000 x g a 4 °C, y en el sobrenadante se determinaron los aminoácidos aromáticos y/o péptidos liberados en el medio (11,12).

Medición a 280 nm y usando carne de jaiba como sustrato endógeno: La incubación se realizó a 37 °C, con agitación constante y durante 0, 1, 2, 3, 4, 5, 12, 24 horas en el siguiente medio ensayo: como sustrato se utilizó una suspensión que contenía 1,5 g (peso húmedo) de pasta de carne de pinzas de jaiba recién extraída y homogeneizada con una varilla de vidrio, con 7,5 ml de NaCl 0,15 N. El ensayo se detuvo

adicionando 0,8 ml de TCA al 100 % (p/v). Posteriormente la mezcla se centrifugó a 12.000 x g por 10 minutos, y en el sobrenadante se determinaron los compuestos que absorben a 280 nm.

Determinación de los perfiles proteicos de las proteínas de jaiba. Electroforesis en minigeles de poliacrilamida en presencia de SDS: Se prepararon los geles de poliacrilamida al 12 % (p/v) en presencia de SDS de acuerdo a Laemmli (13). Para la corrida del gel se utilizó una solución amortiguadora de trizma base-glicina, pH 8,2. Se aplicaron las muestras de los diferentes extractos proteicos previamente desnaturizados por calentamiento durante 5 minutos a 100 °C, en presencia de un «cocktail» de muestra concentrada 4x al 0,25 % de 2-mercaptoetanol, al 2 % de SDS y 0,001 % de azul bromofenol y glicerol al 10 %. En cada bolsillo del gel se aplicó aproximadamente, 7 µg de proteínas y en un bolsillo adicional se agregó una solución que contenía estándares de proteínas preteñidos de masa molecular conocida. Las electroforesis se realizaron aplicando entre 20 mA (gel concentrador) y 50 mA (gel separador). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 de acuerdo a lo descrito por Weber y Osborn (14).

Electroforesis en minigeles de poliacrilamida en condiciones nativas: Se prepararon estos minigeles de la misma manera que los anteriores, pero sin adicionar SDS. Se aplicaron las muestras de extractos proteicos en presencia de azul de bromofenol y glicerol.

Caracterización de las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de la carne de jaiba recién extraída: Para identificar las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de jaiba se siguió el procedimiento planteado en el diagrama de bloques N° 1 (15). Los sobrenadantes se sometieron a una electroforesis en condiciones desnaturizantes.

Método de Lowry

Se utilizó el método de Lowry (16) para la medición de proteínas solubles, en todos los ensayos que así lo requirieron. Para ello se agregaron hasta 0,2 ml de muestra; 1 ml de solución de sulfato de cobre alcalino, preparado con un amortiguador alcalino que contenía 2 % (p/v) de tartrato de sodio y potasio preparado en una solución 0,1 M de NaOH y 2 % (p/v) de tartrato de sodio y potasio preparado en una solución 0,1M de NaOH y 2 % (p/v) de Na₂CO₃; 0,1 ml de reactivo de Folin-Ciocalteau diluido 1:2 con agua y se incubó 30 minutos a 30 °C. Luego del desarrollo de color se leyó la absorbancia a 750 nm. Se utilizó un estándar de BSA de concentración conocida. Todos los ensayos se realizaron en duplicado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Actividad proteolítica: La jaiba es un recurso marino que normalmente es comercializada viva o como producto congelado, por ser altamente perecible; es por ello que se consideró necesaria la investigación de actividad proteolítica presente en el músculo de las pinzas y patas de jaiba, que es donde se concentra el mayor porcentaje de la porción comestible de este crustáceo.

Para detectar la actividad proteolítica, se realizó inicialmente una incubación de extractos de jaiba con BSA como sustrato usando un barrido de pH entre 1,0 y 10,5 con incrementos de 0,5 unidades. Los experimentos cinéticos realizados hasta los 180 minutos tanto a 25 °C como a 37 °C no permitieron detectar actividad proteolítica.

Con el objeto de aumentar la sensibilidad del ensayo se reemplazó BSA por hemoglobina y se usó el método de Lowry para detectar los aminoácidos aromáticos liberados. Sin embargo, usando este método tampoco fue posible detectar actividad proteolítica. La imposibilidad de detectar esta actividad enzimática a través de las metodías usadas, no significa que ésta no esté presente en el tejido. En la literatura no existen estudios realizados de actividad proteolítica en carne de pinzas de jaiba recién extraída. Sin embargo, existen estudios en determinación de actividad proteolítica en músculo de pescado, en los que se ha detectado una baja actividad enzimática en las condiciones usadas para las proteínas de jaiba (12).

Estudios realizados en krill señalan que este crustáceo posee un alto contenido de proteasas provenientes del estómago, hígado y abdomen, con actividad óptima a pH débilmente alcalino (17, 18) y se ha encontrado que más del 95 % de la actividad proteolítica total está localizada en el cefalotórax (19).

Durante el almacenamiento de la carne, el visible deterioro posterior de la carne de jaiba, detectable por el olor y el cambio de color, podría deberse probablemente al ataque microbiano, o bien, a la generación de aminas típicas de los procesos de putrefacción (20).

Para descartar la posibilidad de que la incapacidad de detectar actividad proteolítica, se debía a que el sustrato no era el adecuado, se ensayó el uso de la proteína de jaiba como sustrato endógeno. Del ensayo realizado, usando como sustrato endógeno la carne de jaiba, tampoco se pudo detectar actividad proteolítica.

Por lo tanto, si la carne de jaiba tuviera proteasas éstas estarían presentes en niveles tan bajos, que los métodos utilizados no pudieron detectarlos. Estos resultados permiten afirmar que las proteínas de la carne de jaiba no sufrirán proteólisis a tiempos cortos, a diferencia de lo descrito para otras especies (21, 22, 23).

Perfiles proteicos de carne de pinzas y patas delanteras de jaiba.

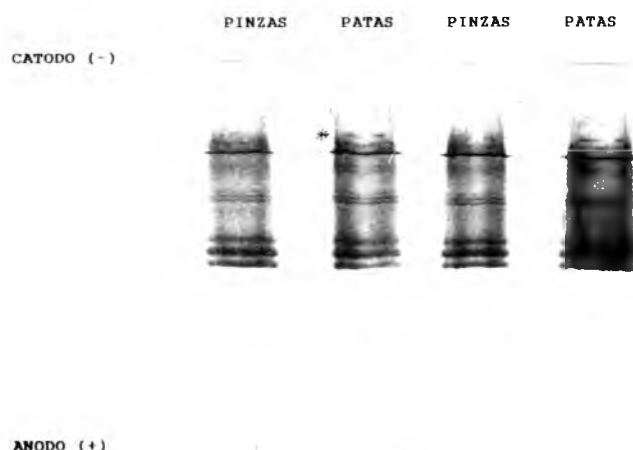
Se obtuvieron perfiles electroforéticos de las proteínas

solubles de carne de jaiba, extraídas a una fuerza iónica 0,15 N NaCl, en condiciones nativas y desnaturalizantes. Se trabajó con tejido de pinzas y de patas delanteras con el fin de comparar cualitativamente si los perfiles proteicos de ambos tejidos tenían diferencias apreciables.

a. Electroforesis en condiciones nativas: La Fig. 1, muestra el gel PAGE nativo, en la que se puede observar, que los patrones proteicos para los extractos de carne de patas y pinzas de jaiba son muy parecidos. En ambos perfiles se puede visualizar al menos 7 bandas mayoritarias. Las diferencias percibidas son mínimas y se pueden detectar a través de bandas muy débiles, marcadas con «*» en la Fig. 1, que aparecen en patas y no en pinzas.

FIGURA 1

PAGE-Nativo de extracto soluble al 0,15N de NaCl de carne de pinzas y patas de jaiba. Cada carril fue cargado con 5µl de cada extracto. Solución amortiguadora trizma base-glicina pH=8,2

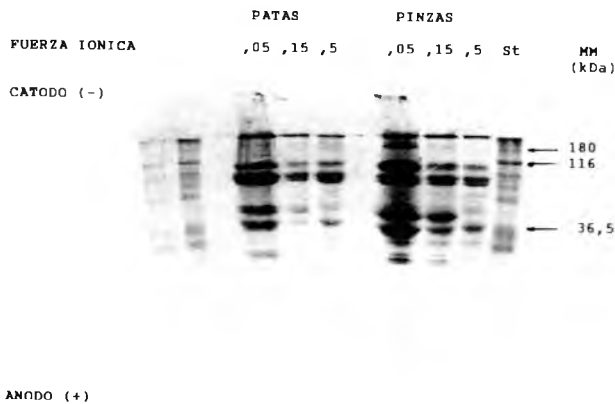


De lo anterior se puede deducir que entre estos dos tejidos de diferentes lugares anatómicos de la jaiba las diferencias encontradas en los perfiles proteicos obtenidos por electroforesis PAGE nativa son leves.

b. Electroforesis PAGE-SDS: La Fig. 2, presenta el análisis pro PAGE-SDS de extractos solubles de carne de pinzas y patas realizadas a tres fuerzas iónicas (I) diferentes. Es posible apreciar que existen diferencias entre los extractos a distintas I, tanto en el caso de la carne de patas como la de pinzas de jaiba; estas diferencias son especialmente notorias cuando se compara las proteínas extractables I 0,05 y las de I 0,5. Cuando se extrae con fuerza iónica equivalente a 0,15 y 0,5, las diferencias observadas son menos notorias. Este estudio permitió diseñar el experimento que se presenta a continuación para diferenciar proteínas miofibrilares de sarcoplasmáticas.

FIGURA 2

PAGE-SDS de extractos solubles, a distintas fuerzas iónicas, de carne de patas y pinzas de jaiba. En cada bolsillo se cargó alrededor de 7 µg de proteínas



Caracterización de las proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de la carne de jaiba recién extraída.

Se fraccionaron las proteínas de jaiba a dos fuerzas iónicas (0,05 y 0,5). Se obtuvieron 4 sobrenadantes, como resultado del fraccionamiento de las proteínas de jaiba, a distinta fuerza iónica. Los sobrenadantes S₁ y S₂ corresponden a las proteínas extraídas cuantitativamente a una fuerza iónica de 0,5 de NaCl.

La Fig. 3 muestra un gel PAGE-SDS, cuyos carriles S₁ y S₂ correspondientes a proteínas extraídas a la fuerza iónica más baja, permite observar la presencia de bandas proteicas comunes, que se asociarían a proteínas sarcoplasmáticas, a diferencia de las bandas observadas en el carril S₄, corresponderían principalmente a proteínas miofibrilares; las bandas observadas en el carril S₃ corresponderían a una transición entre la fuerza iónica baja y la alta.

Rehbein y Kundiger (24), compararon perfiles electroforéticos de proteínas sarcoplasmáticas de diferentes especies de pescado, con el fin de identificar especies y encontraron que existían grandes diferencias en los patrones proteicos a nivel de proteínas sarcoplasmáticas. En este caso se puede decir que los patrones proteicos obtenidos para la jaiba en los carriles S₁ y S₂ en la Fig. 3 serían específicos para la jaiba mora. Para comparar patrones de proteínas sarcoplasmáticas de diferentes especies es necesario hacerlo bajo las mismas condiciones de trabajo (24).

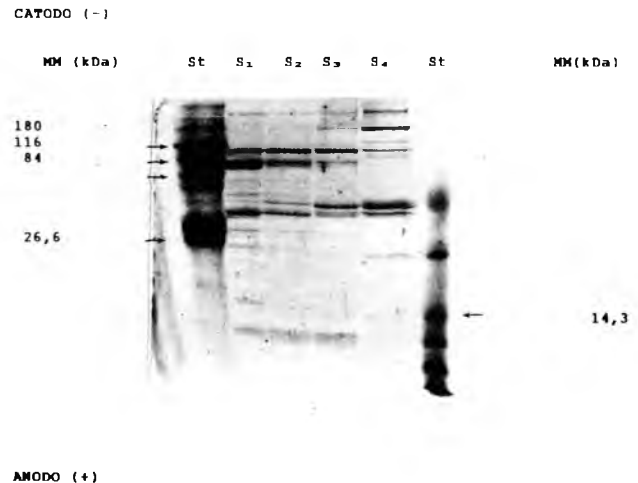
Respecto a los perfiles proteicos observados en el carril S₄, del gel representado en la Fig. 3 se puede destacar que la primera banda se podría asociar a la cadena pesada de la miosina, ya que está alrededor de 200 kDa, al igual que lo descrito para la miosina de otras especies como conejo, bovino, krill y pescado que se sitúan alrededor de la misma MM (25, 26, 19, 27, 28). La banda de menor MM observada alrededor de 40 kDa correspondería a actina; la banda proteica ubicada alrededor de 30 kDa estaría relacionada con

tropomiosina; en el carril S₄ aparecen dos bandas proteicas muy suaves en la zona de MM 20 kDa, que podrían corresponder a las subunidades ligeras de la miosina. Para poder afirmar lo anteriormente discutido se requerirían más estudios los que podrían incluir el uso de anticuerpos específicos contra cada una de estas proteínas. La información que se puede extraer de la Fig. 3 es un perfil característico de las proteínas extractables a fuerzas iónicas equivalentes a 0,05 y 0,5 N de NaCl.

FIGURA 3

PAGE-SDS de los extractos de carne de pinzas de jaiba, extraídos a fuerzas iónicas de 0,05 y 0,5. Cada bolsillo fue cargado con 7 µg de proteína aproximadamente.

Amortiguador usado fue trizma base-glicina pH 8,2. S₁ y S₂ corresponden a extractos obtenidos de los primeros dos lavados a I= 0,05 y S₃ y S₄ a los extractos obtenidos con I= 0,5



Finalmente de este estudio se puede concluir lo siguiente:

- En las condiciones estudiadas en este trabajo, no se detectó actividad proteolítica en carne de pinzas de jaiba recién extraída.
- Al analizar los perfiles proteicos, en PAGE-SDS, de los extractos solubles de carne de pinzas y patas, se encontraron pequeñas diferencias, en bandas que aparentemente no estarían asociadas a proteínas estructurales. En PAGE-nativo también se encontraron diferencias leves en los patrones proteicos electroforéticos.
- Se determinaron al menos 12 bandas proteicas en PAGE-SDS de extractos solubles de carne de pinzas de jaiba a una fuerza iónica de 0,05, que se asimilarían a proteínas sarcoplasmáticas.
- Se determinaron al menos 11 bandas proteicas en PAGE-SDS de extractos solubles de carne de pinzas de jaiba que estarían asociadas a las proteínas miofibrilares. Para confirmar definitivamente esta primera caracterización se sugieren estudios adicionales.

REFERENCIAS

1. Robinson D. Bioquímica de alimentos y valor nutritivo de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. 1991.
2. Handbook US Dpt. Agriculture. Composition of food finfish and shellfish products. N° 8-15. 1987.
3. IFOP. Desarrollo de la pesquería de jaiba (*Cancer sp.*). V Región 1982.
4. IFOP. Recursos indicativos del sector pesquero nacional. Recursos, tecnología, producción y mercado. Jaiba 1985.
5. SERNAP. Anuario Estadístico de Pesca. Ministerio de Economía y Reconstrucción. 1993.
6. IFOP. Diagnóstico de las principales pesquerías nacionales demersales (crustáceos). Zona Central. pp. 1-6, 52-58. 1986.
7. García C. Revisión de las tecnologías de procesamiento de crustáceos de importancia comercial. Tesis Ingeniero en Alimentos, U. Católica de Valparaíso. 1989.
8. Zamora S. Elaboración de jaibas en conserva. Información técnicas, IFOP. Circular N° 78. 1972.
9. Pizardi C. y A. Sánchez. Elaboración de conservas de carne de cangrejo peludo (*Cancer polydon*) en salmuera y en aceite. Simposio Internacional de los Recursos Vivos y las Pesquerías en el Pacífico Sudeste. Viña del Mar 9-13 de Mayo 1988.
10. Laskowski M. Chymotrypsinogens and chymotrypsin. Methods in Enzimology. Vol II Academic Press Inc. Publishers. Edited by Sidney P. Colowick and Nathan Kaplan. New York pp19. 1955.
11. Laskowski M. Trypsinogen and trypsin. Methods in Enzimology. Vol II Academic Press Inc. Publishers. Edited by Sidney P. Colowick and Nathan Kaplan. New York pp.33-34. 1955.
12. Makinodan Y., Hirotsuka e Ikeda. Neutral proteinase of carp muscle. J. Food Sci. 44:1110-1117. 1979.
13. Laemmli U. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685. 1970.
14. Weber K. y M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244:4406-4412. 1969.
15. Kawashima T., K. Arai y T. Saito. Studies on muscular proteins of fish-IX An attempt on quantitative determination of actomyosin in frozen «surimi» from Alaska-Pollak. Bulletin of the Japanese Society of Sc. Fisheries. 39 (2):207-214. 1973.
16. Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275. 1951.
17. Borrás F. y D. Romo. Actividad enzimática y separación por cromatografía de las enzimas proteolíticas del krill. Programa Investigaciones del recurso krill. CORFO. 1978.
18. Romo D. Separación-Inhibición de las enzimas proteolíticas del krill. Programa Investigaciones del recurso krill. CORFO. 1978.
19. Suzuki T. Tecnología de las proteínas de pescado y krill. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. 1987.
20. Conn E., P. Stumpf y G. Bruening. Outlines of Biochemistry 5/ E. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos de Norteamérica. pp 343-344. 1987.
21. Ikeda S. Other organic components and inorganic components. Advances in Fish Science and Technology, Edited by J.J. Connel Gran Bretaña pp. 111-123. 1980.
22. Gilbert A. y J. Raa. Tissue degradation and belly bursting in capelin. Advances in Fish Science and Technology, Edited by J.J. Connel Gran Bretaña pp255-258. 1980.
23. Hjelmeland K. y J. Raa. Fish tissue degradation by trypsin type enzymes. Advances in Fish Science and Technology, Edited by J.J. Connel Gran Bretaña pp. 456-459. 1980.
24. Rehbein H. y R. Kundiger. Comparison of the isoelectric focusing patterns of the sarcoplasmic proteins from red and white muscle of various fish species. Arch Fischwiss 35:12 pp 7-16. 1984.
25. Porzio M. y A. Pearson. Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. Biochemica et Biophysica Acta. 490:27-34. 1977.
26. Whitaker J. y S. Tannenbaum. Food proteins. AVI Publishing Company USA. Capítulos 6 y 16. 1977.
27. Cheftel J., Cuq J. y D. Lorient. Proteínas alimentarias, Editorial Acribia S.A. Zaragoza pp32-35, 49-61, 63-70, 78-85, 143, 153, 155, 161. 1989.
28. LeBlanc E. y R. LeBlanc. Separation of cod (*Gadus morhua*) fillet proteins by electrophoresis and HPLC after various frozen storage treatments. J Food Sci. 54(4): 827-834. 1989.

Recibido: 29-08-1994

Aceptado: 21-04-1995

Effect of germination on the protein content and on the level of specific activity of lipoxigenase-1 in seedlings of three soybean cultivars

*Bordingnon J.R.*¹, *Ida E.L.*², *Oliveira M.C.N.*¹, y *Mandarino J.M.G.*¹

SUMMARY. The effect of germination on the protein content and in the level of specific activity of lipoxigenase-1 on seedlings of Santa Rosa, FT-2 and Davis soybean cultivars were studied. Soybean seeds of the three cultivars were germinated from 0 to 72 hours in a seed germinator at 30 °C temperature, 100% relative humidity, and absence of light. The seeds were then frozen in liquid nitrogen, freeze-dried and milled. The lipoxigenase-1 was extracted with 0,02M tris-HCl buffer at pH=8,2 and 13% saccharose for 30 minutes at 4 °C without shaking. The highest levels of specific activity of lipoxigenase-1 per miligram of flour (dry basis) in the Santa Rosa, FT-2 and Davis cultivars were observed between 18 and 36, 18 and 24, and 0 and 12 hours, respectively. The polynomial quadratic model best fits the regression analysis of the variable levels of specific lipoxigenase activity for cultivar Davis ($R^2=0,9197$). Although for cultivars Santa Rosa ($R^2=0,9041$), and FT-2 ($R^2=0,7486$) the 4th degree polynomial model has shown the best fit. The protein content in the three cultivars studied reached the maximum values at 48h germination. The germination induced a relative increase of the protein content but caused a reduction of the level of specific lipoxigenase-1 activity.

RESUMEN. Efecto de la germinación sobre el contenido de proteína y sobre los niveles de actividad específica de lipoxigenasa-1 en plantines de tres cultivares de soya. En este trabajo se estudió el efecto de la germinación sobre el contenido de proteína y sobre los niveles de actividad específica de lipoxigenasa-1 en plantines de los cultivares de soya Santa Rosa, Davis y FT-2. Las semillas de soya de los tres cultivares germinaron entre 0 y 72h a 30 °C, 100% de humedad relativa y ausencia de luz. Las semillas se congelaron en N líquido, posteriormente fueron liofilizadas y molidas. La lipoxigenasa-1 se extrajo con buffer 0,02M tris-HCl pH 8,2 y sacarosa al 13%, durante 30 min a 4 °C, sin agitación. Los niveles más elevados de actividad específica por mg de harina, expresados en materia seca, para los cultivares Santa Rosa, FT-2 y Davis se observaron entre 18-36, 18-24, 0 y 12 horas, respectivamente. En el análisis de regresión de la variable nivel de actividad específica de lipoxigenasa, para el cultivar Davis, el mejor ajuste se obtuvo con el modelo polinomial cuadrático ($R^2=0,9197$). El modelo que mejor se ajustó para los cultivares Santa Rosa ($R^2=0,9041$) y FT-2 ($R^2=0,7486$) fue el polinomial de cuarto grado. En los tres genotipos estudiados el tenor de proteínas alcanzó el máximo valor a las 48h después del inicio de la germinación. La germinación indujo un aumento del contenido proteico y causó reducción del nivel de actividad específica de la lipoxigenasa-1.

INTRODUCTION

The soybean seed is a rich and economical source of high quality protein. Although its common use for human consumption, has been of low acceptability mainly due to the presence of some undesirable compounds which affect flavour. Among these, trypsin inhibitors, phytic acid and lipoxigenase are the major ones.

The lipoxigenases (E.C. 1.13.11.12) catalize the hydroperoxidation of the free polyunsaturated fatty acids and their derivates which contain the cis, cis-1,4-pentadien system, originating the corresponding monohydroperoxides. These hydroperoxides (9- or 13-cis, trans) are decomposed into aldehydes, ketones, acids and other secondary compounds which are involved in the formation of the undesired flavour characteristic of foods produced from leguminous plants (1). The unpleasant flavour of soybean is known as «beany» flavour and has been described as a limiting factor for its use as food source in the Occident (2).

Even small amounts of lipoxigenase are able to cause the oxidation of the fatty acids and to form the compounds that

1 EMBRAPA-CNPSO -CxP 1061 -CEP 86.001-970- Londrina - PR-
Brazil
2 Dept. Tec. Alim. Med. UEL - CxP 6001-CEP 86.051-970, Londrina - PR
Brazil

originate the undesirable flavours (3). The soybean lipoxygenases are divided in four isozymes denominated lipoxygenase L₁, L₂, L_{3a}, and L_{3b}, (4). These last two isozymes, having similar properties, are considered identical for analysis purposes and are simply denominated as L₃.

Several processes have been developed to remove or inactivate the soybean lipoxygenases in the attempts to improve its use for human consumption. These processes, however, are usually expensive and not completely suitable since insolubility of proteins may occur and, for some processes, a «over cooked» or «over roasted» flavour may be enhanced (5,6).

The process of germinating the soybean seeds prior to their use for human consumption was also an attempt to overcome some disadvantages associated with the use of the seed «in natura», which are mainly the presence of trypsin inhibitors as well as the lipoxygenases activity (7,8). Depending on the cultivar, the germination process, in addition to the reduction of these compounds, improves the nutritional value of the soybean seed by increasing the protein and mineral contents as well as by decreasing the phytic acid content (9).

There are still some controversies in the literature concerning the main isozyme involved in the formation of n-hexanal. Fisher & Grosh, (10) found that lipoxygenase-1 is responsible for the formation of 90% of the 13-hydroperoxide at pH 7,0, and that lipoxygenase-2 induces the formation of only 30% of that compound at the same pH, Matoba et al (11) proved that the n-hexanal is solely a consequence of the 13-hydroperoxide breakdown.

The objective of the present work was to investigate the effect of germination on the protein content and on the level of specific activity of lipoxygenase-1 in seedlings of Santa Rosa, FT-2 and Davis soybean cultivars.

MATERIAL AND METHODS

Cultivars

The three soybean cultivars used in this study were chosen based on the characteristics of their lipoxygenase-1 activity (low, intermediate, and high), according to Barros et al (12). The cultivars were: FT-2 (low L₁ activity), Davis (intermediate L₁ activity), and Santa Rosa (high L₁ activity).

The seeds of the three cultivars, harvested in the 1987/88 and 1988/89 growing seasons, were provided by the Germoplasm Bank of the National Soybean Research Center - CNPSo of the Brazilian Enterprise for Agriculture Research - EMBRAPA, located at Londrina Country, Paraná State, South Brazil.

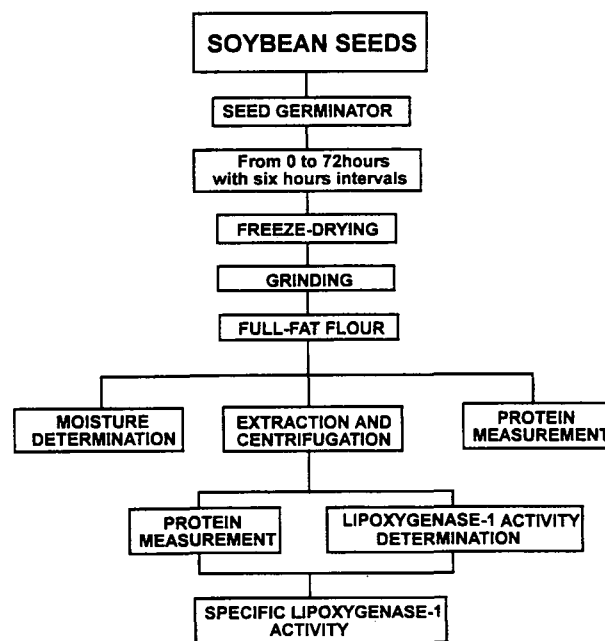
Analytical Methods

Seed germination: The steps for seed germination and analytical determinations are shown in Fig. 1. The seeds of the three cultivars were germinated from 0 to 72 hours with six

hours intervals. For each germination time a sample of 150 non surface sterilized seeds were previously hand selected and divided into three 50-seed subsamples. The subsamples were arranged on top of two sheets of germination paper which had been previously moistened with distilled water. A third moistened sheet was used to cover the seeds. Each subsamples was then rolled up and randomly transferred to a 30 °C temperature and 100% relative humidity seed germinator, and kept in the dark for the different periods of time.

After each germination period the rolls were retrieved from the germinator and dismounted. The seeds from each were then frozen in liquid nitrogen and transferred to opaque paper bags which were immediately vacuum sealed in plastic bags and stored at - 18°C for further freeze-drying.

FIGURE 1
Seed germination procedure and analytical determinations



Freeze-drying: After freezing all samples were transferred inside of paper bags to a Freeze Dryer (Labconco model 8) for 27 to 36 hours until humidity was stabilized around 5%, to allow grinding.

Grinding: All samples were then ground for one minute in a cyclone Sample Mill and stored at -18° in sealed plastic flasks until use.

Lipoxygenase-1 extraction: The extraction condition and the effects of granulometry and freezing time on the lipoxygenase-1 activity were studied by Bordignon, (13).

The lipoxygenase-1 extraction was carried out using 300 mg of full-fat flour and 15ml of 2mM Tris-HCl (pH 8,2) buffer,

containing 13% of saccharose, at 4 °C for 30 minutes without shaking. The obtained extracts were centrifuged for 15 minutes at 11.000g at 4 °C. The supernatant was used for lipoxygenase-1 activity and soluble protein determination. Three extractions were done for each subsample.

Substrate preparation: Linoleic acid 10mM was prepared as described by Axelrod et al (4). According to the description, 70mg of linoleic acid and the same amount of Tween 20 were weighed, carefully homogenised with 4ml of oxygen-free distilled water in a volumetric flask of 25 ml. Enough amount of 0.5N NaOH was added to produce an optically clear solution. The volume was completed with oxygen-free distilled water and the solution was homogenized by inversion avoiding excessive aeration. Aliquots of 1 and 2 ml were stored at -18 °C in amber glass flasks previously sealed under a nitrogen atmosphere.

Lipoxygenase-1 activity measurement: The lipoxygenase-1 activity was determined using 100µl of substrate; (2,9-X) ml of 0.02M borate buffer (pH 9,0) and Xml of the extract. Reaction velocity was measured at 280 nm in a Varian 634 Spectrophotometer at 25 °C in 30 seconds intervals until seven minutes after the enzyme addition. The inclination angle formed by the relation between the optical density variation (ΔDO) and the time (minutes) was calculated. These values were used to calculate the lipoxygenase-1 activity. One unit of activity was defined as the amount of enzyme (mg) necessary to produce a variation of 0.001 unit on the optical density, under the assay conditions. The activity determinations were accomplished in triplicate. Specific lipoxygenase-1 activity (SA) was defined as the ratio between the specific activity of lipoxygenase-1/mg of soybean flour (on dry-basis), multiplied by 15:

$$SA = \frac{\Delta OD \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}}{P.F. \cdot 0.001} \times 15$$

where: $\Delta OD \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ = optical density variation/minute/ml of extract;

15 = total extract volume (ml);

P = soluble protein amount (mg);

F = flour amount (mg) in dry basis, used in the extraction.

Protein measurement: The protein content of the extracts was determined in triplicate according to the method of Lowry et al (14).

The nitrogen determination in the flours was made according to the micro-Kjeldahl method (15). The protein conversion factor used was 6.25.

Moisture determination: The moisture content of the germinated seeds was determined using a drying oven regulated at 105 °C (15)

Experimental design and statistical analysis: The experimental design used to evaluate the results obtained from the different time of germination of the soybean seeds (Santa Rosa, FT-2 and Davis) was the complete randomized design of the treatment combinations in factorial arrangement = 12 times x 3 cultivars, with 3 replications, totalizing 36 treatments. An exploratory analysis of the data was carried out for the lipoxygenase activity and protein through the Liliefors, (16) and Burr & Foster, apud Anderson & McLean, (17) tests. From these analyse it was possible to evaluate the residue distribution and variance homogeneity of the treatments studied.

These variables were also submitted to variance (18) and to regression (19) analyse, while the Multiple Range Test used was Tukey (P=0.05).

RESULTS AND DISCUSSION

Germination of the soybean seeds: The germination of the soybean seeds was made without previous seed hydration to avoid lixiviation of some constituents, according to Giri et al, (20).

Maximum germination time used in this study was 72 hours, since prolonged germination could cause a pronounced growth of the radicle, increasing the probability of fungus growth (21) and color changes (9).

Since the radicle size can vary during the germination process, depending on the soybean cultivar (9, 22, 23), in this study the germinated seeds were classified according to the germination time. Soybean seeds not submitted to germination were used as the experimental control.

Level of specific lipoxygenase-1 activity: the results of the specific activity per miligram of flour (dry basis) defined as level of specific activity are given in Table 1. Concerning the variable «level of specific activity», the ANOVA of data was significant for the factors: time, cultivar and for the interaction, with a variation coefficient of 6,345%.

Comparing the three cultivars in each germination time, it was observed that frequently the Davis cultivar differed statistically from Santa Rosa and FT-2 cultivars. At zero and six hours of germination time it showed similar results to those obtained for Santa Rosa. The FT-2 cultivar, in its turn, differed statistically from Santa Rosa in all germination times, except at 72 hours, where significant statistical difference was not observed in the level of specific activity between the two cultivars (Table 1).

TABLE 1
MEANS OF THE INTERACTION GERMINATION TIME X CULTIVAR FOR THE VARIABLE «SPECIFIC ACTIVITY» AND DECREASE PERCENTAGE (DEC %) OF ACTIVITY OF LIPOXYGENASE-1 PER MILIGRAM OF FULL-FAT SOYBEAN FLOURS-CULTIVARS SANTA ROSA, FT-2 AND DAVIS.

Time (hs)	Cultivar					
	Santa Rosa	dec(%)	FT2	dec(%)	Davis	dec(%)
0	1.166 ¹ abc B	0,00 ²	1,397 e A	0,00	1,035 a B	0,00
6	1,029 bc B	11,75	1,312 e A	6,084	1,028 a B	0,67
12	1,035 bc B	11,23	1,335 e A	4,44	0,841 ab C	18,74
18	1,182 ab B	-1,36	2,844 a A	-103,58	0,801 bc C	22,60
24	1,343 a B	-15,52	2,717 ab A	-94,49	0,756 bc C	26,96
30	1,280 a B	-9,78	1,949 d A	-39,51	0,689 bcd C	33,43
36	1,322 a B	-13,38	2,621 b A	-87,62	0,684 bcd C	33,91
42	1,055 bc B	9,52	2,174 c A	-55,60	0,659 bcd C	36,33
48	1,023 bc B	12,26	2,515 e A	-8,44	0,683 bcd C	34,01
54	0,962 cd B	17,49	1,450 e A	-3,70	0,611 cde C	41,06
60	0,778 de B	33,28	1,047 f A	25,05	0,531 de C	44,69
72	0,708 e A	39,28	0,805 g A	42,38	0,438 e B	57,68

1 Means followed by the same lower case letter in each column and same upper case letter in each row, are not significantly different at P=0.05 using Tukey's multiple range test.

2 In relation to time zero.

The Tukey Multiple Range Test (P=0.05) showed that for the FT-2 cultivar there was higher differentiation among the average multiple comparison groups. On the contrary, for the Santa Rosa and Davis cultivars this did not occur (Table 1).

The Davis cultivar showed, from the 12 hours time of, a gradual decrease of the level of specific activity, while the Santa Rosa and FT-2 cultivars showed more variation during the germination times studied (Table 1). Considering the cultivars within germination times, the percentages of decrease were 57.68, 42.38 and 39.28% for the Davis, Santa Rosa and FT-2 cultivars, respectively. These values were very similar to those found by Suburbine et al. (8) (approximately 55%) using seeds of cultivar Jupiter. Since in this study the size of the germinated seeds were not measured during germination, it is difficult to compare these results with those reported by Hildebrand et al (24), which were based on the size (mm) of the seeds and not on the germination time.

The regression analysis of the experimental data, obtained from the variable «level specific activity/mg of flour» during germination, indicated that the quadratic polinomial model fits best the Davis cultivar ($R^2=0.9197$) and the polinomial model of the fourth degree fits best the Santa Rosa and FT-2 cultivars ($R^2=0.9041$ and 0.7486 , respectively).

Effect of the germination on the amount of protein of the full-fat soybean flours: The average of total protein values in the full-fat germinated soybean flours from Santa Rossa, FT-2 and Davis cultivars are shown in Table 2.

TABLE 2
MEANS OF THE INTERACTION GERMINATION TIME X CULTIVAR FOR THE VARIABLE «PROTEIN» AND INCREASE PERCENTAGE (INC %) OF PROTEIN IN FULL-FAT SOYBEAN FLOURS OBTAINED FROM THE CULTIVARS SANTA ROSA, FT-2 AND DAVIS DURING THE GERMINATION PROCESS.

Time (hs)	Cultivar					
	Santa Rosa	inc(%)	FT2	inc(%)	Davis	inc(%)
0	135,06 ¹ g B	0,00 ²	38,50 f A	0,00	38,29 g A	0,00
6	40,19 e A	11,05	39,49 e B	2,56	39,68 f B	0,98
12	39,25 f C	8,92	41,52 c A	7,83	39,93 ef B	1,63
18	39,13 f C	8,56	41,19 d A	6,97	40,89 c B	4,08
24	40,56 d B	12,54	41,57 c A	7,95	40,44 d B	2,93
30	40,92 dc B	13,50	41,60 c A	8,04	40,23 de C	2,40
36	40,61 cd B	12,67	42,30 b A	11,67	40,40 d B	2,83
42	40,63 cd C	12,72	31,80 c A	8,55	40,98 c B	4,29
48	41,05 b C	13,89	43,19 a A	12,16	42,61 ab B	8,44
54	40,57 d C	12,56	43,22 a A	12,24	42,38 ab B	7,88
60	40,44 dc C	12,19	40,37 a A	4,84	42,30 b B	7,66
72	41,51 a C	15,17	43,38 a A	12,65	42,71 a B	8,69

1 Means followed by the same lower case letter in each column and same upper case letter in each row, are not significantly different at P=0.05 using Tukey's multiple range test.

2 In relation to time zero.

The ANOVA of these results was significant to the factors: time, cultivar and to the interaction time X cultivar, with a variation coefficient of 0.29%.

Comparing the amount of protein of the three cultivars at each germination time, it was observed that the FT-2 cultivar primarily showed higher levels of protein. Besides, the values of total protein of this cultivar statistically differed from those obtained for the Davis and Santa Rosa cultivars in almost all the germination times. Only at 0 and 15 hours no statistical differences were found when compared to the Davis cultivar.

The Santa Rosa cultivar showed lower values of the total protein in seven different germination times, differing statistically from the FT-2 and Davis cultivars in almost all the germination times (Table 2).

After studying the protein amount according to the germination time in each cultivar it was observed that in the FT-2 cultivar there was a higher differentiation among the average multiple comparison groups, while for the Santa Rosa and Davis cultivars this did not happen. Despite showing the lowest percentage of total protein, the cultivar Santa Rosa showed the highest increase of this variable (15.17%) followed by FT-2 (12.65%) and Davis (8.69%) (Table 2). Generally it was observed that in the three cultivars studied protein increased similarly.

The increase in the protein contents (expressed on dry basis), for the three cultivars in relation to the control, after 72 hours of germination (Santa Rosa= 15.17%, FT-2=12.65% and Davis =8.69%) were higher than those found by Jiménez

et al, (25) (4.4% for the Siatsa cultivar germinated for 72 hours), by Bates et al (26) (5.8% for the Bragg cultivar germinated for 96 hours), by Mostafa & Rhama, (7) (decrease of 0.4% for the Calland cultivar germinated for 72 hours). These increase are relative according to Mostafa & Rhama, (7), since they occur due to the decrease of other compounds during the germination.

Among the regression models, the polynomial of the fifth degree had the best fit for the variable «total protein» of the cultivar Davis, with a determination coefficient of 0.8537. For the cultivars FT-2 and Santa Rosa the quadratic model had the best fit, with determination coefficients of 0.8981 and 0.8470, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the financial support provided by CPG/UDEL, CONCITEC/PR e CNPq.

REFERENCES

1. Eskin N.A.M., Grossman S., Plisky A. Biochemistry of lipoxigenase in relation to food quality. *Critical Reviews in Food Sci Nutr.* Boca Raton, v.9, p. 1-40, 1977.
2. Rackis J.J., Sessa D.J., Honig D.H. Flavour problems of vegetables proteins. *J.A.O.C.S.*, Champaign, v.56, p. 262-271, 1979.
3. Gomes J.C., Visentainier J.V., Moreira M.A., et al. Atividade de lipoxigenase e teor de n-hexanal em farinhas de soja. *Ar. Biol. Tecnol. Curitiba*, v.30, p.481-500, 1987.
4. Aixelrod B, Cheesbrough T.M., Laakso S. Lipoxigenase from soybeans. *Methods Enzimol.* San Diego, v.71, p.441-451. 1981.
5. Eldridge A.C., Warner K., Wolf W.J. Alcohol treatment of soybean and soybean protein products. *Cereal Chem.* St. Paul, v. 54, n.6, p.1229-1237.
6. Esaka M., Suziki K., Kubota K. Inactivation of lipoxigenase and trypsin in soybean on microwave irradiation. *Agric. Biol Chem. Tokyo*, v.50 p.2395-2396, 1986.
7. Mostafa M.M. & E.H. Rhama. Chemical and nutritional changes in soybean during germination. *Food Chemistry*, Barking, v.23, p.257-275. 1987.
8. Suburbie F., D. Mendizabal, C. Mendizabal. Germination of soybean and its modifying effects on the quality of full-fat soy flour. *J.A.O.C.S.*, Champaign, v.48 p.192-194. 1981.
9. Ribeiro M.L.L. Efeito do processo de germinação sobre os constituintes nutricionais e antinutricionais de 2 cultivares de soja. Londrina: UEL, 98p. Dissertação (tese de mestrado) Universidade Estadual de Londrina. 1992.
10. Fischer K.H., Grosch W. Co-oxidation von Linosäure zu flüchtigen Verbindungen von Lipoxigenase-Isozymen aus Sojabohnen. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* Heidelberg, v. 165p. 137-139, 1977.
11. Matoba T., Hidaka H., Kitamura K. et al. Contribution of hydroperoxide lyase activity to n-hexanal formation in soybean. *J Agric Food Chem.* Washington v. 33 p.356-358, 1985 (A).
12. Barros E.G. Moreira M.a., Fontes e.P.B. Atividade de lipoxigenase L₁ e L₁ em cultivares comerciais de soja. *Arq. Biol. Tecnol. Curitiba*, v.27 p.381-386. 1984.
13. Bordingnon J.R. Determinação de lipoxigenase-a: efeito da germinação sobre o teor de proteína e atividade dessa enzima em soja. Londrina: UEL, 92p. Dissertação (tese de mestrado) Universidade Estadual de Londrina. 1993.
14. Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* Baltimore, v. 193, p.265-275. 1951.
15. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985.
16. Lilliefors J.W. On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with mean and Variance Unknown. *J. Amer Statist. Ass.* (s.I.), v.62, p.399-402. 1967.
17. Anderson V.L., McLean R.A. Design of experiments: a realist approach. New York: Marcel Dekker, p.16-24. 1974.
18. Cochran W.G., Cox G.M. *Experimental Design* 29 th e. New York: J. Willey 809p. 1981.
19. Draper N.R. Smith H. *Applied Regression Analysis*. 2nd. New York: J. Willey, 709p. 1981.
20. Giri J., Parvathan, Santhini K. Effect of germination on the leves of pectins, phytins and minerals in three selected legumes. *Ind. J. Nutr. Diet.* Coimbatore, v. 18, p.87-91, 1981.
21. Abdullan A., Baldwin R., Minor H. Germination effects and antinutrients of mungbeans and two strains of small-seed soybeans. *J Food Prot.* Ames, v.47, n.6, p.441-444. 1984.
22. East J.W., Nakayama T.O., Parkan S.B. Changes in stachyose, raffinose, sucrose and monosaccharides during germination of soybeans. *Crop Sci.* Madison v.12, n.1, p.7-9, 1972.
23. Suparmom, Markakis P. Tempeh prepared from germinated soybeans. *J Food Sci.* Chicago v.52, p1736-1737. 1987.
24. Hildebrand D.F., Versluys R.T., Collins G.B. Changes in lipoxigenase isozyme levels during soybean embryo development. *Plant Sci.* v.75, p.1-8. 1991.
25. Jiménez M.F.M., Elías L.G., Bressani R. Estudios bioquímicos y nutricionales de la semilla germinada de soya. *Arch. Latinoam. Nutr.* v.35, p.480-490. 1985.
26. Bates R.P., Knapp F.W., Araujo P.E. Protein quality of green-mature, dry mature and sprouted soybeans. *J Food Sci.* Chicago, v.42, p.271-272. 1977.

Recibido: 29-09-1994

Aceptado: 21-04-1995

Evaluación de los niveles de efectividad de mezclas vegetales en la recuperación de animales con desnutrición proteico-energética precoz y tardía

Patricia Liliana Jiménez de Erramouspe ¹ y Margarita Armada de Romano ²

Instituto de Investigaciones para la Industria Química. Universidad Nacional de Salta. Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. La efectividad de la mezcla trigo: soja (85:15) con y sin el agregado de los aminoácidos limitantes de la misma (metionina y lisina) fue evaluada para: **a.** El mantenimiento de ratas normales, alimentadas previamente con caseinato de calcio (grupo control), **b.** La recuperación de ratas con desnutrición proteico-energética precoz y tardía (grupos DP y DT), y **c.** La habilidad de estos animales (normales y desnutridos) para autoseleccionar los aminoácidos ofrecidos.

La dieta de prueba con y sin la suplementación, fue adecuada para mantener un normal aumento del contenido de nitrógeno corporal de los animales del grupo control.

Los principales cambios en el peso de ratas de los grupos experimentales durante el período de recuperación dependieron: del estado nutricional del animal y de la cantidad de dieta y de aminoácidos ingeridos.

A medida que aumentó la edad del animal disminuyó la ingesta de alimentos en todos los grupos experimentales (esta tasa o relación fue expresada como gramos de alimento consumido/100 gramos de rata) siendo más alta en los animales desnutridos.

La ingesta de aminoácidos (autoselección) dependió: del estado nutricional y del tiempo de la desnutrición de los animales, una ingesta superior a los valores estándar requeridos (Rogers y Harper) fue observada en los tres grupos experimentales.

Se demostró que la cantidad de metionina (g de metionina consumida/100 g de mezcla trigo: soja) estuvieron directamente relacionadas a la ingesta de lisina, expresada en unidades similares una correlación significativa fue observada: $r=0,816$ para el grupo C, y $r=0,789$ para el grupo DT, y altamente significativa ($r=0,996$) para el grupo DP.

El aumento de la tasa entre el nitrógeno corporal total y su valor inicial fue significativo en todos los casos, siendo el efecto más pronunciado para el grupo DP.

SUMMARY. Evaluation of the levels effectiveness of vegetable mixtures in the recovering of rats with later and early protein calorie malnutrition. The efficiency of a wheat: soy mixture (85:15 ratio) with and without supplementation of the limitant aminoacids (methionine and lysine), was evaluated for: **a.** Supporting the normal rat growth previously fed with a casein diet (control group). **b.** The rat recovering with early and later protein-calorie malnutrition, and **c.** The animals ability (control and malnourished groups) in the self-selection for the limitant aminoacids given.

It was shown that the test diet, with and without supplementation, was adequate to sustain a normal body nitrogen content increase of the control groups animals. The principal changes in rat weight of the experimental animals during the recovering period were dependent on the nutritional state and the quantity of both, diet and aminoacids intakes.

As the age of rats increased, the diet intake (expressed as g of diet intake/100 g of rat) decreased in all experimental groups; this effect being more noticeable in malnourished groups.

The self-selected intake of lysine and methionine, depends on: the previous nutritional state and the period of undernutrition of the animals; higher intake than the standard required values (Rogers and Harper) was observed in the three experimental groups.

It was shown that the amount of methionine (gr met intake/100 g of wheat mixture) was directly related to lysine intake, expressed in similar units; significant correlation was observed: $r=0,816$ (control group) and $r=0,789$ (later malnutrition group) and highly significative $r=0,996$ (early malnutrition group).

The increase of the ratio between total body nitrogen and its initial value, was significative in all the cases. However the effect was more pronounced when the results obtained with early-malnutrition group are analyzed. The experiments performed with later malnutrition groups revealed that the increase of body nitrogen content was higher for supplemented diets than for animals fed with no-supplemented mixtures (the observed difference was highly significative $p<0,01$). The analysis of body lipid content showed that the relative increase was much more significative for early malnourished groups. However in all the case the effect of aminoacid supplementation is almost negligible.

¹ Licenciada en Nutrición. Auxiliar de Investigación del Consejo de Investigación, con retribución equivalente a Jefe de Trabajos Prácticos Dedicación Exclusiva. Universidad Nacional de Salta. Buenos Aires, Argentina.

² Ingeniera Química. Profesor Titular en la Cátedra Tecnología de Alimentos. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Salta, Buenos Aires, Argentina.

Las experiencias llevadas a cabo en los grupos con desnutrición tardía, revelaron que el aumento del contenido de nitrógeno corporal fue mayor para los animales que consumieron dietas suplementadas con aminoácidos, con respecto a los que consumieron dietas sin suplementar, la diferencia observada fue altamente significativa $p < 0,01$.

El análisis del contenido de grasa corporal mostró que el aumento relativo fue mucho más significativo para los grupos con desnutrición precoz, mientras que el efecto de la suplementación con los aminoácidos sobre el contenido de grasa corporal fue mínimo.

INTRODUCCION

La disponibilidad de alimentos adecuados en cuanto a su calidad proteica y densidad energética, es de gran importancia, especialmente para poblaciones humanas de bajos recursos económicos, con estado de riesgo nutricional o problemas de deficiencia nutricional. χ

La exclusión de alimentos de origen animal en las dietas, deja a las semillas oleaginosas como fuente de grasas y proteínas, ocupando la soja un lugar importante (1).

La combinación cereal: oleaginosa como alimento, proporciona cantidad y calidad de proteínas adecuadas, junto con calorías apropiadas (2).

Existen evidencias indicativas de que los animales, en mayor medida que el hombre, poseen habilidad para seleccionar una dieta adecuada, cuando se les da a elegir separadamente los componentes de la misma, logrando un crecimiento óptimo (3).

La deficiencia proteica influiría en la ingesta de alimentos, así dietas bajas en proteínas afectarían la cantidad de alimentos consumidos y la eficiencia de su utilización, en términos de crecimiento corporal (4). Por otra parte, el contenido de energía de una ración parece ejercer una considerable influencia sobre el consumo de alimentos y sobre la utilización proteica (5).

En ratas alimentadas con dietas deficientes en proteínas se observa una marcada pérdida del peso corporal (6,7, 8, 9, 10).

Ya que el peso es el resultado de cambios en la composición corporal, es conveniente controlar variaciones en la misma (7). A fin de aportar soluciones económicas y prácticas al problema de la desnutrición. Fue objeto de este trabajo evaluar la efectividad de la mezcla trigo-soja (85:15) suplementada o no con los aminoácidos limitantes de la misma en:

1. Mantenimiento de los animales normales alimentados con caseína, considerándose normales a aquellos libres de condiciones patológicas (20), y
2. Recuperación de animales con desnutrición proteico-energético precoz y tardía.

MATERIAL Y METODOS

Animales: Se utilizaron ratas cepa Wistar de ambos sexos recién nacidas, pertenecientes al Bioterio de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta, las que fueron agrupadas y alimentadas de la siguiente manera:

Grupo control (C): Estas fueron alimentadas en camadas de ocho crías por cada rata nodriza, para asegurar un amamantamiento y crecimiento normal (5) (11) (12) (13). Luego del destete a los 21 días, se les ofreció una dieta con caseinato de calcio en una concentración proteica de 15,51 g/100g de dieta (isonitrogenada con respecto a la mezcla trigo-soja 85:15); la misma fue suministrada por un período de 14 días (Tabla 1).

TABLA 1
DISEÑO EXPERIMENTAL

Tratamiento	Nº de ratas	Destete (días)	Período de desnutrición		Prio. de Recuperación	
			Alimento	Distribución	Alimento	Distribución
Control	24	21	Caseinato	100 %	D. Prueba A	50 %
					D. Prueba B	50 %
D. Tardía	24	21	Dieta LP	100 %	D. Prueba A	50 %
					D. Prueba B	50 %
D. P. precoz	32	21	Dieta LP	100 %	D. Prueba A	50 %
					D. Prueba B	50 %

A. Suplementada con los aminoácidos limitantes

B. No suplementada con los aminoácidos limitantes

Grupo con desnutrición precoz (DP): este grupo fue diseñado de manera que el amamantamiento se realizará en camadas de 16 crías por rata nodriza, a fin de producir desnutrición precoz (21) a los 21 días fueron destetadas, alojadas en jaulas individuales y alimentadas con una dieta LP por 14 días. (Tabla 1).

Dietas: Se utilizaron tres tipos de dietas:

Dieta 1: con un contenido del 15,51 g de proteína 100 g de dieta, en forma de caseinato de Calcio (con un contenido de proteína de 87 g de proteína/100 g de concentrado), esta dieta fue suministrada al grupo control desde el destete y por 14 días (Tabla 2).

TABLA 2
COMPOSICION DE LAS DIETA CONTROL (C)
Y LIBRE DE PROTEINA (LP)

Alimentos	Dietas g/ 100 de dieta	
	(C)	(LP)
Lípidos	5,00	5,00
Proteína	17,83 ^a	0,00
Vitaminas	1,10 ^b	1,10 ^b
Minerales	5,00 ^c	5,00 ^c
Dextrina	71,07	88,09
Total	100,00	100,00

^a 17,83 g de polvo para obtener 15,51 g de proteína (el caseinato de calcio utilizado contiene 87 g de proteína/100 g de caseinato).

^b Vitaminas: Se utilizó una mezcla comercial para animales de laboratorio (Nutritional Biochemicals Cleveland, Ohio).

^c Se utilizó la mezcla comercial de Sales de Hegsted (23).

Dieta 2 : no contenía proteína y fue suministrada a los grupos DT y DP a partir del destete y por 14 días (Tabla 2).

Dieta 3 : o dieta de prueba, consistió en una mezcla trigo-soja, en una proporción de 85:15, respectivamente.

La mezcla fue preparada con harina de trigo comercial tipo 000, según Código Alimentario Argentino (22) y harina de soja con toda su grasa, obtenida en laboratorio, a partir de semillas de *Glycine Max* (L) Merrill, por el proceso que considera inactivación de factores antinutricionales con calor húmedo, acondicionada previamente a un 25 % de humedad y sometida a vapor de 98 ± 2 °C durante seis minutos. Secada luego en estufa con corriente de aire a 45-50 °C (17).

El cómputo químico de la mezcla, trigo: soja (85:15) reveló a la metionina y lisina como sus 1° y 2° aminoácidos limitantes. Se realizó el análisis químico de la mezcla trigo: soja, a fin de establecer el nivel proteico con el cual se trabajaría (Tabla 3).

TABLA 3
COMPOSICION DE LA MEZCLA TRIGO: SOJA (85:15)

Composición Química	g/100 g
Proteína	15,51
Extracto etéreo	4,72
Cenizas	1,42
Fibra	0,34
Humedad	12,90
Extracto libre de nitrógeno	65,11
Total	100,00

La dieta de prueba (Tabla 4) fue ofrecida a los 3 grupos experimentales a los 14 días del destete, momento en el cual cada uno de los grupos fue dividido en 2 subgrupos, los subgrupos A recibieron la dieta de prueba con el agregado de los aminoácidos limitantes de la mezcla trigo: soja y los subgrupos B recibieron la dieta de prueba sin el agregado de los aminoácidos metionina y lisina en potes individuales (no incluidos dentro de la dieta de prueba) permitiendo así la autoselección de los niveles de aminoácidos por parte de los animales normales y de los sometidos a distintos tipos de desnutrición.

TABLA 4
COMPOSICION DE LA DIETA DE PRUEBA
(g/100 g DE DIETA)

	Mezcla trigo: soja	Dieta de Prueba
Lípidos	4,72	5,00 ^a
Proteína	15,51	15,51 ^b
Vitaminas	0,46 ^c	1,10 ^d
Minerales	1,42	5,00 ^e
Dextrina	65,11	73,39 ^f
Total	100,00	100,00

- a Se adicionó aceite comestible de maíz hasta lograr el nivel lipídico de la dieta.
 b No se adiciona ninguna otra proteína
 c Se realiza el cálculo teórico en base a Tablas de Composición de Alimentos.
 d Se adiciona mezcla comercial de vitaminas hidro y liposolubles hasta completar nivel requerido, (NBC).
 e Se agregan hasta el valor de requerimiento utilizando las sales comerciales de Hegsted, por diferencia con el valor obtenido por análisis químico.
 f Se considera en el cálculo realizado los valores previamente determinados de fibra y humedad de la mezcla.

La cantidad de aminoácidos ofrecidos a cada animal fue calculada en base a los requerimientos dados por Rogers y Harper por cada 100 g de dieta (18), a esta cantidad se la duplicó (por posibles pérdidas que se ocasionaran durante la ingesta diaria).

La cantidad de aminoácidos consumidos, se controló diariamente por diferencia de peso; utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Alimento dado} - \text{Alimento volcado} = \text{alimento consumido}$$

reponiéndose diariamente la cantidad en gramos de aminoácidos de acuerdo a los valores calculados por día y por cantidad de dieta ofrecida.

La dieta de prueba se analizó químicamente y se utilizó como tal, sin el agregado de minerales ni de vitaminas; pues se deseaba evaluar su capacidad (suplementada o no con los aminoácidos limitantes) para:

- Mantenimiento y crecimiento de animales normalmente nutridos, y
- la recuperación de animales desnutridos precoz y tardíamente, en forma experimental.

El agua y la comida fue suministrada a todos los animales *ad libitum*.

Los animales fueron pesados cada 7 días, y sacrificados a los 21, 35 y 49 días de edad (previo ayuno de 8 horas). Fueron sometidos a análisis de composición corporal. La humedad se

realizó por secado del carcás en estufa con vacío a 70 °C, determinada por diferencia de peso. La grasa corporal fue determinada sobre el carcás entero, previa molienda del mismo, mediante extracción con solvente por Soxhlet (15).

El contenido de nitrógeno total del carcás, se determinó sobre materia libre de grasa por el método de Kjeldhal (15).

En la expresión de resultados se utilizaron promedios con su desvío estándar.

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza para diseños en bloques al azar (16) y completamente aleatorizados. Se utilizó también el método de correlación, para el análisis de ingesta de aminoácidos (19).

RESULTADOS Y DISCUSION

Cambios en el peso corporal

Período de desnutrición: En la Tabla 5, observamos los cambios en el peso de los animales experimentales.

Los animales del grupo control, alimentados con una dieta con caseinato de calcio continuaron ganando peso hasta el final del período.

TABLA 5
EVOLUCION DEL PESO DE LOS GRUPOS
EXPERIMENTALES
(PERIODO DE DESNUTRICION)

Grupos		Control	D. Tardía	D. Precoz
Edad (días)				
21	X	38,25 ^{ab}	38,25 ^{ab}	25,57 ^b
	DE	2,58	2,58	2,81
28	X	43,20 ^b	31,04 ^b	23,20 ^b
	DE	2,57	0,73	1,59
35	X	65,10 ^b	28,40 ^b	20,40 ^b
	DE	7,73	0,92	2,18

a No significativo (N.S.)

b p<0,01

El grupo con DT comenzó a perder peso a partir del momento en el cual fue sometido a una dieta libre de proteína. Durante la primera semana perdió en promedio un 18,85 % y en la segunda semana sólo un 8,15 % de su peso.

El grupo con DP al destete presentó un 33,16 % menos de peso con respecto a los otros dos grupos (C y DT), siendo esta pérdida altamente significativa (p<0,01).

La pérdida de peso en los animales con DT sometidos a una dieta libre de proteína, fue más rápida durante la primer semana que en los animales con DP, lo que nos hablaría de que en estos últimos los mecanismos de adaptación fisiológica

estarían en funcionamiento más temprana y efectivamente; pero a partir de la segunda semana, la pérdida de peso se hace mayor en el grupo DP con respecto al grupo DT coincidiendo la misma con una pérdida de peso del 68,66 %, comparada con los animales del grupo C a la misma edad.

El análisis de varianza mostró que los cambios de peso entre los animales de los tres grupos experimentales fueron altamente significativos (p<0,01).

Período de recuperación: En la Tabla 6 observamos los cambios en el peso ocurridos durante las dos semanas de realimentación con la dieta de prueba con y sin la suplementación de los aminoácidos limitantes.

TABLA 6
EVOLUCION DEL PESO DE LOS GRUPOS
EXPERIMENTALES
(PERÍODO DE RECUPERACION)

Grupo		Edad (días)		
		35	42	49
Control	X	65,10 ^b	A 99,25 ^{bc}	A 118,23 ^{ab}
	DE	7,73	5,33	3,22
	X		B 92,70 ^{bc}	B 119,70 ^{ab}
	DE		8,06	0,52
D. Tardía	X	28,40 ^b	A 49,40 ^{bc}	A 48,58 ^{bc}
	DE	0,92	5,77	4,85
	X		B 38,50 ^{bc}	B 60,20 ^{ab}
	DE		1,68	4,25
D. Precoz	X	20,40 ^b	A 37,40 ^{ab}	A 57,50 ^{bc}
	DE	2,18	3,86	4,50
	X		B 35,20 ^{ab}	B 53,40 ^{bc}
	DE		2,76	4,36

A Suplementada con los aminoácidos limitantes

B No suplementada con los aminoácidos limitantes

a No significativo (N.S.)

b,c p<0,001

En la primera semana los grupos con suplementación de aminoácidos aumentaron su peso en mayor medida que los no suplementados (C:52,45 %; DT: 73,90 %; DP: 83,33 % vs grupos no suplementados C: 42,00 %; DT: 35,56 %; DP: 72,54 %).

En la segunda semana sin embargo se observó que:

- Los animales del grupo C (con suplementación) aumentaron de peso (19,00 %) en menor medida que el grupo no suplementado (29,00 %); estos cambios podrían explicarse por las variaciones que presentaron estos animales en su ingesta de alimentos (Tabla 7).

TABLEA 7
INGESTA DE ALIMENTOS DE LOS GRUPOS
EXPERIMENTALES
(g DE ALIMENTOS CONSUMIDOS/ 7 DIAS)

Grupo	Días	Alimentos consumidos (g/ 7 días)			
		28	35	42	49
Control	X	43,50 ^a	55,00 ^a	A 77,96 ^b	A 73,24 ^a
	DE	2,25	0,00	2,50	1,20
	X			B 77,74	B 81,50
	DE			5,00	0,50
D. Tardía	X	33,60a	35,00a	A 80,00b	A 65,87a
	DE	2,21	1,82	0,22	1,32
	X			B 80,00 ^b	B 98,50 ^a
	DE			1,15	1,00
D. Precoz	X	20,30a	32,60a	A 55,37a	A 65,40a
	DE	3,01	2,55	4,00	3,21
	X			B 61,43 ^a	B 70,00 ^a
	DE			5,82	2,15

a $p < 0,01$

b No significativa (N.S.)

A Suplementada con los aminoácidos limitantes

B Sin la suplementación de los aminoácidos limitantes

Una explicación a esto podría ser que consumieron mayor cantidad de alimento para compensar el déficit de los aminoácidos limitantes, lo que los condujo a su vez a un aumento de peso superior al grupo suplementado.

- El grupo DT (con suplementación), sufrió una pérdida de peso (2,00 %) durante la última semana, coincidiendo esto con una disminución en la cantidad de alimento ingerido (18,00 %); mientras los no suplementados aumentaron su peso, incluso en una proporción más alta que al comienzo de su realimentación; siendo su ingesta de alimentos mayor que la de los animales control de la misma edad.
- Los animales con DP suplementados y no suplementados, continuaron su aumento de peso en menor proporción que durante la primer semana, siendo mayor el aumento de peso en el grupo que recibió los aminoácidos, a pesar de que su ingesta de alimentos fue menor que la observada en el grupo sin suplementación.

El análisis de varianza mostró que los cambios de peso ocurridos en este períodos fueron altamente significativos entre grupos ($p < 0,01$) y dentro de grupos para todos los animales experimentales excepto para los grupos desnutridos precozmente a los 42 días y para el grupo control a los 49 días.

Ingesta de alimentos

Período de desnutrición: En la Tabla 7 se observa la ingesta de alimentos de los grupos experimentales, expresada como g de alimentos consumidos/7 días. El grupo C (alimentado con una dieta con caseinato de calcio) aumentó su ingesta de alimentos durante los primeros 14 días mientras los grupos DT y DP (alimentados con una dieta Libre de proteína) disminuyeron su ingesta siendo más severa en este último. El análisis de varianza mostró que los cambios en la ingesta de alimentos expresada en g/7 días entre los grupos fueron altamente significativas ($p < 0,01$).

Período de recuperación: Durante la primer semana se observó un aumento de la ingesta en todos los grupos experimentales; si comparamos las ingestas de alimento de los grupos con los aumentos de peso de los animales (Tabla 6) observamos que los grupos que recibieron suplementación, a pesar de consumir similares cantidades de dieta aumentaron de peso en mayor medida que los no suplementados.

En la segunda semana la ingesta de alimentos de todos los grupos con suplementación se reduce, ocasionando esto:

- Un escaso aumento de peso en el grupo C, una pérdida de peso del 2,00 % en el grupo DT y en los animales del grupo DP una reducción cercana a un 30,00 % en el aumento de peso, comparado este con la primer semana de realimentación.

En los animales no suplementados y en todos los grupos, la cantidad de alimento consumido aumentó, conduciendo esto a un incremento del peso corporal.

Cabe destacar que la excepción es el grupo DP (con suplementación) quien a pesar de que proporcionalmente disminuyó su aumento de peso, este fue mayor que en el mismo grupo sin suplementación. Los cambios de ingesta de alimentos dentro de los grupos y entre grupos fueron altamente significativos ($p < 0,001$).

Si comparamos la ingesta de alimentos como gramos consumidos/100 gramos de rata (Tabla 8) observamos que en el grupo control a medida que aumentó la edad del animal disminuyó la ingesta de gramos de alimentos consumidos/100 g rata.

En el caso de los animales desnutridos (DP y DT) la misma tendencia fue observada (siendo más alta que en el grupo C, y mayor aún en los no suplementados).

Esto quizás nos indicaría que la eficiencia con la cual el alimento es utilizado este disminuida, es decir que necesitaría consumir mayor cantidad a fin de satisfacer sus requerimientos, parecería que la suplementación permite aumentar la eficiencia de la mezcla tanto en animales normales como en los desnutridos; lo que justificaría entonces la suplementación de la misma.

El análisis de varianza reveló que los cambios en la ingesta de alimentos/100 g de rata entre y dentro de grupos fueron altamente significativos ($p < 0,01$).

Ingesta de aminoácidos

En la Tabla 9 observamos la ingesta de aminoácidos expresada como gramos de aminoácidos consumidos/100 gramos de mezcla trigo: soja.

TABLA 8
INGESTA DE ALIMENTOS DE LOS GRUPOS
EXPERIMENTALES
(g DE ALIMENTOS CONSUMIDOS/100 g DE RATA)

Grupo	Días	Alimentos consumidos (g/ 7 días)			
		28	35	42	49
Control	X	100,69a	84,48 ^a	A 78,55 ^a	A 61,95 ^a
	DE	0,87	0,00	0,47	0,37
	X			B 83,86 ^a	B 68,09 ^a
	DE			0,62	0,96
D. Tardía	X	81,87a	123,24a	A 161,94b	A 135,59a
	DE	3,02	1,98	0,04	0,27
	X			B 207,79 ^a	B 163,62 ^a
	DE			0,68	0,23
D. Precoz	X	88,26a	159,80a	A 148,05a	A 113,74a
	DE	1,89	1,17	1,06	0,71
	X			B 174,52 ^a	B 131,09 ^a
	DE			2,11	0,49

a p<0,01

A Suplementada con los aminoácidos limitantes

B Sin la suplementación de los aminoácidos limitantes

TABLA 9
INGESTA DE AMINOACIDOS DE LOS GRUPOS
EXPERIMENTALES

Grupo	Días	g de aminoácidos consumidos/100 g de mezcla trigo: soja			
		42 Días		49 Días	
		Metionina	Lisina	Metionina	Lisina
Control	X	1,60 ^a	2,64 ^a	2,73 ^a	3,97 ^a
	DE	0,20	0,51	0,32	0,22
D. Tardía	X	1,32a	1,38a	1,10a	3,24a
	DE	0,30	0,01	0,91	0,22
D. Precoz	X	1,02 ^a	2,31 ^a	3,31 ^a	4,89 ^a
	DE	0,91	0,92	0,94	1,01

a p<0,01

Período de desnutrición: En el grupo C y DP se observó una aumentada ingesta de metionina y lisina, superior a los valores

expresados como requerimientos por Rogers y Harper (18) siendo mayor en magnitud en el grupo C.

En el grupo DT la ingesta de metionina aumentó, pero la de lisina se mantuvo inferior a los valores de requerimiento. En animales experimentales la deficiencia proteica ocasionaría una depresión de las concentraciones de aminoácidos esenciales y no esenciales, y entre los aminoácidos esenciales la metionina y los aminoácidos de cadena ramificada fueron los más afectados, mientras que el nivel de lisina fue bien mantenido (24).

Período de recuperación: Los animales del grupo C aumentaron aún más su ingesta de metionina y lisina lo cual fue coincidente con una disminución de la ingesta de la dieta de prueba y con una consecuente merma en su aumento de peso; pero al referirnos a su composición corporal (Tabla 11) observamos que la cantidad de nitrógeno fue similar al grupo no suplementado y el contenido de grasa corporal fue mayor que éste, a pesar de que los no suplementados consumieron mayor cantidad de dieta.

Posiblemente esto se explicaría porque parte de los aminoácidos libres experimenta reacciones catabólicas; conduciendo ello a la pérdida del esqueleto carbonado en forma de CO₂ o queda a su disposición como glucógeno y grasa (25).

El aumento de la ingesta en los animales del grupo control, podrían ser coincidentes con su período de máximo desarrollo. Los animales con DT continuaron con una ingesta de aminoácidos por encima de los valores de requerimiento, y en el grupo DP la ingesta de aminoácidos aumentó con respecto al período anterior y al resto de los grupos; esta ingesta aumentada podría explicarse por las diferencias de concentración de aminoácidos esenciales libres en el organismo vs. los aminoácidos esenciales necesarios para el crecimiento de la rata, esto demostraría que tiene que superarse varias veces al día el depósito de aminoácidos libres mediante el aporte de aminoácidos procedentes de la dieta (25).

El estrés psicológico intenso produce un incremento de la eliminación de nitrógeno siendo la metionina el precursor en la formación de adrenalina (25) lo que en parte explicaría quizás el aumento en la ingesta de este aminoácido; también los animales incrementan sus necesidades de aminoácidos esenciales 2 ó 3 veces más en condiciones de agotamiento, fenómeno que es similar al del animal en desarrollo (25).

El análisis de varianza reveló que las diferencias fueron altamente significativas (p<0,01) cuando los valores fueron expresados como g de aminoácidos consumidos/100 g de mezcla trigo: soja, entre grupos y para ambos períodos.

Según se aprecia en los Gráficos 1, 2 y 3 los gramos de metionina consumida/100 grs de mezcla trigo: soja, guardan relación directamente proporcional a la ingesta de lisina/100 g de dicha mezcla; o sea que entre ambas ingestas existe una correlación positiva $r=0,816$ para el grupo control, $r=0,789$ para el grupo con DT y altamente significativa para el DP ($r=0,996$). Por lo tanto se podría concluir que a mayor ingesta de metionina, aumentaría la ingesta de lisina.

COMPOSICION CORPORAL

Contenido de agua del carcás

Período de desnutrición: El contenido de agua del carcás de los animales de los tres grupos experimentales comenzó a disminuir a partir del destete y hasta el final del período. El análisis de varianza mostró que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos con respecto al contenido de agua corporal (Tabla 10).

Período de recuperación: Se observó que el agua corporal continuó disminuyendo en ambos grupos C en similar magnitud; aumentó en ambos grupos con DT y se mantuvo en valores similares al período anterior en los animales con DP. El análisis de varianza no mostró diferencias estadísticamente significativas entre y dentro de grupos.

Contenido de nitrógeno del carcás

Período de desnutrición: En la Tabla 11 observamos que el contenido de nitrógeno del grupo con DP, al destete fue significativamente ($p < 0,05$) inferior a los grupos C y con DT.

TABLA 10
CONTENIDO DE AGUA CORPORAL DE LOS TRES GRUPOS EXPERIMENTALES DURANTE EL ESTUDIO

Grupos	Edad	Agua corporal g/100 g de rata		
		21 días	35 días	49 días
Control	X	78,89 ± 2,29 ^a	X 71,18 ± 0,61 ^a	A X 69,19 ± 1,07 ^b
			B X 68,91 ± 1,34 ^c	
D. Tardía	X	73,89 ± 2,29 ^a	X 70,64 ± 0,53 ^a	A X 71,57 ± 0,89 ^b
			B X 72,72 ± 0,57 ^c	
D. Precoz	X	78,34 ± 0,34 ^a	X 71,19 ± 1,92 ^a	A X 71,03 ± 0,69 ^b
				B X 70,98 ± 1,04 ^c

A / Suplementada con los aminoácidos limitantes
 B Sin la suplementación de los aminoácidos limitantes
 a,b,c, No significativo (n.s.)

GRAFICO 1

Relación entre la ingesta de lisina y los niveles de ingesta de metionina Grupo control

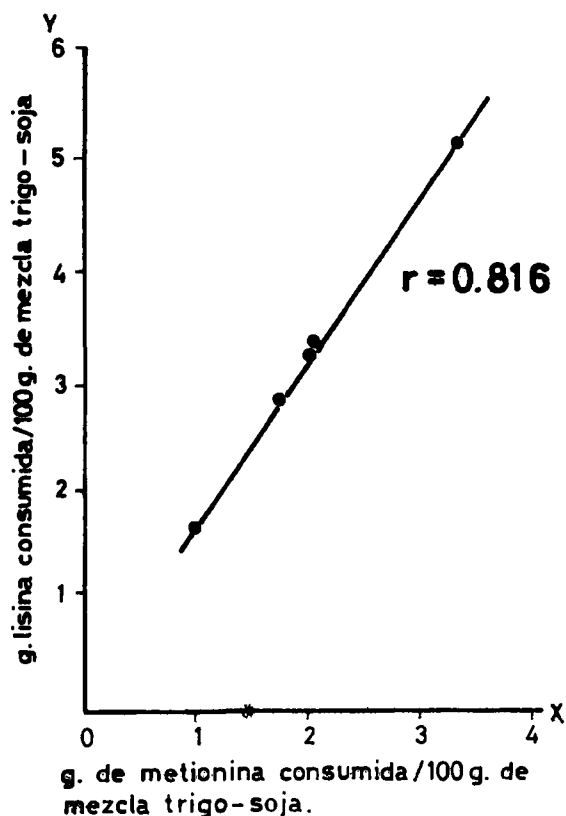


GRAFICO 2

Relación entre la ingesta de lisina y los niveles de ingesta de metionina Grupo con desnutrición tardía

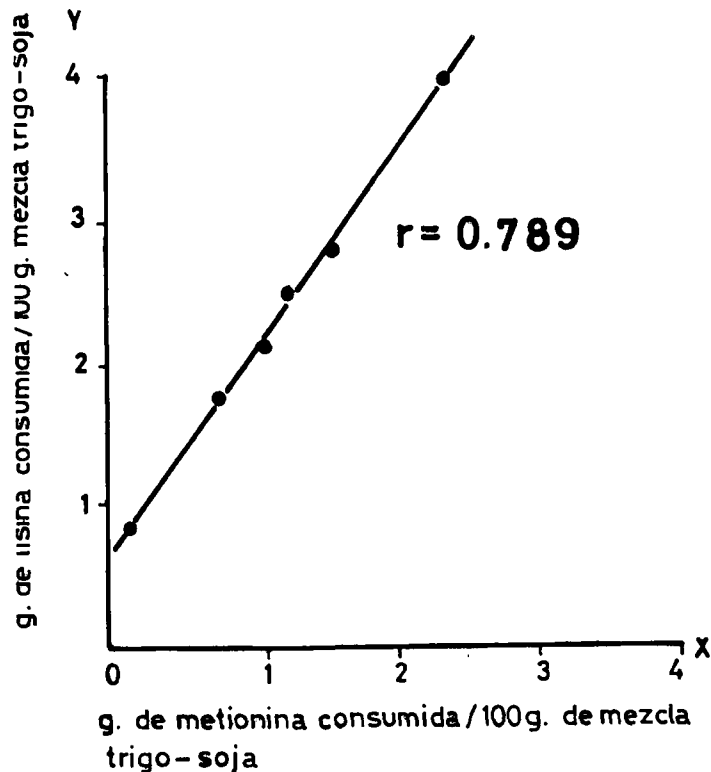


GRAFICO 3
Relación entre la ingesta de lisina y los niveles de ingesta de metionina Grupo desnutrido precoz
DESNUTRIDO PRECOZ

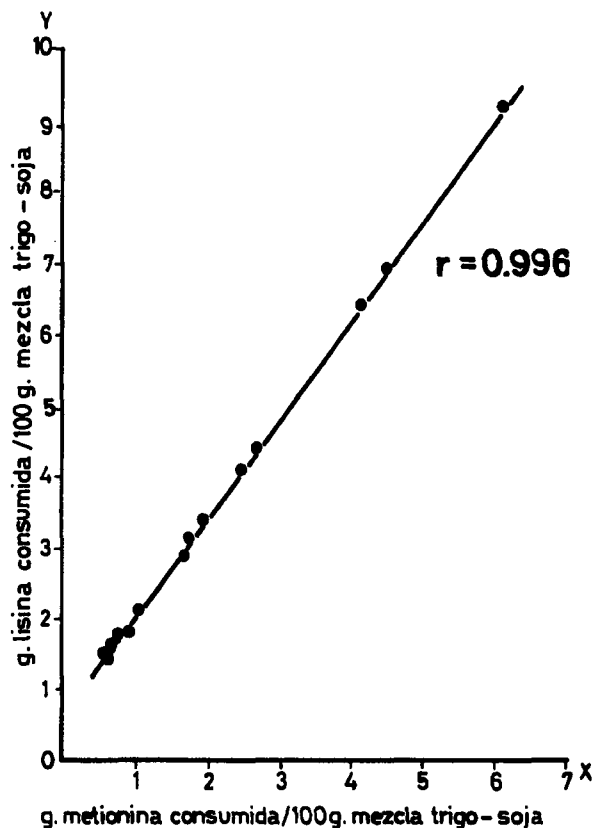


TABLA 11
CONTENIDO DE NITROGENO CORPORAL DE LOS TRES GRUPOS EXPERIMENTALES DURANTE EL ESTUDIO

Grupos	Edad	Nitrógeno corporal g/100 g de rata		
		21 días	35 días	49 días
Control	X	14,06 ± 0,63 ^{ab}	X 13,13 ± 0,63 ^{ac}	A X 15,58 ± 0,49 ^a
				B X 15,44 ± 0,47 ^a
D. Tardía	X	14,06 ± 0,63 ^{ab}	X 12,76 ± 0,57 ^{ac}	A X 13,56 ± 0,51 ^c
				B X 10,97 ± 2,59 ^c
D. Precoz	X	12,24 ± 0,47 ^b	X 8,69 ± 2,51 ^c	A X 13,43 ± 0,47 ^a
				B X 12,29 ± 3,78 ^a

- A Suplementada con los aminoácidos limitantes
- B Sin la suplementación de los aminoácidos limitantes
- a No significativo (n.s)
- b p<0.05
- c p<0.01

A partir de ese momento el contenido de nitrógeno no tuvo cambios significativos en los animales control y DT, mientras fueron severos en el grupo DP. El mantenimiento del nitrógeno

en los animales con desnutrición tardía sería debido a una utilización de las grasas como fuente energética, no debiendo por lo tanto recurrir a las reservas de proteínas corporales. La disminución drástica de nitrógeno corporal que sufrió el grupo DP sería debido a que el mismo ya utilizaría el nitrógeno corporal con fines energéticos, conduciendo esto a una marcada depleción de proteínas corporales.

El análisis de varianza mostró que hubo diferencias significativas (p<0,05) y altamente significativas (p<0,01) entre los grupos.

Período de recuperación : Durante este período los animales de los tres grupos experimentales, aumentaron su contenido de nitrógeno corporal, este fue altamente significativo (p<0,01) en el grupo con desnutrición precoz alimentado con la dieta de prueba con y sin el agregado de aminoácidos con respecto al contenido de nitrógeno corporal antes de su realimentación. En el grupo suplementado, lo haría posiblemente a expensas del aumento de ingesta de los aminoácidos limitantes de la mezcla, mientras en el no suplementado, a pesar de existir un aumento en la ingesta de alimentos, el nitrógeno no alcanzó los niveles del grupo suplementado, ni los animales aumentaron de peso en igual medida. Como se sabe el crecimiento normal es un proceso integrado en el cual un delicado balance es mantenido entre todos los tejidos, este aumento normal expresado en términos de crecimiento corporal, sigue patrones matemáticos definidos y puede ser bien relacionado con un aumento de la proteína corporal. Los factores dietéticos que influyen el crecimiento de los animales son: la ingesta calórica, la concentración de la proteína en la dieta y la eficiencia con la cual la proteína es utilizada; lo cual está aplicado a animales que no presenten patologías (26).

En los grupos con DT, los animales que recibieron su dieta suplementada de aminoácidos, tuvieron un incremento en su contenido de nitrógeno, mayor que en los no suplementados, siendo este aumento altamente significativo (p<0,01).

El análisis de varianza mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el contenido de nitrógeno corporal dentro de ambos grupos C y con DP, mientras que si existió diferencias altamente significativas (p<0.01) dentro de los grupos con DT.

La depleción proteico-calórica sería de esta manera un fuerte estímulo para la secreción de hormona de crecimiento, lo que aseguraría una eficiente retención de nitrógeno y un crecimiento adecuado cuando las calorías y proteínas se volvieran disponibles (27).

Contenido de grasa corporal

Período de desnutrición: En la Tabla 12 observamos que al destete (21 días) el grupo con DP presentó un contenido de grasa corporal un 53,99 % menor que los otros dos grupos experimentales.

TABLA 12
CONTENIDO DE GRASA CORPORAL DE LOS TRES
GRUPOS EXPERIMENTALES DURANTE EL ESTUDIO

Grupos	Edad	grasa corporal g/100 g de rata		
		21 días	35 días	49 días
Control	X	22,15 ± 1,67 ^a	X 19,50 ± 2,48 ^a	A X 31,88 ± 3,39 ^{ab} B X 29,10 ± 4,83 ^{ab}
D. Tardía	X	22,15 ± 1,67 ^a	X 15,64 ± 3,20 ^a	A X 21,50 ± 2,00 ^{ab} B X 18,41 ± 3,40 ^{ab}
D. Precoz	X	11,96 ± 1,14 ^a	X 9,91 ± 2,45 ^a	A X 28,43 ± 1,70 ^{ac} B X 28,77 ± 3,73 ^{ac}

A Suplementada con los aminoácidos limitantes

B Sin la suplementación de los aminoácidos limitantes

ab p<0,01

c No significativo (n.s)

En la desnutrición crónica los ajustes metabólicos están destinados a proteger las reservas proteicas, puesto que una pérdida del 50 % de las proteínas corporales es incompatible con la vida (28).

A partir del destete y hasta los 35 días de vida la grasa corporal de los tres grupos disminuyó, pero en magnitud esta disminución fue más severa en el grupo con DT; lo que posiblemente sería debido a un acentuamiento del catabolismo proteico, con un incremento de la degradación de lípidos para el suministro de energía (28).

El análisis de varianza reveló diferencias altamente significativas (p<0,01) entre grupos y entre ambos períodos.

Período de recuperación: Se observó un aumento del contenido de grasa corporal en los grupos C y DT, siendo mayor este en los animales que recibieron suplementación con los aminoácidos limitantes de la mezcla; mientras ambos grupos DP aumentaron su contenido de grasa en idéntica magnitud. Cuando se suministra una dieta completa la síntesis de proteínas permite la formación de nuevos tejidos, que reemplazan los tejidos viejos; pero si la ingesta es excesiva (superior al gasto energético) se sintetizan ácidos grasos que el organismo almacena como triglicéridos en el tejido adiposo (28).

El análisis de varianza reveló que los cambios en el contenido de grasa corporal entre grupos fue altamente significativo (p<0,01) para todos los animales experimentales y dentro de grupos fue altamente significativo (p<0,01) para los grupos C y con DT, mientras que no se observó diferencias estadísticamente significativas para el grupo DP.

En los animales con una depleción proteica crónica se observó un retardo generalizado del crecimiento y del desarrollo, y a pesar de que recuperaron proporcionalmente su composición corporal, en mayor medida que el grupo con DT y con respecto al grupo C, el grupo DP nunca alcanzó una recuperación total.

REFERENCIAS

- Bressani R. Calidad proteínica de la soja y su efectividad suplementaria. Conferencia Latinoamericana sobre la Soja, México, pp.113. 1975.
- Belshaw F. Bread 30-40 % more protein same cost. Food Processing, 32 (5):24-25. 1971.
- Araya J., M. Ruz, P. Saldaño y E. Romero. Determinación de los requerimientos y de la eficiencia en la utilización de la energía y proteínas en la dieta, durante la recuperación de la desnutrición en ratas. Autoselección de energía y proteína. Archivos Latinoamer Nutr, 29 (3): 353-72, Septiembre de 1979.
- Blanco A. y R. Bressani. Biodisponibilidad de aminoácidos en el frijol (*Phaseolus vulgaris*). Archivos Latinoamer Nutr, 61 (1):39-52, Marzo 1991.
- Wagner J.E., W. Yamanaka, J.J. Typpo et al. Pathological changes as associated with dietary protein deficiency in pigs. Archivos Latinoamer Nutr, 27 (1):17-29, Mayo 1977.
- Enwonwu, C.O. and L.M. Sreebny. Experimental protein calorie malnutrition. Biochemical and ultrastructural studies. Experimental and Molecular Pathology, 12:332-53, 1970.
- Bressani R., L. Urrutia del Valle y L.C. Elías. Relación entre el nitrógeno retenido por ratas, determinado por análisis corporal de nitrógeno y por medio de balance nitrogenado. Archivos Latinoamer Nutr, 26 (4):426-45, Diciembre 1976.
- De Angelis R.C., N.A. Saad, N. Takahashi et al. The recovery of rats from protein deficiency by proteins from different sources. Archivos Latinoamer Nutr, 24 (4):433-41, Diciembre 1974.
- Angeleli A.J., Burini R.C. and Campana A.O. Body collagen nitrogen in protein deficient adult rats. Journal nutrition, 10(7):1147-54. 1973.
- Elías L.C., R. Bressani y J.A. Del Busto. Evaluación de la calidad de proteínas de alimentos de bajo contenido proteínico. Archivos Latinoamer Nutr, 24 (1):95, Marzo 1974.
- Jaspers H. and J. Brasel. Rat liver DNA synthesis during the «Catch Up» growth of varied nutritional rehabilitation. Journal Nutrition 110 (12):2336-40. 1980.
- Lunn P.G., R.G. Whitehead, J. Cole and S. Austin. The relationship between hormonal balance and growth in malnourished children and rats. J. Nutr, 41(3):73-74. 1979.
- Celedon J.M., M. Santander and M. Colombo. Long term effects of early under nutrition and environmental development on learning performance in adults rats. Journal Nutrition, 109 (11):1330-36. 1979.
- Farina R., M.E. Ríos y J.C. Sanahuja. Bases experimentales para el desarrollo de un método rápido de evaluación de mezclas proteicas. Archivos Latinoamer Nutr, 24 (1):63-67. Marzo 1974.
- Association of Official Agricultural Chemist. Official Methods of Analysis of the AOAC 12th ed. Washington D.C. The Association, 1975.
- Guenther W.C. Analysis of Variance. London. Prentice Hall Inc. pp 66-67. 1964.
- Gómez M.H., M. Armada y J.R. Corimayo. Selección de parámetros para tratamiento térmico en soja mediante inactivación de enzimas. Archivos Latinoamer Nutr, 35 (1):163-171. Marzo 1985.

18. Rogers y A.E. Harper. Amino acid diet and maximal growth in the rat. *J. Nutr.* 87:267-273. 1965.
19. Snedecor W.G. and W.C. Cochran. *Statistical Methods* 6° ed. Iowa. The Iowa State University Press, 1967.
20. Miller D.S. and P.R. Payne. A theory of protein metabolism. *J. Theoret. Biol.* 5:398-411. 1963.
21. Epstein H.T. The effect of litter size on weight gain in mice. *J. Nutr.* 108 (1):120-123. 1978.
22. Código Alimentario Argentino. Actualizado. Ing. Juan José de La Canal. Impreso en Argentina, 1980.
23. Hegsted D.M., R.C. Miller, C.A. Elvehjem and E.B. Hart. *J. Biol Chem* 138-459. 1941.
24. Enwonwu C.O. and L.M. Sreebny. Experimental protein-calorie malnutrition. Biochemical and ultrastructural studies. *Exp. and Mol. Path* 12:332-353. 1970.
25. Goodhart R.S. and M.E. Shills. La nutrición en la salud y la enfermedad. *Conocimientos actuales.* Editorial Salvat S.A. pp.51. Mallorca 41, Barcelona. 1987.
26. Miller D.S. and P.R. Payne. A theory of protein metabolism. *J. Theoret Biol.* 5:398-411. 1963.
27. Hansen J.D.L., C. Freese, A.D. Moodie et al. What does nutritional growth imply? *Pediatrics* 47 (1) Part II: 229-313. 1971.
28. Campos R., R. Rodrigo y M. Bravo. Regulación metabólica de la nutrición. *Arch. Latinoamer Nutr.* 29 (2):167-181. Junio 1979.

Recibido: 12-09-1994

Aceptado: 07-04-1995

Caracterização química da polpa e do óleo do marolo (*Annona coriaceae*)

Tânia da S. Agostini¹, Heloisa M. Cecchi², y Daniel Barrera-Arellano³

Laboratório de Oleos e Gorduras. Fac. de Eng. de Alimentos (FEA) Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
Campinas-SP- Brasil.

RESUMO. O marolo (*Annona coriaceae*) é uma espécie pertencente à família *Annonaceae*, cuja distribuição na América do Sul acompanha a zona tropical, sendo nativo em regiões do cerrado brasileiro (Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal). Apesar da tendência de extinção, em função de desmatamentos e da substituição dos pés por culturas de grande extensão de terra, as frutas são bastante consumidas pela população local e comercializadas em feiras e beiras de estrada. Entretanto a literatura ainda não oferece nenhum dado da composição química destas frutas. Neste sentido foi feita a determinação da composição centesimal e do teor de vitamina C, vitamina A, e taninos na polpa do marolo amarelo, além da determinação das características físico-químicas do óleo das sementes. As determinações foram feitas em 5 lotes de frutas provenientes da região de Alfenas, sul de Minas Gerais (safra de 1992). Encontrou-se uma composição média de 77% de umidade, 13% de açúcares totais e 11% de açúcares redutores, 1% de proteína bruta, 3% de lipídeos, 5% de fibra e 1% de resíduos mineral fixo. Os teores de vitamina C e A foram 8,2 mg/100g e 117,5 RE/100g, respectivamente e o teor de tanino foi 245 mg/100g. O marolo apresentou, portanto, teores elevados em fibras e lipídeos quando comparados com a maioria das polpas de outras frutas. O teor de vitamina C foi equivalente aos encontrados em abacate, abacaxi e melancia, e o valor de vitamina A equivalente aos encontrados em mamão, pêssego, goiaba e várias outras frutas tropicais. A semente contém 45% de óleo em base seca. A composição e as características físico-químicas mostram que é possível produzir um óleo de boa qualidade, com grande potencial para o mercado de óleos finos, mas a presença de alcalóides precisa ser melhor estudada. A eliminação destes compostos poderia ser experimentada pelo refino ou extração com prensas contínuas. Os resultados valorizam a boa qualidade devendo estimular a preservação e até o cultivo da espécie.

SUMMARY. Chemical characterization of the oil and pulp of marolo (*Annona coriaceae*). Belonging to the *Annonaceae* family, marolo (*Annona coriaceae*) is a native species of the Brazilian «cerrado» region (Minas Gerais, Goiás and Distrito Federal) and can be found in South American tropical zones. Its fruits are highly consumed by local people and commercialized in markets or street stalls. There is, however, a tendency for the extinction of marolo due to deforestation and the large scale plantation of monocultures instead of native plants. The literature still offers no data on the chemical composition of the proximate composition and vitamin C, A and tannin contents were carried out on the yellow marolo pulp as well as the determination of the physico-chemical characteristics of the seed oil. Five batches of fruit from the Alfenas region -south of Minas Gerais State- were analysed in this work and their average composition were: humidity 77%, total sugar 15%, reducing sugar 11%, crude protein 1%, lipids 3%, fiber 5% and fixed mineral residue 1%. The contents of vitamin C and A were 8.2 mg/100g and 117.5 RE/100g, respectively, and the tannin content was 245 mg/100 g. The results showed high fiber and lipid contents of marolo pulp in comparison with many other tropical fruit pulps. The vitamin C contents were equivalent to those found in avocado, pineapple and watermelon, while the vitamin A contents were equivalent to papaya, peach, guava and several other tropical fruits. Marolo seed contains 45% of oil on a dry basis. Its composition and physico-chemical characteristics showed the possibility of producing a good quality oil, with great potential for the fine oil market. However the presence of alkaloids in the oil needs to be further studied. Their elimination could be done by refining or extraction in a continuous press. The results exalt the high quality of marolo pulp, showing that the preservation of native species should be stimulated.

1 Aluna de Pós graduação - doutoramento em Ciências de Alimentos

2 Profa. Doutora Dep. de Ciências de Alimentos-FEA/UNICAMP.

3 Prof. Doutor Dep. de Tecnologia de Alimentos-FEA/UNICAMP.

INTRODUÇÃO

O marolo é uma espécie pertencente à família *Annonaceae* que possui cerca de 56 gêneros, sendo 12 deles representados no Brasil. Sua distribuição acompanha a zona tropical. Entre os gêneros encontrados na América do Sul, a *Annona* é representada por algumas espécies frutíferas, como *A. reticulata*, *A. classiflora* (pinha, araticum liso), *A. coriaceae* (marolo) (1). O fruto é de infrutescência baciforme, mágnio, edulo com muitas sementes obovóides, achatadas como 20 a 27 mm de comprimento por 10 a 13 mm de largura de cor parda. A polpa é amarelada, de cheiro forte, e de sabor muito acentuado. Floresce de dezembro a janeiro e frutifica de março a abril (1). Almeida et al (2) argumentam que, embora a planta apresente baixa produção de frutas, estas podem pesar em média até 2 kg com rendimento de polpa em torno de 50%.

No Brasil, o marolo ocorre em áreas do cerrado (Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal). Existem três variedades popularmente conhecidas como marolo vermelho, amarelo e branco, que provavelmente estão relacionadas com a composição e o teor de carotenóides. O vermelho encontra-se em extinção no sul do Estado de Minas Gerais, apesar de ser conhecido como a mais saboroso. As frutas são consumidos ao natural pela população local e comercializados em feiras e beiras de estrada. É usado também no preparo de sorvetes, refrescos, doces, geléias e licores. No entanto, verifica-se uma queda acentuada na colheita e no consumo destas frutas devido à substituição dos pés, que são nativos, por culturas de grande extensão de terra.

A água é o componente mais abundante das frutas, podendo chegar a representar até 96% do seu peso total. A maior parte do extrato seco das frutas é composto por carboidratos juntamente com quantidades menores de proteínas e gorduras (3). Existem também, ainda que em menores quantidades, outros compostos orgânicos e uma ampla gama de elementos minerais procedentes do solo. Muitos destes componentes minoritários podem desempenhar um papel de máxima importância sobre as propriedades das frutas (cor, sabor, valor nutritivo) e, em alguns casos, sobre a textura (4). A procura de óleos e gorduras com alta qualidade para fins alimentícios tem sido cada vez maior. Geralmente são muito aromáticos e de excelente paladar. Considerando a composição em ácidos graxos, os monoinsaturados despertam um interesse crescente no desenvolvimento de produtos onde a estabilidade oxidativa e o valor nutricional são preocupações constantes (5).

O meio científico pode e deve colaborar no sentido de determinar e avaliar a qualidade nutricional, tecnológica, agrícola e econômica, estimulando a preservação e, quem sabe, até o cultivo destas espécies. Neste sentido, este trabalho pretendeu fazer alguns estudos preliminares para ajudar a esclarecer a composição e o potencial de utilização do marolo (6). O objetivo é a determinação da composição centesimal, do teor de vitamina C, de vitamina A e tanino na polpa e um

estudo da composição e das características físico-químicas do óleo das sementes de marolo.

MATERIAL E METODOS

Amostragem e preparo das amostras: As sementes (safra de 1991) e as frutas (safra de 1992) de marolo amarelo, *Annona coriaceae*, foram colhidas na região de Alfenas, sul de Minas Gerais. As frutas *in natura* foram obtidas em feiras livres e mercados locais. As sementes foram obtidas em confeitarias e sorveterias onde, após o aproveitamento da polpa, são descartadas. A amostragem foi feita de maneira aleatória nos pontos de venda, em quantidades variáveis.

As amostras de polpa *in natura* foram analisadas em 5 lotes, sendo cada lote composto por quatro frutas maduras e bem formadas. A polpa (constituindo até 50% da fruta) foi separada manualmente das sementes (cerca de 15%) e da casca e, em seguida, homogeneizada em multiprocessador. Deste homogeneizado foram retiradas as quantidades necessárias para as várias análises químicas, feitas em duplicata. Aproximadamente 2 kg de sementes de marolo foram utilizadas no extração do óleo em escala semi-piloto (Fig. 1). Após a separação manual da amêndoa foi feita uma secagem em estufa a vácuo, seguida de moagem. A extração do óleo foi feita com hexano e a remoção do solvente por evaporação a vácuo.

Análises químicas de polpa do marolo (*Annona coriaceae*):

- **pH**
Determinação direta em pHmetro, segundo a A.O.A.C. 981.12 (7).
- **Brix**
Método refratométrico segundo a A.O.A.C. 932.12 (7)
- **Umidade**
Determinação em estufa à 105 °C até peso constante, segundo a A.O.A.C. 920.151 (7).
- **Açúcares redutores e totais**
Método volumétrico geral de Lane-Eynon, segundo A.O.A.C. 31.035 (8).
- **Proteína bruta**
Determinação pelo método de Kjeldahl, segundo a A.O.A.C. 920.152 (7).
- **Extrato etéreo**
Determinação pelo método de Gold-Fish, segundo a A.O.A.C. 7.056 (8).
- **Fibra por detergente neutro (FDN)**
Determinação direta em mufla a 525 °C, segundo a A.O.A.C. 940.26 (7).
- **Vitamina C**
Determinação pelo método titulométrico como o 2,6-Diclorofenolindofenol, segundo a A.O.A.C. 967.21 (7)
- **Tanino**
Determinação pelo método espectrofotométrico com o reagente de Folin-Denis, segundo a A.O.A.C. 952.03 (7).

Vitamina A

O valor de vitamina A foi calculado a partir da atividade pró-vitáminica de cada carotenóide precursor, tabelada por Bauernfeind (10). Para os isômeros cis do β-caroteno foram utilizados os valores de biopotência obtidos por Deuel (11, 12) e Sweeney e Marsh (13). Os valores foram expressos em Retinol Equivalente por 100 gramas (RE/100g).

Caracterização do óleo

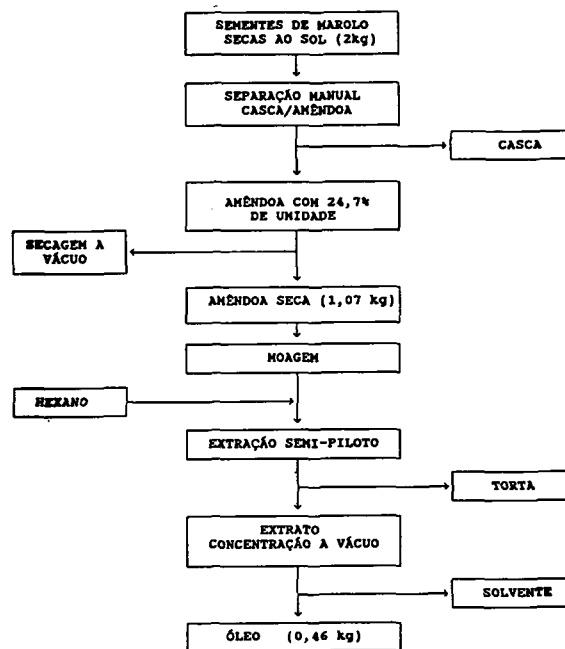
- Determinação das características físicas e químicas do óleo da semente, segundo métodos da A.O.C.S. (14).
 - Teor de ácidos graxos livres (como % de ácido oléico), método Ca 5a-40.
 - Índice de peróxidos - método Cd 8-53.
 - Índice de iodo - método Cd 1-25.
 - Índice de saponificação - método Cd 3-25.
 - Fósforo - método Ca 12-55.
 - Índice de refração - método Cc 7-25.
 - Cor - método Cc 13b - 45.
 - Densidade - método Cc 10a - 25
 - Viscosidade - Determinação direta em viscosímetro Haake, segundo DGF Einheitsmethoden, parte C, Fette C IV 7 (52), (15).
- Determinação da composição em ácidos graxos, método da A.O.C.S. Ce 1-62 (1988), a partir dos ésteres metílicos do óleo da polpa (extraído por solvente) e da semente do marolo (Figura 1), segundo método de Hartman e Lago (16).
 Na separação dos ácidos graxos foi utilizado um cromatógrafo à gas Perkin-Elmer Sigma 3B, acoplado a um integrador Perkin Elmer LCI-100. As análises foram desenvolvidas nas seguintes condições:
 - Temperatura da coluna (Silar 10C): 175 °C
 - Temperatura do detector (FID): 225 °C
 - Temperatura do injetor: 225 °C
 - Fluxo de nitrogênio: 25 mL/min.
 - Volume de injeção: 1 a 3 µL.

A identificação foi feita por comparação dos tempos de retenção dos compostos da amostra com padrões de ésteres de ácidos graxos (standar NU check - Prep. Inc.).
 A quantificação foi feita por normalização interna obtendo-se a percentagem de cada composto pela relação da área individual e área total dos picos calculados pelo integrador.

- Determinação qualitativa de alcalóides na torta, no óleo e na semente do marolo, segundo método de Tyihak (17).

FIGURA 1

Fluxograma da obtenção do óleo da semente de marolo em escala semi-piloto



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados das análises físico-químicas da polpa do marolo. Os carboidratos constituem a maior parte do extrato seco. Os monossacarídeos, assim como ocorre com a maioria das frutas, apresentam-se mais abundantes que os açúcares não redutores. O teor de lipídeos da polpa do marolo pode ser considerado alto se comparado com a maioria das outras frutas que, geralmente, apresentam teor inferior a 1 %. Entretanto a fruta somou apenas 83 cal/100 g de polpa. O conteúdo em fibras também é elevado.

TABELA 1
 DETERMINAÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS DA POLPA DE MAROLO AMARELO (BASE ÚMIDA)

	Média
°Brix	19±2
pH	4.70±0,01
Umidade (%)	76.9±0,3
Açúcares totais (%)	12.8±0,1
Açúcares redutores (%)	11.3±0,2
Proteínas (%)	1.11±0,02
Lipídeos (%)	3.0±0,1
Cinzas (mg/100g)	728±11
Fibras - FDN (%)	5.2±0,4
Tanino (mg/100g)	245±8
Vitamina A (RE/100g)	83±3
Vitamina C (mg/100g)	8.2±0,2

O conteúdo médio de tanino (compostos fenólicos) na polpa do marolo em bom estado de maturação, provavelmente é o responsável por um sabor adstringente residual. Outras frutas, como a banana (*Musa sapientum*) e o caju (*Anacardium occidentale*) também apresentam estes compostos (em torno de 300 mg/100g na polpa de caju em início de maturação), que podem ser reduzidos antes do consumo ou durante o processamento (18).

O valor de vitamina A no marolo amarelo equivale ao encontrado no mamão (*Carica papaya*), no pêssego (*Prunus persica*), na goiaba (*Psidium guajava*) e em várias outras frutas tropicais amplamente consumidas. O teor de vitamina C é relativamente baixo na fruta in natura.

A semente de marolo possui um teor relativamente elevado de óleo: 45,4±0,4% do peso seco (24,7±0,2% de umidade), o que permite, inclusive, extração por prensa contínua (Expeller). O processo de extração com solvente, em escala semi-piloto, apresentou um rendimento de 95%. O aroma do óleo é característico e agradável, provavelmente devido à presença de terpenos (19, 20). Possui coloração amarelada atraente que provavelmente está relacionada com a presença de carotenóides.

A Tabela 2 mostra as características físicas e químicas do óleo da semente.

TABELA 2
DETERMINAÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS DO ÓLEO
DA SEMENTE DE MAROLO

	Média
Teor de ácidos graxos livres (como ácido oléico, %)	0.17±0.01
Índice de peróxidos (mEq/1000g)	2.70±0.04
Índice de iodo	109.79±0.25
Índice de saponificação	180.31±0.82
Fósforo (mg/kg/	151.32±1.90
Viscosidade ² (mPa.s 40°C)	32.62±0.01
Densidade (40 °C)	0.904
Índice de refração (39,5 °C)	1.40298
Índice de iodo calculado	110.73
Cor	10Y 1.2R 0.3B

O baixo índice de acidez mostra um óleo de boa qualidade. O índice de peróxido, embora tenha apresentado resultados aceitáveis, pode ter sido influenciado por exposições relativamente longas do óleo à temperaturas ligeiramente elevadas, com o intuito de eliminar um possível teor residual de água.

O índice de saponificação obtido mostra-se coerente com a composição dos ácidos graxos (Tabela 3). O índice de iodo apresenta um óleo com insaturação intermediária, em cuja composição predominam os glicerídeos derivados do ácido oléico e linoléico.

TABELA 3
COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS (%), DO
ÓLEO DA POLPA E DA SEMENTE DE MAROLO E
COMPARAÇÃO COM ÓLEOS DE AMENDOIM
(*ARECHIS HYPOGAEA*) E OLIVA
(*OLEA EUROPEA*, ITÁLIA)

Ácidos graxos	Óleo da semente de marolo	Amendoim ¹ de marolo	Óleo da polpa	Oliva ¹
Láurico (C12:0)	—	—	2.9	—
Mirístico (C14:0)	0.1	—	1.9	—
Miristoléico (C14:1)	traços	—	0.1	—
Palmítico (C16:0)	8.1	11	9.5	12
Palmitoléico (C16:0)	0.3	—	0.2	7
Estearíco (C18:0)	5.6	3.9	4.2	2.8
Oléico (C18:1)	49.5	53.5	76.0	73
Linoléico (C18:2)	33.5	29	1.4	9.3
Linolênico (C18:3)	1.7	0.5	3.2	0.8
Araquídico (C20:0)	0.8	—	0.2	—
Não identificado	0.2	—	0.2	—
Saturados	14.6	15.5	18.7	14.8
Insaturados	85.0	83.5	80.9	84.8

¹ Segundo Gunstone *et alii*, 22

O teor de fósforo no óleo bruto revela a presença de quantidades razoáveis de fosfolipídeos que podem ser eliminados pela degomagem. A densidade, a viscosidade e o índice de refração correspondem às características naturais referentes à composição do óleo. A Tabela 3 mostra a composição química referente aos ácidos graxos do óleo da semente e da polpa do marolo. Com 50 % de ácido oléico e 34 % de ácido linoléico, o óleo da semente apresenta uma composição similar ao óleo de amendoim. Foi observado, também, uma estreita semelhança entre o óleo da semente de marolo e os óleos de semente de araticum da arêa e graviola, estudados por Ngiefu *et alii* (21) no Zaire. A composição e as características físicas e químicas obtidas mostram que é possível produzir um óleo de boa qualidade, com grande potencial no mercado de óleos finos. No entanto, a presença de alcalóides ainda precisa ser melhor estudada. A eliminação destes compostos poderia ser experimentada pelo refinamento ou extração por prensagem contínua.

A torta resultante da extração do óleo com certeza não deverá ser utilizada no preparo de rações para alimentação animal. Isto se deve a presença de alcalóides, cuja eliminação provavelmente não resultaria em um produto economicamente competitivo no mercado. Entretanto o alto teor de minerais (4,8 % de cinzas - 360 mg/100 g de fósforo) e de nitrogênio total (6 %) podem estimular a sua utilização como adubo orgânico.

A polpa apresenta um pequeno potencial oleífero comparado com a semente. O alto teor de umidade constitui um dos obstáculos à sua exploração industrial, pois favorece a hidrólise do óleo além de dificultar a sua extração. Entretanto existe

uma similaridade entre os óleos da polpa de marolo e de oliva, sobretudo quanto ao teor de ácido oléico. Mas a presença de aproximadamente 3% de ácido linolênico no óleo da polpa de marolo representa uma diferença marcante do ponto de vista tecnológico e de conservação.

Portanto, o marolo apresenta teores elevados em fibras e lipídeos quando comparados com a maioria das outras frutas. O teor de vitamina C foi baixo, mas equivalente ao encontrado em abacate, abacaxi e melancia, e o valor de vitamina A considerado médio, foi equivalente ao encontrado em mamão, pêssago, goiaba e várias outras frutas tropicais amplamente consumidas.

A semente de marolo possui um teor relativamente elevado de óleo o que permite, inclusive, extração por prensa contínua. Na polpa, este teor é insuficiente para permitir a extração em escala industrial. Os resultados valorizam a boa qualidade devendo estimular a preservação e até o cultivo da espécie.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem o apoio financeiro da FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos, através do convênio 4.2.90.0017.00.

REFERÊNCIAS

1. Ferreira M.B. Frutos comestíveis do Distrito Federal - III Piqui, Mangabá, Marolo e Mamãozinho. *Cerrado*, 5 (20): 22-25. 1973.
2. Almeida P.A., Silva J.A. & Ribeiro, J.F. Aproveitamento Alimentar de Espécies Nativas dos Cerrados: Araticum, baru, cagaita e jatobá. In: Planaltina. Brasília, EMBRAPA CPAC. p.10-21. 1987.
3. Agostini T.S. Composição dos carotenóides na polpa in natura e em produtos de preparo caseiro e caracterização da polpa e do óleo em marolo (*Annona coriaceae*). Tese de Mestrado - Fac. de Eng. de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas. Campinas. p.99. 1993.
4. Whiting G.C. Constituents of fruits - sugars. In: Hulme, Londres, Academic Press. p.1-27. 1970.
5. Duckworth R.B. Frutas y verduras. Zaragoza, Editorial Acribia p.304. 1968
6. Anon. Monounsaturates sales grow. *INFORM (AOCS)*, 3(6):666-686, 1992.
7. Official Methods of Analysis. The Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Washington D.C., U.S.A. 15th ed. 1990.
8. Horwitz W (ed). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Washington D.C., U.S.A. 13th ed. p.1018. 1980.
9. van Soest P.J. & Wine R.H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds IV Determination of Plant Cell-Wall constituents. *J. AOAC*, 50:50-55. 1967.
10. Bauernfeind J.C. Carotenoid Vitamin A precursors and analogs in foods and feeds. *J. Agr. Food Chem.* 20(3):456-473. 1972.
11. Deuel H.J., Johnston C., Meserve E.R., Polgar A. & Zechmeister L. Stereochemical configuration and provitamin A activity IV. Neo- α -carotene B and Neo- β -carotene B. *Arch. Biochem.*, 7:247-255. 1945.
12. Deuel H.J., Johnston C., Zimmer E., Polgar A. & Zechmeister L. Stereochemical configuration and provitamin A activity I. All-trans- β -carotene and Neo- β -carotene U. *Arch. Biochem.* 5:107. 1944.
13. Sweeney J.P. & Marsh A.C. Liver storage of vitamin A in rats fed carotene stereoisomers. *J. Nutr.* 103:20-25. 1973.
14. American Oil Chemists Society. Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists Society. Chicago. 3th ed. 1988.
15. Deutsche Einheitsmethoden Zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und Verwandten Stoffen. dGF - Einheitsmethoden. Parte C- Fette. Germany. 1984.
16. Hartman L. & Lago R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 22(8):475-476, 1973.
17. Tyihak E. Eine neue spezifische Farbreaktion zum papier- und dunnschicht chromatographischen Nachweis des Adenins. *J. Chrom.* 14:125. 1964.
18. Menezes H.C. & Draeta I.S. Bioquímica das frutas tropicais. Frutas Tropicais 10, Aspectos Toxicológicos. ITAL, 1980.
19. Ferrari M., Pelizzoni F. & Ferrari G. New Diterpenoids with clerodane skeleton. *Phytochemistry* 10:3267-3269. 1971.
20. Mussini F.O. & Ferrari G. Constituents of *Annona coriacea*. The structure of a new diterpenoid. *J. Chem Soc. Perkin Trans.* 1(21):2551-2557. 1973.
21. NGiefu c.k., Paquot C. & Vieux A. Les plantes à huile du Zaire II. -Families Botaniques Fournissant des Huiles d'insaturation Moyenne. *Oléagineux*, 31(2):545-547. 1976.
22. Gunstone F.P., Harwood J.L. & Padley F.B. *The Lipid Handbook*. Londres, Chapman and Hall. p571. 1986.

Recibido: 14-06-1994

Aceptado: 03-02-1995

Estudio comparativo de la composición y el valor nutritivo de semillas y concentrados de proteína de leguminosas

Rosana Cantoral¹, Alfredo Fernández-Quintela², J. Alfredo Martínez³, y M. Teresa Macarulla⁴

Area de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco. España

RESUMEN. En este trabajo se han caracterizado nutritivamente las semillas de tres especies de leguminosas: guisante (*Pisum sativum*), haba (*Vicia faba*) y soja (*Glycine max*). A partir de las mismas se han elaborado por vía húmeda dos tipos de concentrados de proteína que difieren en el método de secado (lío-filizados y lavados con alcohol). En ellos se ha determinado la composición nutritiva proximal y el contenido en diversos factores antinutritivos (fitatos, taninos, inhibidores de tripsina y lectinas). También se han estudiado en estos concentrados tres de las propiedades funcionales más importantes para su aplicación en tecnología de alimentos (solubilidad de la proteína a diferente pH, capacidad de absorción de agua y capacidad de absorción de aceite).

Los resultados han puesto de manifiesto el elevado contenido proteico de los concentrados, con rendimientos de extracción de la proteína menores para los concentrados lavados con alcohol que para los liofilizados, e inferiores en los obtenidos a partir de la soja que en los correspondientes al guisante y el haba. También se han encontrado en todos los concentrados niveles más bajos de factores antinutritivos con respecto a sus semillas. Así mismo, se ha comprobado que las propiedades funcionales que poseen los concentrados proteicos de guisante y de haba son tan aceptables para su utilización en tecnología de alimentos como las de los concentrados de soja.

Palabras clave: Leguminosas, concentrados proteicos, valores nutritivos, factores antinutritivos, propiedades funcionales.

SUMMARY. Composition and nutritional value of legume seeds and protein concentrates. A comparative study. The nutritional properties of three legumes: pea (*Pisum sativum*), faba bean (*Vicia faba*) and soya (*Glycine max*) have been characterized. From these seeds, protein concentrates were elaborated by wet processing and two different procedures of drying were followed (freeze-drying and alcohol washing). The composition and content of several antinutritional factors (phytates, tannins, trypsin inhibitors and lectins) were assessed in all of them. Also some functional properties regarding their potential use in food technology were evaluated, such as protein solubility at different pH, as well as water and oil absorption capacities. All the obtained concentrates showed high protein contents, nevertheless protein extraction efficiency was smaller in alcohol-washed concentrates than in the lyophilized ones. In the other hand, the concentrates obtained from pea and faba bean showed higher yields than those obtained from soya. The content of antinutritional factors were markedly reduced after the concentration process. Furthermore, the functional properties of pea and faba bean protein concentrates point out their suitability for food preparation as previously reported for soya.

Key Words: Legumes, protein concentrates, nutritional value, antinutritional factors, functional properties.

INTRODUCCION

La creciente necesidad de proteínas y el continuo aumento del precio de la proteína animal ha incentivado la búsqueda de fuentes alternativas capaces de ofrecer proteína de alto valor nutritivo y cualidades organolépticas aceptables. Por ello, las investigaciones apuntan hacia materias primas de origen vegetal, con objeto de obtener, tras diversos tratamientos, productos sustitutivos o complementarios de las fuentes de proteínas clásicas para su utilización tanto en la alimentación humana como en la de los animales de ganadería (1-3).

- 1 Doctorado del Area de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco (Vitoria, España).
- 2 Profesor Asociado del Area de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco (Vitoria, España).
- 3 Profesor Ordinario Catedrático de Nutrición del Departamento de Fisiología y Nutrición de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Navarra (Pamplona, España).
- 4 Profesora Titular del Area de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad del País Vasco (Vitoria, España).

En este sentido destacan las leguminosas, a cuyo interés nutritivo contribuyen también su elevado contenido en hidratos de carbono, vitaminas, minerales y fibra, y además su aporte lipídico que, aunque escaso es rico en ácidos grasos insaturados (4,5). Sin embargo, estas semillas suelen contener algunos componentes que influyen negativamente en su potencial nutritivo (factores antinutritivos), tales como lectinas, fitatos, inhibidores de proteasas, etc., que, sumados al desequilibrio en aminoácidos azufrados y a una baja digestibilidad de algunos de sus componentes, impiden un aprovechamiento más amplio de sus propiedades alimenticias (6-8).

En consecuencia, una mayor información acerca de la variabilidad en la composición química de estas semillas y de los métodos y técnicas que consigan eliminar o reducir su contenido en factores antinutritivos para obtener una mayor digestibilidad proteica, así como su suplementación en aminoácidos azufrados, puede suministrar la base necesaria para un mayor conocimiento y una utilización más correcta y rentable de las leguminosas (9-12).

Entre los procedimientos más frecuentemente empleados para mejorar la calidad nutritiva y el aprovechamiento de las legumbres se encuentran el tratamiento con ácidos y calor, la fermentación, la germinación, la eliminación mecánica de las testas, etc. (12-18), y la obtención de aislados y concentrados de proteína (11, 19, 20). En este sentido, los avances en la investigación y producción de concentrados y aislados de proteína a partir de semillas de leguminosas son cada vez más numerosos. A su vez, estos concentrados y aislados son susceptibles de ser empleados en la suplementación proteica de diversos alimentos, y también en la mejora de sus parámetros tecnológicos en función de las propiedades funcionales (21, 22).

La mayor parte de los trabajos de investigación sobre aislamiento de proteínas de leguminosas parten de la utilización de la soja debido, entre otros factores, a que esta semilla presenta algunas ventajas tales como un alto rendimiento económico y un elevado contenido proteico. Sin embargo, en países donde la soja no es fácil de cultivar o no tiene una amplia difusión, es de interés potenciar la investigación en este campo con otras especies de leguminosas.

Por tanto, el objetivo de este trabajo ha consistido en el análisis de la composición y valor nutritivo de las semillas de guisante, haba y soja, y de los concentrados proteicos obtenidos a partir de las mismas, con la finalidad de comparar las características, tanto de obtención de dichos concentrados como de la materia prima, entre el guisante y haba frente a la soja.

MATERIAL Y METODOS

En la realización del presente trabajo se han empleado las semillas secas de guisante (*Pisum sativum*), haba (*Vicia faba*) y soja (*Glycine max*), cultivadas en la Finca Experimental Eskalmendi de la Diputación Foral de Alava (España). Las partidas iniciales de cada una de ellas se molieron hasta obtener un polvo fino de tamaño de partícula inferior a 0,7 mm

de diámetro y se almacenaron a -40°C hasta la realización de los análisis. Estos se llevaron a cabo siempre al menos por cuadruplicado.

A. Análisis de la composición proximal: Las determinaciones realizadas, siguiendo las recomendaciones de la AOAC (23), incluyen proteína, mediante la valoración del nitrógeno total según el método Kjeldahl (N \times 6,25); hidratos de carbono, por el método de la antrona previa extracción de los mismos con ácido perclórico; grasa, por extracción etérea en un equipo Soxhlet automático; fibra bruta, mediante cuantificación del material no digerible por ácidos y bases débiles; cenizas, por el método gravimétrico de incineración de la muestra a 550 °C; y humedad, mediante secado de la muestra a 105 °C hasta lograr un peso constante.

B. Valores de los factores antinutritivos: Los componentes antinutritivos que se han analizado en este estudio han sido dos de naturaleza no proteica (fitatos y taninos), y otros dos de naturaleza proteica (inhibidores de tripsina y lectinas). Los fitatos fueron determinados mediante su precipitación con hierro y posterior valoración del fósforo de la molécula (24); los taninos según la técnica espectrofotométrica de Burns (25); los inhibidores de tripsina según el método de Kakade y col. (26), utilizando benzoil-DL-*p*-nitroanilida como sustrato; y las lectinas aprovechando su capacidad hemaglutinante, según la técnica descrita por Deshpande y Singh (27).

C. Obtención de los concentrados proteicos: Los concentrados de proteína se han elaborado siguiendo el método de Thompson (28), con las modificaciones de McKurdy y Knipfel (29), y de Martínez y col (30). En síntesis, las semillas se pusieron en remojo en agua destilada durante 20 h y las testas se eliminaron manualmente. Posteriormente, los cotiledones se molieron y los de soja, además, se desengrasaron. Las harinas así obtenidas se suspendieron en agua destilada en proporción 1:5 (p/v) y se provocó la solubilización de las proteínas a pH 9,0. Tras una centrifugación a 1.000 g durante 20 min, se recogieron los sobrenadantes y se precipitaron las proteínas a pH 4,0. Después de una segunda centrifugación (1.000 g, 20 min), los productos obtenidos se desecaron por dos métodos distintos: liofilización (L) y lavados sucesivos con etanol absoluto (A), siendo eliminados los restos de alcohol en estufa de aire caliente.

D. Valoración de las propiedades funcionales de los concentrados proteicos: Las propiedades funcionales estudiadas han sido la solubilidad de la proteína a diferente pH, la capacidad de absorción de agua tras la suspensión en la misma durante 15 min y posterior centrifugación (18.000 g, 15 min), y la capacidad de absorción de aceite en condiciones similares, según las técnicas descritas por Idouraine y col. (31).

RESULTADOS Y DISCUSION

La composición proximal de las tres semillas estudiadas presentó variaciones notables entre las distintas especies analizadas (Tabla 1). Así, la leguminosa más rica en proteína fue la soja (con un contenido del orden del 33 %), mientras que el guisante resultó ser el más escaso (21 %), siendo el haba intermedia (24 %). En cuanto a lípidos, fue nuevamente la soja la semilla con mayor contenido (20%), por lo que se la considera de carácter oleaginoso, encontrándose por debajo del 2,5 % en grasa el resto de las especies analizadas. El contenido en hidratos de carbono osciló entre el 52 % para el guisante, el 47 % para el haba y el 17 % para la soja. El análisis de fibra ofreció unos valores inferiores al 11 % para las tres semillas y, por último, los valores de humedad y cenizas se situaron alrededor del 12 % y 4 % respectivamente, con máximos de 13 % en humedad para el guisante y 4 % de cenizas en la soja.

TABLA 1
COMPOSICION NUTRITIVA DE LAS SEMILLAS
(g/100g)

	Guisante X ^a ±ES ^b	Haba X±ES	Soja X±ES
Proteína	20,9±0,1	24,3±0,1	32,6±0,1
Hidratos de carbono	51,7±0,9	46,5±0,7	17,1±0,2
Grasa	2,5±0,1	1,5±0,1	20,3±0,5
Fibra bruta	7,4±0,1	10,3±0,2	7,1±0,2
Cenizas	2,5±0,1	3,3±0,1	4,1±0,2
Humedad	13,1±0,1	11,0±0,1	11,3±0,1

a Media

b Error estándar

Estos datos concuerdan en líneas generales con los publicados por Fernández-Quintela y col (22) para el guisante, García y col. (32) y Uzzan (33) para el haba, y son ligeramente inferiores a los presentados por Borget (34) y Domínguez y col. (2) para la soja. El análisis global de los datos permite destacar el contenido de hidratos de carbono del guisante y el haba, mientras que en la soja sobresale el porcentaje de proteínas y de grasa.

La composición proximal de los concentrados proteicos presentó notables variaciones respecto a la hallada para las respectivas semillas de las que habían sido obtenidos (Tabla 2), no encontrándose apenas diferencias entre las tres especies de leguminosas. El nutriente mayoritario, como era de esperar, fue la proteína, cuyo contenido osciló entre el 72% y el 81% en el caso de los concentrados tipo L (liofilizados), y entre el 81% y el 83% para los concentrados tipo A (desechados por lavados sucesivos con alcohol). Estos valores superan el 70% asignado a la denominación de concentrados proteicos (33).

TABLA 2
COMPOSICION NUTRITIVA DE LOS
CONCENTRADOS PROTEICOS (g/100g)

	Guisante		Haba		Soja	
	L ^a X ^c ±ESX ^d	A ^b X±ES	L X±ES	A X±ES	L X±ES	A X±ES
Proteína	81,4±0,5	82,7±0,4	72,4±0,1	80,8±0,3	79,9±0,3	81,9±0,2
Hidratos de arboño	6,4±0,2	1,8±0,1	7,6±0,1	3,9±0,2	5,5±0,1	2,0±0,1
Grasa	3,3±0,2	1,3±0,1	3,2±0,2	1,3±0,1	1,4±0,1	1,3±0,1
Fibra bruta	4,5±0,4	4,5±0,3	5,6±0,3	7,5±0,4	3,8±0,3	2,2±0,1
Cenizas	4,1±0,2	2,6±0,1	5,7±0,3	4,7±0,2	4,5±0,2	3,1±0,1
Humedad	3,2±0,1	12,1±0,7	9,9±0,1	8,8±0,2	2,8±0,1	8,8±0,1

a Concentrado proteico desecado por liofilización

b Concentrado proteico desecado por lavados sucesivos con alcohol

c Media

d Error Estándar

A pesar de que los concentrados de proteína tipo A mostraron un contenido proteico mayor que los de tipo L, se encontró una diferencia sustancial en el rendimiento del proceso de extracción de la proteína de las semillas para ambos tipos de concentrados, siendo los correspondientes para los lavados con alcohol (28-53%) menores a los de los concentrados proteicos liofilizados (37-57%). Además, se encontró que, con el método empleado, el rendimiento medio obtenido con la soja era muy inferior al obtenido con las otras dos especies (entre un 20-40% menos).

Por otra parte, los valores de humedad variaron notablemente según el proceso de secado utilizado. Así, se encontraron valores entre el 9-12% en los concentrados proteicos desecados con alcohol, y valores inferiores (entre el 3% y el 9%) en los liofilizados. Esta relativamente elevada humedad de los concentrados de proteína lavados con alcohol se puede atribuir, por una parte, al proceso de purificación y secado llevado a cabo con alcohol, que otorga al producto final una mayor capacidad para absorber humedad ambiental.

El contenido en grasa, cenizas y fibra fue muy semejante en los dos tipos de concentrados proteicos obtenidos a partir de las tres semillas en estudio, destacando no obstante un menor nivel de lípidos en los correspondientes a la soja, debido a que para su elaboración se partió de una semilla desengrasada, y también el relativamente elevado contenido en fibra de los concentrados de haba, posiblemente por ser esta semilla la más rica en la misma.

Los niveles de hidratos de carbono fueron similares para los concentrados de las tres semillas, e inferiores en los concentrados de proteína tipo A respecto a los de tipo L. Esta disminución se debe fundamentalmente a que los lavados sucesivos con alcohol arrastran la mayor parte de este nutriente, además de la mayor parte de la fibra que pudieran contener.

Al llevar a cabo una comparación entre los datos de la composición proximal de semillas y la de los concentrados proteicos obtenidos a partir de ellas, se observa que éstos

últimos presentan ventajas respecto a las primeras por su alto contenido en proteína, si bien se pierden parcialmente en el proceso de elaboración de los concentrados otros componentes nutritivos como hidratos de carbono, lípidos (especialmente en el caso de la soja), fibra, minerales y, posiblemente, vitaminas. Estos datos de composición concuerdan en líneas generales con los obtenidos por Vose (35) y por Fernández-Quintela y col. (21-22) para guisante y haba, y son ligeramente superiores a los referenciados por Domínguez y col (2) para la soja.

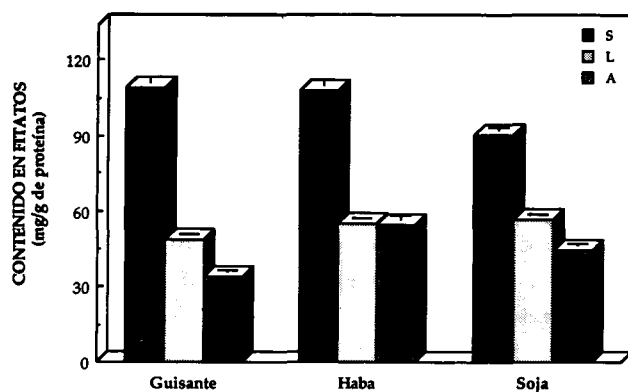
La segunda parte de este trabajo se destinó a la valoración de los contenidos en diferentes factores antinutritivos de las semillas y de los concentrados proteicos obtenidos a partir de ellas, con objeto de comprobar si en la elaboración de los mismos estos compuestos llegaban a ser total o parcialmente eliminados.

Los primeros factores analizados fueron los fitatos, cuyas propiedades acomplejantes de iones metálicos pueden provocar una reducción importante de la biodisponibilidad de algunos micronutrientes tales como calcio, hierro, zinc, etc. (36-38).

Los resultados de estos análisis (Figura 1) mostraron que el contenido en fitatos de las semillas analizadas (expresando en mg de fitatos/g de proteína) fue de 109 para el guisante, 108 para el haba y 90 para la soja, mientras que en todos los concentrados proteicos se registraron valores inferiores a los de sus semillas de origen.

FIGURA 1

Contenido en fitatos de las semillas (S) y de sus respectivos concentrados proteicos desecados por liofilización (L) y por lavados sucesivos con alcohol (A)



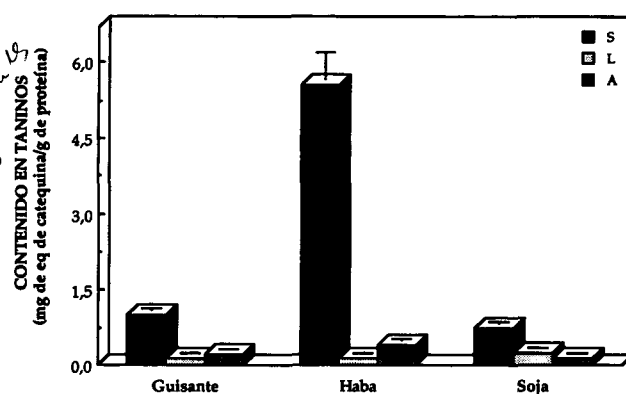
Otro factor antinutritivo importante presente en las leguminosas son los taninos (8). Estos compuestos hidrosolubles de naturaleza polifenólica interfieren con la digestión y la absorción de nutrientes, tales como proteínas e hidratos de carbono, debido a su capacidad de formar complejos con las proteínas alimentarias e intestinales y con algunos enzimas digestivos (16, 39-41).

En las semillas se observó que el contenido en taninos (expresados en mg de equivalentes de catequina/g de proteína)

oscilaba entre 0,74 para la soja y 5,57 para el haba, mientras que en los concentrados proteicos estos niveles fueron del orden del 0,10-0,40 (Figura 2). Por ello podría afirmarse que la elaboración de los concentrados proteicos elimina en gran medida este compuesto no deseado.

FIGURA 2

Contenido en taninos de las semillas (S) y de sus respectivos concentrados proteicos desecados por liofilización (L) y por lavados sucesivos con alcohol (A)



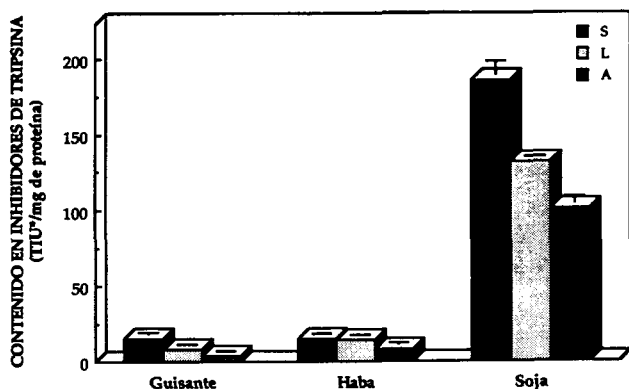
En cuanto a factores antinutritivos de naturaleza proteico presentes en las leguminosas, se analizaron los niveles de inhibidores de tripsina y de lectinas. Los primeros pueden dificultar notablemente la digestión de las proteínas de la dieta por parte del organismo (9), mientras que las segundas poseen carácter antinutritivo por su poder lesivo sobre las células intestinales, por lo que disminuyen la digestión y absorción de determinados nutrientes, tales como hidratos de carbono y proteínas (12,27).

Los datos correspondientes al contenido en inhibidores de tripsina (Figura 3) mostraron que la actividad de dicho enzima, en presencia de extractos de harina de las semillas analizadas, fue inhibida en diferente grado según la especie. Así, el guisante y el haba presentaron una capacidad inhibidora relativamente baja (15,0 y 14,8 TIU/mg de proteína, respectivamente), mientras que la de la soja fue aproximadamente doce veces mayor (186,0 TIU/mg de proteína).

Por otra parte, se observó que los niveles de inhibidores de tripsina de los concentrados fueron menores que los de sus respectivas semillas. Además, se detectaron niveles más bajos de estos compuestos en los concentrados de tipo A respecto a los de tipo L para las tres leguminosas, probablemente debido a una desnaturalización parcial y, por tanto, a una pérdida de actividad inhibidora, causada por el alcohol y/o por el tratamiento térmico (17).

FIGURA 3

Contenido en inhibidores de tripsina de las semillas (S) y de sus respectivos concentrados proteicos desecados por liofilización (L) y por lavados sucesivos con alcohol (A)

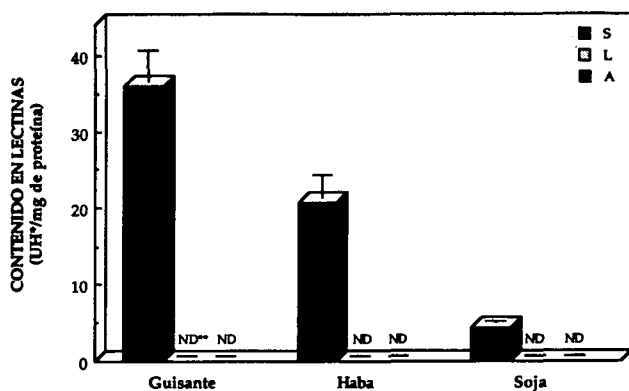


* TTU= Unidades de tripsina inhibidas. Una unidad de tripsina (TU) se define como un incremento de 0,01 unidades de absorbancia a 410 nm por 10 ml de mezcla de reacción bajo las condiciones experimentales utilizadas

Respecto a las lectinas, se encontraron valores muy diversos en su actividad hemaglutinante (expresada en unidades de hemaglutinación/mg de proteína) dependiendo de la especie analizada (Figura 4). Así, para el caso del guisante esta actividad fue de 36,05 para el haba de 20,63 y para la soja de 4,33. Sin embargo, en ninguno de los concentrados proteicos se detectó capacidad hemaglutinante, lo que podría ser indicativo de que el método de obtención de los mismos inactiva por completo esta capacidad.

FIGURA 4

Contenido en lectinas de las semillas (S) y de sus respectivos concentrados proteicos desecados por liofilización (L) y por lavados sucesivos con alcohol (A)



* UH= Unidades de hemaglutinación. Una unidad de hemaglutinación se define como la mayor dilución del extracto de lectinas capaz de aglutinar macroscópicamente eritrocitos de camero bajo las condiciones experimentales utilizadas.

** ND= No detectada hemaglutinación.

Así, pues, la elaboración de concentrados proteicos a partir de semillas de leguminosas mediante el método descrito, especialmente si el secado se realiza mediante lavados sucesivos con alcohol, disminuye o elimina algunos de los compuestos antinutritivos presentes en las mismas, lo que concuerda básicamente con lo observado por otros autores (38,42,43).

Por último, se llevó a cabo el análisis de las propiedades funcionales de los concentrados proteicos más importantes para su posible aplicación en tecnología de alimentos.

Desde un punto de vista práctico, los datos sobre las características de solubilidad son muy útiles para poder determinar las condiciones óptimas de extracción y purificación de las proteínas, así como para la separación de fracciones proteicas. La solubilidad, bajo distintas condiciones, también da una buena indicación de las aplicaciones potenciales de las proteínas. Así, frecuentemente la solubilidad proteica a pH neutro o a pH isoeléctrico, es la primera propiedad funcional que se mide en cada etapa de preparación o de transformación de un ingrediente proteico (44).

Los resultados obtenidos en las pruebas de solubilidad permiten apreciar que los perfiles de las curvas de los concentrados fueron semejantes para las tres especies de leguminosas y para ambos tipos de concentrados (Figura 5). Además, se puede observar que la solubilidad proteica fue prácticamente nula en zona de pH situada en torno al punto isoeléctrico de las mismas (pH 4,2-4,6). Precisamente la baja solubilidad a este pH se utiliza para preparar los concentrados y aislados proteicos por precipitación isoeléctrica. Por otra parte, tanto a pH superior a 7 como a pH inferior a 3, la solubilidad aumentó en gran medida, llegando a alcanzar en algunos casos valores superiores al 90%.

Sin embargo, los concentrados proteicos desecados por lavados con alcohol mostraron una solubilidad proteica ligeramente inferior a la de los concentrados proteicos liofilizados. Probablemente esta disminución se deba a una desnaturalización parcial de las proteínas.

Respecto a la capacidad de absorción de agua (Tabla 3), se obtuvieron resultados semejantes para los dos tipos de concentrados elaborados a partir del guisante y el haba. Sin embargo, los concentrados de soja mostraron valores diferentes según el método de secado, presentando una capacidad de absorción de agua mayor los lavados con alcohol que los liofilizados (2,75 y 1,71 ml agua retenidos/g de proteína, respectivamente).

FIGURA 5

Solubilidad de las proteínas a diferentes pH de los respectivos concentrados proteicos de guisante, haba y soja desecados por liofilización (tipo L) y por lavados sucesivos con alcohol (tipo A)

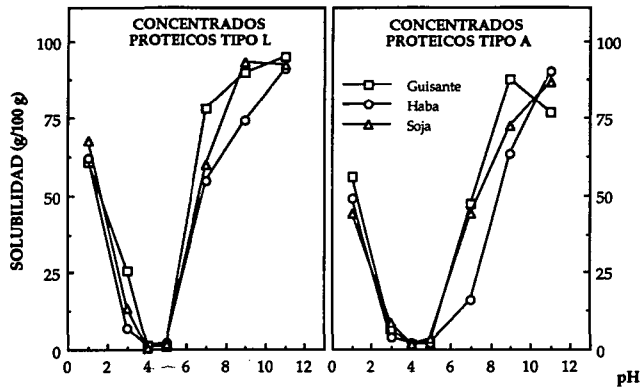


TABLA 3
CAPACIDAD DE ABSORCION DE AGUA Y DE ACEITE DE LOS CONCENTRADOS PROTEICOS (ml/g DE PROTEINA)

	Agua X ^a +E ^S ^b	Aceite X±E ^S
Guisante:		
L ^c	1,99±0,16	1,69±0,12
A ^d	1,39±0,02	3,03±0,04
Haba:		
L	1,90±0,09	1,95±0,06
A	1,44±0,03	2,12±0,06
Soja:		
L	1,71±0,07	2,15±0,03
A	2,75±0,03	2,83±0,12

a Media

b Error Estándar

c Concentrado proteico desecado por liofilización

d Concentrado proteico desecado por lavados sucesivos con alcohol

En cuanto a la capacidad de absorción de aceite, se observó que los concentrados proteicos tipo A presentaron siempre una retención ligeramente superior a la de los respectivos de tipo L, sin que hubiera apenas diferencias en el origen de las semillas.

Así pues, la elaboración de concentrados y aislados de proteína presenta mayores utilidades frente al uso de las semillas completas, bien crudas o tratadas térmicamente, porque se obtiene mayoritariamente la proteína, a la cual se le pueden dar distintos usos en tecnología de alimentos (elabo-

ración de sucedáneos cárnicos y lácticos, fabricación de fórmulas infantiles, fortificación de alimentos, etc.), si bien se pierden total o parcialmente, otros componentes como fibra, hidratos de carbono, lípidos y minerales presentes en la semilla entera. Además los concentrados proteicos poseen, en general, menor contenido en factores antinutritivos.

Por otra parte, en cuanto al tipo de concentrado proteico se refiere, y puesto que las propiedades funcionales son similares para ambos, resulta más rentable la elaboración de concentrados desecados por liofilización que por lavados sucesivos con alcohol porque este proceso encarece, en gran medida, el producto final.

Por último, desde el punto de vista económico y para las tres especies analizadas, las leguminosas con mayores ventajas son el guisante y el haba puesto que estas semillas resultan más asequibles, con ellas se obtienen mejores rendimientos de extracción proteica, y requieren menos cuidados para la elaboración de concentrados, ya que no necesitan un desengrasado previo como es el caso de la semilla de soja. Además, los concentrados obtenidos a partir de guisante y de haba contienen cantidades de inhibidores de tripsina muy inferiores a los obtenidos a partir de soja, mientras que las del resto de factores antinutritivos analizados son similares, y sus adecuadas propiedades funcionales les permitirían ser tan útiles en tecnología de alimentos como lo son los concentrados de soja.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad del País Vasco (Proyecto UPV/101.123-EA 140/94).

REFERENCIAS

- Domínguez H., MJ Núñez & JM Lema. Factores antinutricionales de la proteína de soja. Alimentación: equipos y tecnología 1:149-155, 1991.
- Domínguez H., MJ Núñez & JM Lema. Procesado y usos de productos proteicos de soja para alimentación humana. Alimentación equipos y tecnología 6:85-95, 1991.
- Salgado JM & MK Takashima. Chemical and biological characterization of meal and protein isolates from pumpkin seed (*Cucurbita moschata*). Arch. Latinoam. Nutr. 42:443-450, 1992.
- Martínez JA & MT Macarulla. Valor nutritivo y aspectos tecnológicos de las leguminosas. En: Nutrición y tecnología de alimentos. San Sebastián, Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco, p. 67-73, 1990.
- Kingman SM. The influence of legume seeds on human plasma lipid concentrations. Nutr. Res. Rev. 4:97-123, 1991.
- Hellsper JPF, JM Hoogendijk, A. Norel & K. Burguer-Meyer. Antinutritional factors in faba beans (*Vicia faba* L) as affected by breeding toward the absence of condensed tannins. J. Agric. Food Chem. 41:1058-1061, 1993.
- Beleia A., LT Thu Thao & EI. Ida. Lowering phytic phosphorous by hydration of soybeans. J Food Sci. 58:375-388, 1993.
- Villanueva MR., JA. Martínez & J. Larralde. Papel de los polifenoles en el bajo valor nutritivo de la *Vicia faba*. Arch Latinoam. Nutr. 37:324-334, 1987.

9. Larralde J. & JA Martínez. A reappraisal of the nutritional utilization of legumes. *Rev esp. Fisiol.* 45 (supl): 225-232, 1989.
10. Van Der Poel AFB, HLM Aarts & W Stolp. Milling and air clasification of two different types of peas. Effects on the distribution of antinutritional factors. *J Agric Sci.* 37:273-278. 1989.
11. Ulloa JA & ME Valencia. Nutritional quality of a protein concentrate of chick-peas (*Cicer arietinum*) obtained by ultrafiltration. *Arch. Latinoam. Nutr.* 42:428-431. 1992.
12. Reddy NR & MD Pierson. Reduction in antinutritional and toxic components in plan foods by fermentation. *Food Res Int* 27:281-290. 1994.
13. Kaul M & M Bajwa. Effect of heat and natural fermentation on trypsin inhibitor and hemagglutinins of black grain (*Phaseolus mungo*). *Indian J. Nutr Diet.* 24:40-44. 1987.
14. Abd Allah MA, YH Foda, FM Abu Salem & ZS Abd Allah. Treatments for reducing total vicine in egyptian faba bean (Giza 2 variety). *Plant Foods Hum. Nutr.* 38:201-210, 1988.
15. Saini HS. Activity and thermal inactivation of protease inhibitors in grain legumes. En: *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds.* Wageningen Ed. Pudoc Scientific Publishers. 249-253. 1989.
16. Bressani R., DR de Mora, R. Flores & R. Gómez-Brenes. Evaluación de dos métodos para establecer el contenido de polifenoles en frijol crudo y cocido, y efecto que estos provocan en la digestibilidad de la proteína. *Arch. Latinoam. Nutr.* 41:569-581. 1991.
17. Van Der Poel T., W. Stolp & D. Van Zuilichem. Twin-screw extrusion of two pea varieties: effects of temperature and moisture level on antinutritional factors and protein dispersibility. *J. Sci. Food Agric.* 58:83-87. 1992.
18. Camacho L., C. Sierra, R. Campos, E. Guzmán & D. Marcus. Nutritional changes caused by the germination of legumes commonly eaten in Chile. *Arch. Latinoam. Nutr.* 42:283-290. 1992.
19. Bhatti, RS & GI Christison. Composition and nutritional quality of peas (*Pisum sativum* L.), faba bean (*Vicia faba* L spp Minor) and lentil (*Lens culinaris* Medik) meals protein concentrates and isolates. *Plant Foods Hum. Nutr.* 34:41-51. 1984.
20. Aremu CY. Proximate and amino acid composition of cow pea (*Vigna unguiculata*, Walp) protein concentrate prepared by isoelectric point precipitation. *Food Chem* 37:61-68. 1990.
21. Fernández-Quintela A., J Larralde, MT Macarulla, R. Marcos & JA Martínez. Leguminosas y concentrados de proteína: nuevas perspectivas y aplicaciones. *Alimentaria* 239:59-63. 1993.
22. Fernández-Quintela A., MT Macarulla & JA Martínez. Obtención y caracterización de concentrados de proteína a partir de leguminosas. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 33:285-294. 1993.
23. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the AOAC.* 15th ed. Washington, DC, The Association. 1990.
24. Thompson DB & JB Erdman. Phytic acid determination in soybeans. *J. Food Sci.* 47:513-517. 1982.
25. Burns RE. Method for estimation of tannin in grain sorghum. *Agron J.* 63:511-512. 1971.
26. Kakade ML., JJ Rackis, JE McGhee & G. Puski. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.* 51:376-382. 1974.
27. Deshpande SS & RK Singh. Hemagglutinating activity of lectins in selected varieties of raw and processed dry beans. *J Food Process.* 15:81-87. 1991.
28. Thompson LU. Preparation and evaluation of mung bean protein isolates. *J. Food Sic.* 42:202-206. 1977.
29. McKurdy SM & JE Knipfel. Investigation of faba bean protein recovery and application to pilot scale processing. *J. Food Sci.* 55:1093-1094, 1101. 1990.
30. Martínez JA., A. Fernández-Quintela, MT Macarulla & R. Marcos. Antinutritional factors (ANFs) in legumes and protein concentrates from legumes. En: *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds (tomo II).* Wageningen, Ed Wageningen Pers. p. 67-70. 1993.
31. Idouraine A., SB Yensen & CW Weber. Tepary bean flour, albumin and globulin fractions functional properties compared with soy protein isolate. *J. Food Sci.* 56:1316-1318, 1326. 1991.
32. García MA, N. Cuartero & I. Ferrando. Composición química y aspectos bromatológicos de algunas leguminosas de los géneros *Lathyrus* y *Vicia*. *Anal. Bromatol.* 41:155-166. 1989.
33. Uzzan A. Vegetable protein products from seeds: technology and uses in the food industry. En: *Developments in food proteins-6.* New York, Ed Elsevier. 1988.
34. Borget M. *Food legumes. The tropical agriculturalis.* New York, Ed. MacMillan. 1992.
35. Vose JR. Production and functionality of starches and protein isolates from legume seeds (field peas and horse beans). *Cereal Chem.* 57:406-410. 1980.
36. Macarulla MT., JA. Martínez & J. Larralde. Effects of zinc supplementation on *Vicia faba* fed mice. En: *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds.* Wageningen, Ed Pudoc Scientific Publishers. p.368-370. 1989.
37. Lönnerdal B., AS Sandberg, B. Sandström & C. Kuntz. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *J. Nutr.* 119:211-214. 1989.
38. Hurrell RF., MA. Juillerat, MB Reddy, SRLynch, SA Dassenko & JD Cook. Soy protein, phytate and iron absorption in humans. *J Clin Nutr.* 56:573-578. 1992.
39. Bressani R., LG Elías & JE Braham. Reduction of digestibility of legume proteins by tannins. *J Plant Food* 4:43-55, 1982.
40. Macarulla MT, JA Martínez, Y Barcina & J Larralde. Intestinal absorption of D-galactose in the presence of extracts from *Phaseolus vulgaris* hulls. *Plant Food Hum. Nutr.* 39:359-367. 1989.
41. Longstaff M. & JM McNab. The inhibitory effects of hull polysaccharides and tannins of field beans (*Vicia faba* L.). on the digestion of amino acids, starch and lipid and digestive enzyme activities in young chicks. *Br. J Nutr* 65:199-216. 1991.
42. Ayyagary R., R. Narasinga & DN Roy. Lectins, trypsin inhibitors, BOOA and tannins in legumes and cereals and the effects of processing. *Food Chem* 34:229-238. 1989.
43. Savelkoul HMG, H Boer, S. Tamminga & M. Van Oort. Biotechnological degradation of lectins, tannins and trypsin inhibitors in legumes. En: *Proceedings of the 1st European Conference on Grain Legumes, Angers,* p.397-398. 1992.
44. Chefel JC., JL Cuq & D. Lorient. *Proteínas alimentarias.* Zaragoza, Ed. Acribia. 1989.

Recibido: 27-10-1994

Aceptado: 23-06-1995

Nuevos Libros

Nutrición y Dietoterapia Interamerican McGrew Hill Krause 8º Edición

Una primera lectura de los capítulos más importantes de esta obra ya nos ofrece una perspectiva sobre su calidad científica y su elevado potencial didáctico. Parece que en la intención de los autores estaba ya que el destino de este libro iba a ser doble: por un lado un libro de consulta para los profesionales en ejercicio, lo que antes se conocían como "libro de cabecera" y por otro un texto básico de estudio para estudiantes de medicina, nutrición y ciencias afines. Si ese fue el objetivo de los editores, bien puede decirse que lo han logrado. La disposición y amplitud de los capítulos abarcan prácticamente todos los aspectos de la nutrición clínica, desde los principios de la fisiología y patología hasta la terapéutica y las medidas preventivas. La oferta bibliográfica es excelente en todos los capítulos, e incluye tanto los aspectos históricos de las enfermedades de la nutrición como las referencias de mayor actualidad.

El libro contiene cuatro grandes secciones. La primera se ocupa de los fundamentos de la nutrición, incluyendo las

necesidades de energía y nutrientes. La segunda sección es una enjundiosa revisión de los problemas de la nutrición a través de todo el proceso vital, desde el desarrollo fetal hasta el envejecimiento. La tercera se ocupa de la nutrición para la salud y la aptitud física, que contempla aspectos novedosos y, finalmente, la cuarta sección trata de la dietoterapia de las enfermedades dominantes. Estas cuatro partes están bien engarzadas, y son frecuentes las referencias cruzadas. A pesar de que en la redacción han intervenido numerosos autores, el estilo se mantiene uniforme gracias a un gran esfuerzo editorial. Las numerosas ediciones que ha tenido este libro es una prueba del interés creciente que se viene observando en las últimas décadas acerca de los problemas de nutrición, tanto de los debidos a causas deficitarias de la dieta como a las consecuencias de los excesos.

El libro de Krause es, sin duda una de las contribuciones más importantes a la ciencia de la nutrición, de los últimos tiempos.

J.M. Bengoa

Información para los autores

A. CONTRIBUCIONES A LA REVISTA

La Revista publica Editoriales, Artículos Generales, Trabajos de Investigación y de Nutrición Aplicada, y Cartas al Editor. Para su aceptación, las diversas contribuciones deben tratar temas de nutrición humana o animal, ciencia y tecnología de alimentos, factores socioeconómicos, de orden antropológico o cultural, relacionados con la nutrición humana.

1. Los *Artículos Generales* son revisiones críticas sobre algún tema de interés en el campo de la nutrición y ciencias afines, o discusiones generales que contengan criterios propios o recomendaciones de aplicación práctica, debidamente respaldadas por argumentos válidos.
2. Los *Trabajos de Investigación* se refieren a los resultados de estudios de experimentación llevados a cabo hasta el punto que permite la deducción de conclusiones válidas.
3. Los *Trabajos de Nutrición Aplicada* conciernen a la implementación de medidas basadas en la investigación, cuya finalidad es mejorar el estado nutricional de las poblaciones.
4. Las *Cartas al Editor* son notas cortas, de un máximo de 3 páginas, sobre temas de interés general u observaciones o críticas sobre alguna contribución publicada en la Revista.

B. NORMAS PARA LA ELABORACION DE MANUSCRITOS

1. La elaboración de los manuscritos se regirá de acuerdo a las siguientes normas:
 - papel tamaño carta (21,5 x 28 cm)
 - a máquina o procesador de palabras (Microsoft Word o Word Perfect en diskettes de 3.5)
 - a doble espacio
 - hojas numeradas
 - máximo 18 hojas
 - por triplicado

Los manuscritos que no cumplan con estas condiciones serán devueltos al autor.

2. Los trabajos serán remitidos a los Editores de la revista después de haber sido cuidadosamente revisados por el autor.
3. Los trabajos pueden ser redactados en español, inglés, portugués o francés según la preferencia del autor.

C. ORGANIZACION DEL MANUSCRITO

Se recomienda organizar cada manuscrito como sigue:

1. Título

La primera página del manuscrito debe contener el título completo del trabajo en mayúsculas, nombre completo y apellido del autor, institución de origen con letras iniciales mayúsculas y el resto en minúscula. (En la página siguiente debe indicarse el cargo que cada autor desempeña, identificándolos debidamente).

2. Resumen en el idioma original del artículo

Este debe ser informativo, presentado en hoja separada del texto, y preparado en forma clara y concisa para el lector que no ha leído el texto del artículo. Debe especificar también el propósito, método, resultados importantes y principales conclusiones.

3. Introducción

Debe indicar claramente el objetivo o hipótesis de la investigación y sus relaciones con la nutrición y otros trabajos existentes, evitándose largas revisiones bibliográficas.

4. *Material y Métodos*

La descripción de los materiales debe hacerse en forma concisa. Cuando las técnicas o procedimientos utilizados hayan sido publicados, deberán mencionarse, e incluir sólo los detalles de técnica que representan modificaciones substanciales del procedimiento original. Cuando se utilicen términos locales o regionalismos, éstos deberán ser aclarados mediante su denominación científica o de su uso general.

5. *Resultados*

Estos se presentarán en lo posible en Tablas y/o Gráficas que serán respaldadas por cálculos estadísticos, evitando la repetición de datos y seleccionando la forma que en cada caso resulte adecuada para la mejor interpretación de los resultados. Si hubiera subdivisiones ellas se encabezarán con un subtítulo.

- a) Las gráficas e ilustraciones deberán ser presentadas en fotografías de papel brillante, no montadas, y llevar el nombre del autor y el número correspondiente en el dorso. Cuando sea necesario deberá señalarse la parte superior e inferior de la gráfica.
- b) En caso de dibujos o esquemas, éstos serán realizados en tinta negra en papel de buena calidad. La ubicación de cada gráfica deberá indicarse, a lápiz, al margen del texto marginal. Los símbolos deberán especificarse en la propia gráfica.
- c) Los ejes (coordenadas) de las ilustraciones deben tener una indicación clave del fenómeno que representan, así como de las unidades de medida.
- d) Cada gráfica o ilustración deberá identificarse con la leyenda respectiva y contar con los datos imprescindibles para su interpretación.
- e) Las tablas deben numerarse según su orden de presentación en el texto y se entregarán en hojas aparte.
- f) Cada tabla debe contener un breve título que indique claramente su contenido. Las aclaraciones a las tablas deben hacerse mediante notas al pie, y se identificarán con letras minúsculas consecutivas colocadas como post-fijo superior en la cifra o valor correspondiente. Los encabezamientos de las columnas deben ser cortos o abreviados, incluyéndose, en nota al pie, una aclaración en caso necesario. Las líneas horizontales deben reducirse al mínimo y nunca usar las verticales.
- g) En cada columna se indicará claramente la medida usada por ej. mg/g, etc. Para concentraciones no se debe usar la expresión % sino, por ej. g/100 ó mg/100 ml. Se deben indicar con claridad todas las pruebas estadísticas usadas. Las tablas deben tener toda la información necesaria para su interpretación.
- h) No debe presentarse simultáneamente el mismo material experimental en forma de tablas y gráfica.

6. *Discusión*

Debe ser breve y restringirse a los hechos significativos del trabajo. Es recomendable usar subtítulos en las diversas secciones del manuscrito, indicando las diferentes materias tratadas. En caso que, a juicio de los autores, la naturaleza del trabajo lo permita, puede hacerse una discusión de los resultados inmediatamente después de su expresión, bajo el título general de **Resultados y Discusión**. Lo expresado en los incisos a) y h) en la sección precedente, aplican igualmente a esta sección.

7. *Resumen en inglés*

Todo trabajo deberá acompañarse de un resumen en inglés, si el trabajo original fuese en español, portugués o francés. El título del trabajo también debe redactarse en inglés. Si el trabajo original es en inglés, el resumen debe presentarse en español, así como el título del trabajo también en este idioma.

8. *Agradecimiento (si lo hubiere)*

9. *Citas bibliográficas y Referencias bibliográficas*

Las citas bibliográficas se indican con números arábigos en el texto, entre paréntesis y por orden de aparición, no por orden alfabético de autores.

Para la sección Referencias bibliográficas, al final del trabajo, se aplican las mismas normas y serán presentadas de acuerdo a los siguientes ejemplos:

- a) De revistas:
Liendo Coll, P & JM Bengoa. Necesidades calóricas de la población venezolana. Arch Venez Nutr 5:39-50, 1954.
- b) De libros:
Gómez P, F Silvio & R Gámora. Los Aminoácidos en alimentos. Caracas, Ed Futura, 1972, p.30.
- c) De libros sin autor individual:
Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC. 12th ed. Washington, DC, The Association, 1975, p. 30.
- d) De un artículo o capítulo de un autor(es) consignado en un libro publicado por casa editora:
Hoskins, WG & M Charles. Macaroni production. En: The Chemistry and Tecnology of Cereals as Food and Feed. SA Matz (Ed.). Westport, Conn, The Avi Publishing Co. 1959, p. 274-320.
- e) De citas de compendios:
Krebs, HA & K Henseleit. Urea formation in animal body. Z Physiol Chem, 210:33-66, 1932. (Original no consultado; compendiado en Chem Abst 26: 5624, 1923).

10. *Notas al pie de la página*

Las notas al pie de la página deben ser reducidas al mínimo. Cuando su inclusión sea necesaria deberá indicarse su orden de aparición en el texto mediante números arábigos, consecutivos colocados como post-fijo superior. (Estas notas se redactan, debidamente identificadas, en la 2a. hoja del manuscrito, después de la identificación de los autores).

11. *Abreviatura y siglas*

Se deben usar las abreviaturas aceptadas internacionalmente (American Chemical Society, Journal of Nutrition, British Journal of Nutrition). En caso de utilizarse siglas poco comunes, que se repitan frecuentemente en el manuscrito, deberán indicarse completas la primera vez que se citan, seguidas de la sigla entre paréntesis. De preferencia, deberán usarse las siglas internacionales en vez de la del idioma original del artículo, por ej. DNA, RNA, PER, etc. Todas las abreviaciones y siglas se usan sin punto, g, b, m, etc.

12. *Nomenclaturas*

Deberá usarse la nomenclatura de la Unión Internacional de Ciencias de la Nutrición (IUNS) para vitaminas y otros nutrientes. En las unidades de medición se empleará el Sistema Métrico Decimal. Para las unidades de energía se usarán calorías (Cal) o Joules (J) indiscriminadamente.

13. *Resultados numéricos*

Al consignar números se usará la coma (,) para indicar decimales, p. ej. 35,7; 389,9; y el punto (.) para indicar miles, millones, etc.

D. SEPARATAS

El costo de las separatas o sobretiros de los trabajos es de US \$3.00 por página de 50 separatas. El autor(es) deberá notificar a la Oficina Editorial el número de separatas deseado tan pronto se le informe que su trabajo ha sido aceptado.

E. CARGO POR PAGINA

La Revista es un órgano de divulgación científica sin fines de lucro y es mantenida fundamentalmente con donaciones. Sin embargo, a los efectos de contribuir con los gastos de publicación, la Asamblea General de SLAN ha creado un cargo de US \$ 10,00 por página de trabajo publicado. La Oficina Editorial puede considerar una reducción por concepto de cargo por página previa solicitud dirigida en ese sentido por el autor(es). Tan pronto como su factura sea cancelada, se les proporcionará 15 separatas libres de costo.

Information to authors

A. CONTRIBUTIONS TO THE «ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION» (ALAN)

ALAN publishes Editorials, General Articles, Research and Applied Nutrition Papers and Letters to the Editor. To be accepted, written contributions must discuss nutrition-related topics such as human or animal nutrition, food science and technology, or socioeconomic issues, of an anthropologic or cultural nature, as related to human nutrition.

1. *General Articles* are critical reviews about a topic of interest in the field of nutrition or related sciences, or general discussions containing the author's own criteria or practical applied recommendations supported by valid arguments.
2. *Research Papers* describe results obtained from experimental studies performed and from which valid conclusions may be inferred.
3. *Papers on Applied Nutrition* are concerned with implementation of research-based measures that seek to improve the nutritional status of populations.
4. *Letter to the Editor* are short notes, maximum 3 pages long, on topics of general interest or critical observations about an article published in ALAN.

B. STANDARDS FOR MANUSCRIPTS

1. Manuscripts should be submitted according to the following standard rules:

- letter-size paper (21.5 x 28 cm)
- type or printed
- double-spaced
- numbered pages
- maximum 18 pages
- in triplicate

Manuscripts that do not meet the above standards will be returned to their authors.

2. Papers must be addressed to the Editors of ALAN after a careful review by the author.
3. Papers may be written in Spanish, English, Portuguese or French, according to the author's language of preference.
4. In order to expedite editorial work, a 3.5 disk copy (Microsoft Word or Word Perfect) of the paper is welcome in addition to the three hard copies requested above.

C. HOW THE MANUSCRIPT SHOULD BE ORGANIZED

The following order is recommended:

1. Title

The first page of the manuscript must contain the paper's complete title in capital letters; the author's name and surname and the name of the sponsoring or work institution, where the first letter must be in capitals and the rest, small. (On the next page, authors will identify themselves, stating their title and/or position).

2. Summary in original language

The summary should be informative, prepared on a single page free from the main text. It should describe the purpose, method, important results and conclusions.

3. Introduction

It should state the purpose or research hypothesis clearly and how it relates to nutrition or to other pertinent papers. Long literature reviews should be avoided.

4. *Material and Methods*

Material descriptions should be concise. When techniques or procedures used have been published they should be mentioned, and a detailed description should only be given when there is a substantial variation from the original method or technique. Where local or regional terms are used, an explanation should follow giving the scientific name or a widely accepted term.

5. *Results*

Wherever possible results should be presented in a tabulated or graphical form, backed by pertinent statistical calculations. Data should be presented in a manner that will facilitate result interpretation and avoid repetition. Text subdivisions are to be headed by subtitles.

- a) Graphs and illustrations are to be presented plainly, on shiny photographic paper, with author's name and pertinent number on the back. Where needed, the upper and lower sides of the graph or photograph should be identified.
- b) Drawings or sketches must be done with black ink on quality paper. Graph location must be given in each case with a pencil note on the margin. Symbols must be shown as part of the graph.
- c) Axes (coordinates) on graphs and/or illustrations must include key indications of the phenomena they represent as well as of measuring units.
- d) Each graph or illustration must be identified by its respective legend and include the necessary interpretation data.
- e) All tables must be numbered according to the order they appear in the text and must be presented on separate pages.
- f) Each table must bear a brief title clearly describing its contents. Notes to the tables must be given as footnotes, identified by means of small consecutive letters added as a post-fix above the corresponding figure or value. Column headings should be short or abbreviated and explanations should be provided in a footnote where necessary. Horizontal lines should be used minimally and vertical lines not used at all. Measures used should be shown for each column, ie: mg/g, etc. Concentrations should not be expressed as % but as g/100 ml or mg/100 ml. Statistical tests used must be clearly pointed out. Tables must include all the necessary information for interpretation.
- g) Experimental material should not be presented in a tabulated and graphic manner simultaneously.

6. *Discussion*

The discussion should be brief and keep to the significant parts of the work. The use of subtitles as headings to the different matters raised in the paper is recommended. Subject to the author's judgement, and wherever it may be appropriate, results may be discussed immediately after their expression under a general heading «Results and Discussion». Instructions given in paragraphs a) and h) are also applicable to this section.

7. *Summary in English*

When papers are submitted in Spanish, Portuguese or French, a Summary in English and the paper's Title in English must also be submitted. If the original paper is written in English, then a Summary in Spanish and the paper's Title in Spanish must be submitted too.

8. *Acknowledgements (If any)*

9. *Bibliographic Quotes and References*

Bibliographic quotes are shown by Arabian numbers in the text, in parenthesis and order of appearance, not by authors' alphabetical order.

References, at the end of the paper, will be presented in the same manner as Quotes above and according to the following examples:

- a) From Journals or Magazines: Liendo Coll, P & JM Bengoa. Calorie requirements of the Venezuelan population. Arch Venez Nutr 5:39-50, 1954.
- b) From Books: Gómez P, F. Silvio & R Gámora. Aminoacids in Foods. Caracas, Ed Futura, 1972, p. 30.
- c) From Books with no single author: Association of Official Agricultural Chemists. Official Association of Official Agricultural Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC. 15th ed Washington, D.C., The Association, 1990, p.30.
- d) From an Article or a single Chapter by one or several Authors included in a Book by a Publishing House: Hoskins, WG & M Charles. Macaroni Production. En: The Chemistry and Technology of Cereals as Food and Feed. SA Matz (Ed.) Westport Conn, The Avi Publishing Co., 1959 p. 274-320.
- e) From Quotes in Abstracts: Krebs, HA & K Henseleit. Urea formation in animal body. Z Physiol Chem, 210:33-66, 1932 (Original not consulted; condensed in Chem Abst 26: 5624, 1932).

10. *Footnotes*

Footnotes should be kept to a minimum, but where needed footnotes are to be indicated by order of appearance in the text by means of Arabian numbers in a consecutive manner as a postfix above. (Duly identified footnotes will appear on the second page of the manuscript, after the authors' identification).

11. *Abbreviations and Acronyms*

Internationally accepted acronyms should be used (American Chemical Society, Journal of Nutrition, British Journal of Nutrition). If unusual acronyms are used frequently in a manuscript, the full name they stand for must be given the first time they are used in the text, followed

by the acronym in parenthesis. Preferably, international acronyms should be used instead of those used in the paper's original language, such as DNA, RNA, PER, etc. Abbreviations and acronyms are not to be followed by a point: g, b, m, etc.

12. Nomenclature

Nomenclature as set by the International Union of Nutrition Sciences (IUNS) for vitamins and other nutrients should be used. The metric system will be used for measuring units. Units of energy may be expressed as either calories (Cal) or Joules.

13. Numerical Results

Upon writing numbers, a comma (,) will be used to express decimal, ie: 35,7; 389,9. And the point (.) will be used to express thousands, millions, etc.

D. REPRINTS

The cost of reprints or extra prints is \$3.00 per page per 50 reprints. Authors must advise the Editors Office the number of reprints they wish to order as soon as their paper has been accepted.

E. CHARGE PER PAGE

ALAN is a non-profit scientific publication mainly supported by donations. The Board of Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), however, established a US\$ 10.00 charge per page published to help pay for publishing expenses. The Editor's Office may consider a reduction on the charges per page following a request submitted thereto by the author(s). As soon as the invoice is paid, authors will receive 15 reprints free of charge.

Sociedad Latino Americana de Nutrición

S.L.A.N.

La Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN) fue creada hace más de 25 años con el fin de integrar los esfuerzos de profesionales calificados para promover y mejorar el conocimiento de los problemas nutricionales de los países de la región y de las alternativas de prevención y tratamiento que ofrece la nutrición como ciencia.

Cualquier persona que se encuentre profesionalmente activa o que haya contribuido de manera significativa al avance de la nutrición o disciplinas afines, puede asociarse a SLAN, para lo cual debe enviar una carta de solicitud avalada por dos Socios Activos y su curriculum actualizado. Debe igualmente anexar la documentación que pruebe la publicación de por lo menos, dos trabajos en revistas de nivel internacional en los últimos cinco años.

La solicitud puede dirigirse a la Presidencia de la Sociedad, actualmente en Venezuela, a los vocales representantes de Area o a los Capítulos de SLAN en los respectivos países.

El Consejo Directivo está integrado por: Eleazar Lara Pantin (Presidente), Hernán Delgado (Presidente Electo), Yolanda Hernández de Valera (Secretaria), Maritza Landaeta de Jiménez (Tesorera), Mauro Valencia (Vocal por México y Centro América), Rebeca de Angelis (Vocal por Brasil y Paraguay), Santiago Muzzo (Vocal por Argentina, Chile y Uruguay) y Manuel Grillo (Vocal por las Islas del Caribe).

Los Socios deben pagar una cuota anual de US \$30, que incluye la suscripción de la revista.

El órgano oficial de SLAN es la conocida revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN), que comparte actualmente la sede de la Sociedad en Caracas, Venezuela. Los manuscritos para publicación deben ser enviados al Editor General, Dr. Virgilio Bosch, o al Editor Asociado, Dr. José Félix Chávez P.

La correspondencia para SLAN o ALAN debe dirigirse al apartado 62.778, Chacao, Caracas 1060, Venezuela o a sus números de fax: 58 41 571475 y 58-2-284 8543.

¿CAMBIO DE DOMICILIO?

¿CHANGING YOUR ADDRESS?

Por favor, escriba su nueva dirección abajo y envíela al Departamento de Suscripciones de ALAN, adjuntando la etiqueta de un sobre de envío. Le rogamos avisarnos con 60 días de anticipación/Please print your new address below and return to the Journal Subscription Dept. with our label. Please advise 60 days in advance.

Nombre/Name:

Calle/Street:

Ciudad/City:

Estado, País/State, Country:

Código Postal/Postal Code:

Por favor enviar ALAN a mi nueva dirección a partir de: / Date new address effective:

Sociedad Latino Americana de Nutrición

S.L.A.N.

SOLICITUD DE INSCRIPCION

Nombre: _____

Título Profesional: _____

Estudios de Postgrado: _____

Cargo: _____

Lugar de trabajo: _____

Dirección del trabajo: _____

Código Postal: _____ Ciudad: _____

Teléfono: _____ Fax: _____ Télex: _____

Dirección Postal: _____

Código Postal: _____ Ciudad: _____ País: _____

Teléfono: _____ Fax: _____ Télex: _____

Fecha de la solicitud: _____ / _____ / _____

Anote las referencias bibliográficas de dos de sus publicaciones más recientes:

1. _____

2. _____

Socios de SLAN que le postulan

Nombre:

Firma:

Adjunte su Curriculum Vitae actualizado.

La cuota anual de SLAN es de \$30 con la revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición y de \$10 sin la revista.
Los cheques deben ser emitidos en US \$ a nombre de: SOCIEDAD LATINOAMERICANA DE NUTRICION.

Artes Finales: Amerik Solutions C.A., Caracas, Venezuela
Teléfono (02) 91.30.40 - 9180.48

Portada: Chávez & López, Diseño Gráfico, Caracas, Venezuela
Teléfono (02) 285.55.29

Impresión: Editorial Texto C.A., Caracas, Venezuela
Teléfonos (02) 62.24.85 - 62.87.30

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 está constituida por los siguientes miembros:

Presidente	Dr. Hernán L. Delgado
Presidente Electo	Dr. Alejandro O'Donnell
Secretario	Dra. Rafael Flores
Tesorero	Lic. María Teresa Menchú
Vocal	Dra. Esther Casanueva
Vocal	Dra. Elizabeth Vargas de Frias
Vocal	Dr. Manuel Grillo
Vocal	Lic. Zayda Gotera de Prado
Vocal	Dr. Héctor Araya
Vocal	Dra. Olga María Amancio
Vocal	Dr. Carlos Hernán Daza
Presidente Saliente	Dr. Eleázar Lara Pantin

DIRECTORIO DE ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION

Editor General	Dr. Virgilio Bosch Román
Editor Asociado	Dr. José Félix Chávez Pérez

MIEMBROS DEL CUERPO EDITORIAL PERIODO 1995 - 1997

Dr. Juan de Dios Alvarado	Dra. María L. P. Martín de Portela
Dr. Héctor Araya	Dr. Julio Sergio Marchini
Dr. Manuel Amador	Dr. Reynaldo Martorell
Dr. Jaime Ariza M.	Dr. Manolo Mazariegos
Dr. José María Bengoa	Dr. Luis A. Mejía
Lic. Adriana Blanco M.	Dra. Josefina Morales
Dr. Héctor Bourges R.	Dr. Mario Molina
Dr. Ricardo Bressani	Dr. Santiago Muzzo
Dr. Odoardo Brito A.	Dra. Nelly Pak
Dr. Jesús Bulux	Dra. Myriam Puig A.
Dr. Benjamín Caballero	Dra. María Ester Río
Dra. Sara J. Closa	Dra. María Elena Sambucetti
Dr. Adolfo Chávez	Dra. Nora Slobodianik
Dr. Omar Dary	Dr. Benjamín Torún
Dr. Luiz G. Elías	Dr. Ricardo Uauy D.
Dr. Juan I. Egaña	Dra. Mirtha E. Valencia
Dr. Werner G. Jaffé	Dr. Mauro Valencia J.
Dra. Elena Hurtado	Dr. Tomás Walter
Dr. Miguel Layrissé	Dr. Enrique Yáñez S.

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Contenido

	Páginas
ARTICULOS GENERALES	
Avaliação do programa de merenda escolar do Municipio de Campinas, Brasil Elisabete Salay e José Ferreira de Carvalho	167
TRABAJOS DE INVESTIGACION	
Nutrición Humana	
Balance de minerales durante la recuperación nutricional en lactantes con desnutrición energético-proteica María Verónica Marín Briano, Carlos Castillo Durán y Ricardo Uauy Dagach	172
Mineralización ósea e ingesta de calcio en escolares chilenos Laura Leiva, Raquel Burrows, Ricardo Lillo, Hugo Pumarino y Santiago Muzzo	178
Mineralización ósea en adolescentes que padecieron desnutrición postnatal temprana Santiago Muzzo, Laura Leiva, Ricardo Lillo, Hugo Pumarino, Renata Ernst, y Raquel Burrows	183
Evaluación química y nutricional de un alimento para adultos a base de soja y cereales María Catalina Olguin, Susana Agnese Calderari, María Delia Posadas, Gilda Celina Revelant, María del Carmen Gayol, María Isabel Zingale, Miryam Elsa Vignale, Verónica Beatriz Labourdette, Mariela Balseiro, y Andrés Agustín Torriggino	187
Bioquímica Nutricional	
Alterações histológicas de glândulas submandibulares e testículos induzidas por dietas à base de soja e dieta zinco deficiente em ratos Vanderlei L.C.M, Arruda Veiga M.C.F., Reis N.S. y Tambeli C.H.....	193
Zinc, copper and iron and their interrelations in the growth of sickle cell patients Josefina A. Pellegrini Braga, José Kerbauy, Mauro Fisberg.....	198
Effects of dietary fat and nitrite on plasma and corporal density Rebeca C. de Angelis, Ilza C.M. Terra, Julieta H. Scialfa, Itamar Klemes F.	204
Bacteriología de Alimentos	
Comparación de metodologías para la detección y enumeración de bacterias ácido lácticas en el yogurt Ana Graciela Briceño y Raúl Martínez	207
Residuos de antibióticos en leche pasteurizada distribuida en servicios de nutrición hospitalarios de Costa Rica Rafael Monge, Magaly Caballero, y Rita Coghi	213
Ciencia de Alimentos	
Caracterización bioquímica de las proteínas de jaiba mora (<i>Homalaspis plana</i>) Lilian Abugoch J., Abel Guarda M, y Mario Chiong L.	216
Effect of germination on the protein content and on the level of specific activity of lipoxygenase-1 in seedlings of three soybean cultivars Bordignon J.R., Ida E.L., Oliveira M.C.N., y Mandarino J.M.G.....	222
Nutrición Animal	
Evaluación de los niveles de efectividad de mezclas vegetales en la recuperación de animales con desnutrición proteico-energética precoz y tardía Patricia Liliana Jiménez de Erramouspe y Margarita Armada de Romano	227
Latin Foods. Composición de Alimentos	
Caracterização química da polpa e do óleo do marolo (<i>Annona coriaceae</i>) Tânia da S. Agostini, Heloisa M. Cecchi, y Daniel Barrera-Arellano.....	237
Estudio comparativo de la composición y el valor nutritivo de semillas y concentrados de proteína de leguminosas Rosana Cantoral, Alfredo Fernández-Quintela, J.Alfredo Martínez, y M. Teresa Macarulla	242
NUEVOS LIBROS	249
INFORMACION PARA LOS AUTORES	250