

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición

VOL 63

MARZO 2013

Nº 1

Contenido

Páginas

ARTÍCULOS GENERALES

Changes in food caused by deep fat frying – A review

*Keliani Bordin, Mariana Tomihe Kunitake, Keila Kazue Aracava,
Carmen Silvia Favaro Trindade.*

5

Ajustes endocrino-metabólicos durante el ayuno de Ramadán en jóvenes deportistas

*Guerrero-Morilla Raúl, Ramírez-Rodrigo Jesús, Ruíz-Villaverde Gonzalo,
Sánchez-Caravaca M^a Ángeles, Pérez-Moreno Bárbara Alejandra,
Villaverde-Gutiérrez Carmen.*

14

PERSPECTIVA

Impacto de los factores de riesgo en osteoporosis sobre la densidad mineral ósea en mujeres perimenopáusicas de la Ciudad de Querétaro, México.

*María de los Ángeles Aguilera-Barreiro, José Alberto Rivera-Márquez,
Héctor Miguel Trujillo-Arriaga, Juan Manuel Ruíz-Acosta,
Mario Enrique Rodríguez-García.*

21

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

Bioquímica Nutricional

Prevention of liver steatosis through fish oil supplementation: correlation of oxidative stress with insulin resistance and liver fatty acid content

*Alejandra Espinosa, Rodrigo Valenzuela B., Daniel González-Mañán, Amanda D'Espessailles T.,
Juan Guillermo Gormaz, Cynthia Barrera R., Gladys Tapia O.*

29

Educación en Nutrición

Efecto de una intervención educativa sobre el consumo de frutas, verduras y pescado en familias de niños preescolares y escolares

Gabriela Fretes, Judith Salinas, Fernando Vio. 37

Leche Materna. Composición

Macronutrientes en la leche madura de madres adolescentes y adultas

Thais Álvarez de Acosta, Isabel Cluet de Rodríguez, María Rossell Pineda, Emiro Valbuena, Eva Ugueto, Laura Acosta 46

Microbiología de Alimentos

Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) costarricenses

Juliana von Breymann, Carolina Chaves, María Laura Arias 53

Viability of probiotic *Lactobacillus casei* in yoghurt: defining the best processing step to its addition

Nataly Simões Bandiera, Isadora Carneiro, Alisson Santana da Silva, Edson Renato Honjoya, Elsa Helena Walter de Santana, Lina Casale Aragon-Alegro, Cíntia Hoch Batista de Souza 58

Ciencia de Alimentos

Iron bioavailability in Wistar rats fed with fortified rice by Ultra Rice® technology with or without addition of yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*)

Ceres M. Della Lucia, Maria das Graças Vaz Tostes, Carlos Mário M. Silveira, Livia A. Bordalo, Fabiana C. Rodrigues, Helena Maria Pinheiro-Sant'Ana, Hércia S. D. Martino, Neuza Maria B. Costa 64

Variación del contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos en atún, trucha marina y pámpano sometidos a seis técnicas de cocción

María Isabel Castro-González, Ana Gabriela Maafs-Rodríguez, Fernando Pérez-Gil Romo. 74

LatinFoods. Composición de Alimentos

Antioxidant capacity, phenolic acids and caffeine contents of some commercial coffees available on the Romanian market

Ion Trandafir, Violeta Nour, Mira Elena Ionica 87

NOTAS NECROLÓGICAS 95

FE DE ERRATAS 98

INFORMACION PARA LOS AUTORES 99

Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the Latin American Society of Nutrition

VOL 63

MARCH 2013

Nº 1

Contents

	Pages
GENERAL ARTICLES	
Changes in food caused by deep fat frying – A review <i>Keliani Bordin, Mariana Tomihe Kunitake, Keila Kazue Aracava, Carmen Silvia Favaro Trindade.</i>	5
Endocrine-metabolic adjustments during Ramadan fasting in young athletes <i>Guerrero-Morilla Raúl, Ramírez-Rodrigo Jesús, Ruiz-Villaverde Gonzalo, Sánchez-Caravaca M^a Ángeles, Pérez-Moreno Bárbara Alejandra, Villaverde-Gutiérrez Carmen.</i>	14
PERSPECTIVE	
Impact of risk factors for osteoporosis on bone mineral density in perimenopausal women of the City of Querétaro, México <i>María de los Ángeles Aguilera-Barreiro, José Alberto Rivera-Márquez, Héctor Miguel Trujillo-Arriaga, Juan Manuel Ruiz-Acosta, Mario Enrique Rodríguez-García.</i>	21
RESEARCH PAPERS	
Nutritional Biochemistry	
Prevention of liver steatosis through fish oil supplementation: correlation of oxidative stress with insulin resistance and liver fatty acid content <i>Alejandra Espinosa, Rodrigo Valenzuela B., Daniel González-Mañán, Amanda D'Espessailles T., Juan Guillermo Gormaz, Cynthia Barrera R., Gladys Tapia O.</i>	29

Nutrition Education

Effect of a nutrition education intervention on consumption of fruits, vegetables and fish in families of preschoolers and scholars

Gabriela Fretes, Judith Salinas, Fernando Vio. 37

Breast milk. Composition

Macronutrients in mature milk of teenagers and adult mothers

Thais Álvarez de Acosta, Isabel Cluet de Rodríguez, María Rossell Pineda, Emiro Valbuena, Eva Ugueto, Laura Acosta 46

Food Microbiology

Analysis of the microbiological quality and potential presence of *Listeria monocytogenes* in custard apple (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) and passion fruit (*Passiflora edulis*) pulps from Costa Rica

Juliana von Breymann, Carolina Chaves, María Laura Arias 53

Viability of probiotic *Lactobacillus casei* in yoghurt: defining the best processing step to its addition

Nataly Simões Bandiera, Isadora Carneiro, Alisson Santana da Silva, Edson Renato Honjoya, Elsa Helena Walter de Santana, Lina Casale Aragon-Alegro, Cíntia Hoch Batista de Souza 58

Food Science

Iron bioavailability in Wistar rats fed with fortified rice by Ultra Rice® technology with or without addition of yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*)

Ceres M. Della Lucia, Maria das Graças Vaz Tostes, Carlos Mário M. Silveira, Lívia A. Bordalo, Fabiana C. Rodrigues, Helena Maria Pinheiro-Sant'Ana, Hércia S. D. Martino, Neuza Maria B. Costa 64

Fatty acid variation in yellowfin tuna, spotted weakfish and Florida pompano when submitted to six cooking techniques

María Isabel Castro-González, Ana Gabriela Maafs-Rodríguez, Fernando Pérez-Gil Romo. 74

LatinFoods. Food Composition

Antioxidant capacity, phenolic acids and caffeine contents of some commercial coffees available on the Romanian market

Ion Trandafir, Violeta Nour, Mira Elena Ionica 87

IN MEMORIAM 95

ERRATUM 98

INFORMATION FOR AUTHORS 99

Changes in food caused by deep fat frying – A review

Keliani Bordin, Mariana Tomihe Kunitake, Keila Kazue Aracava, Carmen Silvia Favaro Trindade

Department of Food Engineering, University of São Paulo.
Pirassununga- SP, Brazil.

SUMMARY. Deep-fat frying is widely used in food industries because of its low cost and high demand, since it produces convenient food of high acceptability. The process is based on the oil-food interaction at high temperatures, which cooks and dehydrates the food, leading to physical and chemical changes, such as starch gelatinization, protein denaturation, flavoring and color production via Maillard reaction. Some food and oil compounds are lost in the frying process, and potentially toxic compounds are developed in the oxidized oil. Although widely studied, many of these compounds have not been fully identified. The purpose of this study was to review literature findings on changes in food caused by the frying process.

Key words: Composition of food, frying oil, sensory changes

RESUMO. Alterações nos alimentos causados pelo processo de fritura- Revisão. O processo de fritura é amplamente utilizado em indústria de alimentos devido ao baixo custo e alta demanda pela praticidade e grande aceitação. O processo é baseado na interação óleo-alimento a altas temperaturas, que cozinha o alimento e desidrata, levando a alterações físicas e químicas assim como a gelatinização do amido, desnaturação de proteínas, aroma e produção de cor através da reação de Maillard. Alguns compostos presentes nos alimentos e no óleo são perdidos no processo de fritura, e componentes potencialmente tóxicos são desenvolvidos nos óleos oxidados. Embora diversos tenha havido avanços na identificação desses componentes, muitos ainda não foram identificados. A proposta desse trabalho foi avaliar as alterações nos alimentos causadas pelo processo de fritura.

Palavras chave: Composição do alimento, óleo de fritura, alterações sensoriais

INTRODUCTION

Frying is one of the oldest food processing methods. Its popularity is related to the ease and speed of food preparation and sensory characteristics, such as unique flavor and taste (1). It is a cheap and fast process of simultaneous heat and mass transfer that changes the sensory and nutritional characteristics, as result of complex interactions between food and oil (2).

Frying is an efficient cooking method because it is a result of high temperature and fast heat transfer (3). The oil which the food is immersed, acts like a heat-transferring compound. The process has a preserving action caused by thermal destruction of microorganisms, enzymes and reduction of water activity on the surface of the food (4).

Changes in food and oil depends on the characteristics of the food, oil type, surface/volume ratio of the oil, rate of air incorporation of into the oil, temperature, heating process, length of immersion and the

kind of material the frying container is made of. Additionally, the longer the oil is used, greater is the induction of adverse reactions. Extended exposure of oil to high temperatures and atmospheric air can generate highly oxidized, potentially toxic products (5).

In foods, some reactions that affect the nutritional quality may occur (6,7). The frying process relies on high temperatures and can changes the structure of labile nutrients, such as proteins, vitamins and antioxidants. Some water-soluble molecules, such as ascorbic acid can be lost during the water evaporation.

Furthermore, the intake of fried foodstuffs increases the consumption of fats and oils (8). High consumption of food rich in fat has been linked with several metabolic diseases, including obesity, which is a public health problem (9).

In spite of the numerous studies on changes in the oil during the frying process, little information has been compiled about the changes in food. Therefore, the purpose of this review was to highlight important

knowledge on the changes that occur within the food during the frying process.

The frying process

Simultaneous mass and heat transfer by hot oil modifies the food surface, forming a crust that preserves flavors and retains part of the juiciness of the food while it is cooked, making chewing and digestion easier (1).

Deep-fat frying oil reaches 175°C in average, ranging from 150 to 200°C (10). Temperature in the frying is very heterogeneous: the highest temperatures (which are close to oil temperatures) are observed in the peripheral region of the food while the core of the food, rich in water, shows temperatures around 100°C (usually between 101 and 103°C). Consequently, the rate of nutrient degradation in the peripheral region is higher than in the center (11).

The rate of heat transfer is influenced by the composition of the food and its properties of heat and mass transfer, including thermal conductivity, thermal diffusivity, specific heat and density. These characteristics change during the frying process, once oil and food are altered. Besides, there are other changes caused by interactions between food compounds (1).

Frying can be accomplished in batch or continuous fryers. Batch fryers are typically smaller and primarily used in catering service. Continuous fryers, which are capable of handling large amounts of frying oil and foods, are primarily used in industrial settings, and involve large-scale production. Fryers can be operated under atmospheric, high or low pressure, and even under vacuum (12). However, most large-scale production is done under atmospheric conditions.

Physical and chemical changes in fried foods

The conditions to which food are submitted during the frying process initiate physical and chemical changes that depend on the composition of the food, and affect the development of color, flavor, and taste, besides changing food texture.

Table 1 summarizes the physical and chemical changes in food during the frying pro-

cess. A portion of frying oil and polar compounds produced by oil degradation are absorbed by food, contributing to the quality of the final product. An amount of water evaporates due to the dehydration that occurs during frying process. Furthermore, starches gelatinize, proteins denature, some nutrients are lost (such as the vitamins thiamin and riboflavin, which are unstable at high temperatures), flavors develop, crispness is produced and pores are formed, leading to distinctive texture and sensory characteristics (1).

The content of carbohydrates and protein in raw material, strongly interacts with lipids, especially with thermal and oxidative degradation products (Maillard reaction products, reticulated proteins), generating toxic and carcinogenic compounds (13, 14).

Changes in color, taste, and flavor caused by Maillard reactions and caramelization

Changes in the food surface may be caused by caramelization and / or Maillard reaction (both responsible for the development of gold to brown hues), as well as evaporation of surface water, which characterizes crust formation, responsible for the texture of fried food (15). Color development in potato chips, for example, is proportional to the amount of reducing sugars in the potato, since both browning and Maillard reactions are stimulated by the level of oxidation of the food, and also by characteristics of heme pigments (15).

Maillard (non-enzymatic browning) is considered the most important reaction in the browning of food (16). During frying, this is the main reaction affecting

TABLE 1. Main changes in the composition of foods during the frying process

Component	Changes during frying
Fat	Increased concentration and change in composition
Water	Significant loss
Reducing sugars	Maillard reaction
Starch	Gelatinization
Proteins	Alteration of the composition
Amino acids	Formation of heterocyclic flavoring substances
Flavoring substances	Formed by oxidative and Maillard reactions
Vitamins	Interaction with frying oil
Minerals	Moderate loss
Antioxidants	Small loss
	Moderate loss

Source: Adapted from Pokorny (66).

sugars which involves free amino groups of amino acids, peptides, proteins, and carbonyl groups or other aldehydes, and ketones of sugars. Several intermediate products, called Amadori products or pre-melanoidins, are rapidly polymerized at frying temperatures, forming dark-colored molecules (melanoidins). Browning is faster at temperatures above 150 °C (17).

Among all the compounds produced by Maillard reaction, there is an increasing interest in toxic compounds, like acrylamide. Acrylamide has been known to be a neurotoxic, genotoxic and carcinogenic compound in animal, and is classified as a probable human carcinogen (18). The acrylamide formation has not been fully elucidated, but it is established that it is formed via the Maillard reaction when asparagine and reducing sugars are heated at high temperature (19, 20). In fact, in one recent study, Miao et al. (21) showed that with the increasing of treatment time and temperature in potato chip, acrylamide contents were increased accordingly. Water activity could also influence the formation of this compound, with the decrease of water activity, the formation of acrylamide increased (21).

Besides Maillard and caramelization, frying oil can also take part in the non-enzymatic browning process by reaction of lipid oxidation products with amines, amino acids and proteins (22; 23).

Color, taste, and flavor changes caused by the oil

When food is immersed in hot oil in the presence of O₂, the oil is exposed to three agents that cause changes in its composition: water from the food (which causes hydrolytic changes), oxygen (that gets in contact with the oil and causes oxidative changes from the surface to inside of the food) and finally, the high temperature (which causes thermal changes, such as isomerization and scission reactions - aldehydes and ketones - forming various degradation products, as epoxides and hydroperoxides (15,24).

The characteristics of color, taste and flavor of fried products are also developed by a combination of reactions and compounds absorbed by the frying oil. The main factors affecting the changes in color and flavor during the process are the oil type, storage and thermal changes, interfacial tension between the oil and the product, temperature and length of frying, moisture content, size and characteristics of food surface and pre-frying treatments (4).

Lipid oxidation generates volatile and non-volatile compounds that interfere in taste and flavor. The volatiles in the frying oil increase at the beginning of the process, but decrease during the frying. There are volatiles important to the quality of the process, such as saturated aldehydes C6-C9, enals (e.g., 2-decenal), dienals (e.g., 2,4-heptadienal), and hydrocarbons (hexene, hexane, heptane, octane, nonane, and decane). The formation of nonvolatile decomposition products is due to the oxidation and polymerization of unsaturated fat acid. Aldehydes affect the flavor of deep-fried foods, as 2-Trans-4-trans-decadienal that contributes to a flavor while other aldehydes produce off flavor (25).

Thermal stability of oils depends on their chemical structure. According to Reda (15), saturated oils are more stable than unsaturated ones. Unsaturated fatty acids are the main precursors of the volatile compounds found in oxidized oils (26,27). Linolenic acid is an unsaturated fatty acid essential to health that is rapidly lost in the frying process, altering the balance between saturated and unsaturated fatty acids in the oil (4), and increasing off-flavor formation (28).

The uses of the oil during a long time and/or its reuse lead to formation and accumulation of undesirable substances. These compounds may be related to the release and dissolution of food particles, or products of thermal and oxidative reactions in the oil. All these factors contribute to increase oil viscosity, decrease surface tension between the food and the oil, and increase the supply of oil on the food surface, facilitating oil absorption (29, 30).

Incorporation or absorption of oil depends on the initial quality and type of oil or fat used (31). According to Paul and Mittal (32), many factors affect the penetration of oil into the food, such as the geometric shape, oil viscosity, food type, oil temperature, and length of frying.

Changes in texture

According to Fellows (4), development of texture inside the food during the frying process is a result of the combination of changes in proteins, fats and carbohydrate polymers similar to those that occur during boiling or baking.

The development of pores is a major structural change. Pores are formed by evaporation of water and formation of capillaries. Intense heat leads to explosion during evaporation of water, creating wide pores. A superficial crust is quickly formed, acting as a ba-

rier to evaporation, decreasing the loss of water and keeping the inside of the food moist. Starch gelatinization and protein denaturation also contribute to the development of pores and shrinkage of food because gelatinized starch is usually dispersed in the continuous phase formed by protein denaturation. According to Ngadi and Xue (1), the presence of pores affects mechanical properties of the food and, consequently, its texture and acceptability.

The structure of a protein is the result of various intermolecular attraction and repulsion interactions, such as the interaction of protein groups with water. Changes in natural structural conditions of the protein can be result of changes in temperature, pH, surface tension, presence of salt, and other agents that disrupt the intra- and intermolecular interactions, causing changes in the structure and breaking the protein in amino acids chains. These amino acids can form spherical aggregates which interact and originate the gel network (33).

Nutritional changes

Changes in the lipid fraction of foods

Some lipids present in fried food are oxidized, may be accelerated by temperature increasing and oxygen concentration. Although nutritional effects are difficult to be estimated due to the variety of interfering factors, such as the type of oil, history of thermal treatment, and portion retained in the food (4). Due to oil incorporation, it is important that the choice of the frying oil is based not only on its technological characteristics, but also on its nutritional features (34).

The increase in energy intake is one of the principal problems associate with consume of frying foods. The fat content of food increases due to absorption and retention of oil, which implies an increase in energy intake on average in 42% in French fries and 53% in hamburger (35). The Dietary Guidelines for Americans recommend that less than 35% of daily calories be contributed from fat, but in fried foods, up to 75% of calories can be from fat (36).

Digestibility of fat is also changed when the process is accomplished using reused oils / fats. Even if a frying oil regulation is established, limiting polar compounds to 25 % and polymer content to 12 %, potentially toxic compounds can appear in oil (2).

The hazardous compounds presently identified are potentially carcinogenic molecules, such as carbonyl compounds or monoepoxides, and some aldehydes

produced from linoleic acid. For example, 4-hydroxy-2-transnonenal has been proven to be cytotoxic (2, 37).

Frying process also can produce trans fatty acids (TFAs). TFAs are defined as unsaturated fatty acids that contain non-conjugated carbon-carbon double bounds in the trans configuration and epidemiologic studies suggested that there is a relationship between the level of these compounds intake and the risk of cardiovascular disease (38, 39).

TFAs formation in the oil during frying have been investigated (39, 40, 41). According to these studies, degrees of TFAs formation during frying depended on three main factors: frying condition, frying materials and the methods of TFAs measurements (39).

Changes in protein content

Nutritive value of food proteins is a combination of quality and quantity. Quality represents functional content of the protein consumed and used by the organism. Quantity represents the protein content in the food. Heat treatment can reduce the amount of protein and destroy some amino acids, changing the quality of protein composition in food (42).

Nevertheless, the protein content increased after frying in grass carp fillet (43). In another study, proteins of the fried sardine were higher than those of the untreated ones. This may be due to the formation of new products similar to protein during the frying processes and could have influenced the determination of protein content using Kjeldahl method (44, 45).

The frying process reduced the amino acid contents, with the lowest value was obtained in samples fried in palm oil (46). Deep-fat frying had been reported to decrease the available lysine of fish fillets by about 17% and by 25% when the fish oil had been used for continuous frying for 48 h as a result of interactions between the amino group of lysine and carbonyl compounds (46).

Netherless, no significant effect of the frying practices was found on the amino acid content (lysine, histidine, threonine, valine, methionine, leucine, isoleucine, phenylalanine, arginine, aspartic acid, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, cystein and tyrosine) of selected fishes (45). A study on the amino acid contents of raw, cooked and fried fishes no found differences in individual amino acids as result of frying (47).

In general, the content of protein is increased by

the frying process due the effect of concentration, because frying is also a process of dehydration. In relation of essential aminoacids, there is no agreement in the literature about it loss. However, lysine is the first aminoacid involved in Maillard reaction, so it is supposed to be lost during frying process.

Content of minerals

The content of minerals seems to have no significant loss. Studies found that minerals are relatively preserved by frying, especially at high temperatures (165 to 185 oC), and short cooking time (48, 49). Özeren and Ersoy (50) evaluated fish processing and observed a small increase in the concentration of minerals such as Na, K, Ca, Mg, Fe and Zn after frying, probably due to a concentration effect. In a study with rainbow trout fillets the minerals (Na, Ca, Mg, K, P, Fe and Zn) increased significantly during the frying process (51).

Another study determined the effects on the content of minerals and heavy metals of frying frozen seafood. The process of frying increase significantly the content of macro and microelements as well as the content of heavy metals (Na, Mg, Ca, Cu, Fe, Zn, Pb, Cd and Hg), except for K and Mg content in mussels and shrimps, respectively (52). How was related to protein, the content of some minerals can increase with frying due the effect of concentration.

Changes in vitamin content and degradation of antioxidants

Vitamins are thermosensitive and their oxidation depends on the internal temperature of the food and frying process. Vitamin C usually is the most thermosensitive. Among B group vitamins, thiamine, riboflavin, niacin and B6 are the most frequently affected by the process (15).

Biswas and Nanni (53) reported moderate loss of vitamin C when frying fruits in soybean oil. Loss of vitamins is caused by high temperatures or enzymatic oxidation during the preparation process or long periods of frying (54). Speek *et al.* (55) investigated the effect of processing on carotenoids in vegetables, indicating an average loss of 14 % and 24 % for vitamin A activity in boiling and frying, respectively.

Manorama and Rukmini (56) investigated the effects of processing on the preservation of beta-carotene in palm oil. Total beta-carotene was eliminated in

the first frying operation, but the mixture of other types of carotenes, even with some losses, was still found in the oil. Some carotene oxidation products were identified in heated palm oil, indicating that the loss of beta-carotene during frying is probably partly due to the oxidation of the compound (57,58).

Retinol, carotenoids and tocopherols are destroyed, changing oil flavor and color. However, preferential oxidation of tocopherols has a protective (antioxidant) effect which is particularly important, since the majority of the frying oils is of vegetable origin, showing great amounts of unsaturated, rapidly oxidized fats (4). In oils with different unsaturation degrees, degradation was significantly higher when tocopherols were absent, can to be related with tocopherols type (59). Kourimska and Gordon (60) reported that the content of α -tocopherol was lost more quickly than other tocopherols of canola oil, with a 50 % reduction after 4-5 frying operations.

The influence of home cooking methods, such as frying on the antioxidant activity of vegetables was evaluated. Garlic showed losses higher than 50%, asparagus between 30% and 40%, Swiss chard, cauliflower, and pepper between 5% and 30% considering ABTS radical scavenging capacity (53).

Alterations in starch and indigestible polysaccharides (fibers)

The most common polysaccharide in food is starch. Amylose and amylopectin dissolve in water with heat forming a polymer network, leading to starch gelatinization (33). Gelatinization occurs after denaturation of globular proteins at high temperatures and involves carbohydrates, proteins, lipids and water (33).

When raw potato products are fried, changes in starch are very important. Starch granules are rapidly gelatinized upon contact with hot oil. The rigid structure of raw potatoes is lost in 1–2 min, and the fried chips become soft. On further heating, a firm crispy crust is formed on the surface of fried particles, which is highly appreciated by the consumer. On the surface of chips, where the water content is much lower than in internal layers, the gelatinization is not so intense, so starch granules partially retain their crystalline structure (61).

Studies about the dietary fiber content indicated that cooking of frozen French fries had no effect on starch composition compared with fresh samples,

while frying significantly increased the percentage of resistant starch, partially attributed to the formation of amylose-lipid complex (62), increasing fiber content.

High-molecular-weight non-starch polysaccharides (dietary fiber) decompose during the preparation of French fries, especially in the case of low-specific gravity tubers. However in some cases dietary fiber increased during frying, possibly caused by the formation of melanoidins or other indigestible compounds. Besides, polysaccharides form a compact film on the surface at the beginning of the heating process, preventing fat migration into the fried food and loss of water (61, 63).

Changes of the oil caused by heating

The chemical reactions occurred during deep-fat frying involve hydrolysis, oxidation, isomerization and polymerization (Table 2) resulted in the generation of free fatty acids, small molecular alcohol, aldehyde, ketone, acid, lactone and hydrocarbon, diglyceride and monoglyceride, cyclic and epoxy compounds, trans isomers, monomer, dimer, oligomer (23, 64).

The degree of unsaturation of the fatty acids is the main factor affecting the oxidative stability of oil/fat. In general, oils that are more unsaturated oxidize more rapidly than less unsaturated ones. Minor components such as metals, free fatty acids, mono- and diacylglycerols can negatively affect frying stability of oil (65).

Reused oil gives better characteristics to the fried product, compared with oil that did not undergo temperature changes, because of the polar compounds that impregnate the food surface, providing flavor, impro-

ving contact between the oil and water on the surface of the product, and catalyzing heat transfer (66). However, the quality of the oil is affected when it is used for long periods. In continuous commercial production, oil is retained in the product and should be continuously replaced, and non-volatile products formed should be removed by filtration in order to maintain the oil quality (4).

Free fatty acids, mono- and diglycerides are hydrolysis products and represent about 2.5 to 4 % of the acidity of disposable oil. Its oxidation and reactivity rate is generally higher than triacylglycerols, making it easier for changes to take place. Free acidity in oil is a measure commonly used to control the quality of frying oils. Free fatty acids are also negative factors because they lower the smoke point (4).

Depending on the amount of water that the frying process removes from the food and that is mixed with triacylglycerols (TAG), these compounds may be hydrolyzed and form free fatty acids (FFA), monoacylglycerols (MAG) and diacylglycerols (DAG) and/or be oxidized by incorporation of oxygen from the surface, forming peroxides, hydroperoxides, conjugated dienes, epoxides, hydroxides and ketones. These compounds may be decomposed in small fragments or remain in the TAG molecule and bind with each other, leading to TAG dimers, polymers (5, 31).

Final Considerations

The interactions between frying oil and fried food are of great relevance for nutritional quality of the final product. Foods are complex and heterogeneous matrices, and all changes produced by frying occur simul-

TABLE 2. Main groups of compounds formed in oils during the frying process

Type of change	Causative Agent	New compounds formed
Hydrolytic	Moisture	Free fatty acid Diacylglycerols Monoacylglycerols
Oxidative	Air	Oxidized monomers Oxidized dimers and polymers Volatile compounds (aldehydes, ketones, hydrocarbons) Sterol oxides
Thermal	Temperature	Dimers and non-polar polymers Cyclic Monomers Trans isomers and position isomers

Source: Navas (17).

taneously and contribute to the development of color, taste, texture and quality of fried products. Depending on the composition of the food, there may be a predominance and/or intensification of a particular reaction, which is difficult to delineate and analyze separately. The frying process can cause changes in the structure of labile nutrients, such as proteins, vitamins and antioxidants. Some compounds produced during frying process such as trans-fat acid and acrylamide are a public health problem. It is therefore very important to identify and evaluate their effects on human health and also how to reduce the production of these compounds during frying.

REFERENCES

1. Ngadi M, Xue J, Food Frying: Modifying the Functional Properties of Batters. In: Novel Food Processing: Effects on Rheological and Functional Properties, Ahmed, J., Ramaswamy H.S., Kasapis S., Boye J.I.B. (Eds), CRC Press, Canada. 2009, p. 437-457.
2. Ziaifar AM, Achir N, Courtois F, Trezzani I, Trystram G: Review of mechanisms, conditions, and factors involved in the oil uptake phenomenon during the deep-fat frying process. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2008; 43: 1410–1423.
3. Sanibal EAA, Filho JM.: Physical, chemical and nutritional oils subjected to the frying process. *Food. Ingrid. South Am.* 2002.
4. Fellows PJ: Food processing technology. Principles and Practice, Artmed, São Paulo, Brazil; 2006, P. 608.
5. Del Ré PV, Jorge N.: Behavior of vegetable oils for frying discontinuous frozen pre-fried products. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2006; 26: 56-53.
6. Ans VG, Mattos ES, Jorge N.: Quality assessment of frying oils used in restaurants and similar. *Ciênc. Tecnol. Alim.* 1999; 19: 413-419.
7. Corissin MS, Jorge N.: Oxidative changes in oils from cottonseed, sunflower and palm oil used for frying frozen cassava. *Alim. Nutri.* 2005; 17: 25-34.
8. Albuquerque TG, Sanches-Silva A, Santos L, Costa H. An update on potato crisps contents of moisture, fat, salt and fatty acids (including trans-fatty acids) with special emphasis on new oils/fats used for frying. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 2012; 63: 713–717.
9. WHO. World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series No. 916. Geneva: WHO. 2003.
10. Combe N, Rossignol-Castera A.: Vegetable oils and frying. *Cahiers de Nutrition et de Diététique.* 2010; 45 : 44-51.
11. Moreira RG, Castell-Perez ME, Barrufet MA.: Deep-fat frying: Fundamentals and applications. MD: Aspen Publishers, Gaithersburg, 1999, p. 350.
12. Mallikarjunan PK, Ngadi MO, Chinnan MS.: Breaded Fried Foods. CRC Press, Boca Raton, FL, 2010, p. 179.
13. Sikorski ZE.: Chemical and Functional Properties of Food Proteins, Z.E. Sikorski, (Ed.), Technomic Publishing Company. 2001, p. 490.
14. Tynek M, Hazuka Z, Pawlowicz R, Dudek M.: Changes in the frying médium during deep-frying of food rich in proteins and carbohydrates. *J. of Food Lipids.* 2001; 251-261.
15. Reda S.Y.: Comparative study of vegetable oils subjected to the thermal stress. Master Dissertation, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2004.
16. Davis HT.: Factors Determining Emulsion Type: Hydrophile-lipophile Balance and Beyond. *Colloids Surfaces.* 1994; 91: 9-24.
17. Navas SJA.: Optimización y control de la calidad y estabilidad de aceites y productos de fritura. PhD Thesis, Universidade de Barcelona, 2005.
18. IARC. IARCMonographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, WHO, Some industrial chemicals, acrylamide. 1994; 60:389–433.
19. Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA.: Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature.* 2002; 419: 449–450.
20. Kalita D, Jayanty S.: Reduction of acrylamide formation by vanadium salt in potato French fries and chips. *Food Chemistry,* 2013; 138: 644–649.
21. Miao YT, Zhang HJ, Zhang LL, Wu, AJ, Sun YJ, Shan Y, Yuan Y.: Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation in reconstituted potato chips during frying. *J Food Sci Technol,* 2013.
22. Zamora R, Hidalgo FJ: Coordinate contribution of lipid oxidation and maillard reaction to the nonenzymatic food browning. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition,* 2005; 45: 49–59.
23. Velasco J, Marmesat S, Dobarganes CM: Chemistry of frying. In: *Advances in Deep Fat frying of foods,* Sahin, S., Sumnu, S. G., CRC Press, Boca Raton, FL, 2008, p. 33-51.
24. Moretto E, Fett R.: *Technology of Vegetable Oils and Fats.* Varela, São Paulo, Brazil, 1998, p. 150.
25. Boskou D. Frying fats. In: *Chemical and functional properties of food lipids.* Sokorski ZE, Kolakowska A. CRC Press. 2002, p. 385.
26. Morales MT, Rios JJ, Aparicio R: Changes in the Volatile Composition of Virgin Olive Oil During Oxidation: Flavors and Off-Flavors. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45: 2666–2673.

27. Kiritsakis AK. Flavor Components of Olive Oil—A Review. *J. Am. Oil Chem Soc.* 1998; 75: 673-681.
28. Solinas M, Angerosa F, Camera L. Oxidation Progress in Vegetable Oils During Frying: Determination of Volatile Components by HRGC and HPLC. *Riv. Ital. Sost. Grasse.* 1998; 65: 567-574.
29. Dobarganes MC, Velasco J, Dieffenbacher A.: Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols and diacylglycerols in oils and fats. *Pure Applied Chem.* 2000; 72: 1563-1575.
30. Jorge N, Soares BBP, Lunardi VM, Malacrida CR.: Physical-chemical alterations of sunflower oils, corn and soybeans for frying, *Quím. Nova.* 2005; 28: 947-951.
31. Del Ré PV, Jorge N.: Behavior of sunflower oil, soybeans and corn for frying of breaded meat product pre-fried frozen, *Ciênc. Agrotec.* 2007; 31: 1774-1779.
32. Paul S, Mittal GS.: Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 1997; 37: 635-662.
33. Belitz HD, Grosch W.: *Química de Los Alimentos*, Acirbia, Zaragoza, 1997, p. 1087.
34. Mellema M.: Mechanism and reduction of fat uptake in deep-fat fried foods. *Trends Food Sci. Tech.* 2003; 14: 364-373.
35. USDA. United States Department of Agriculture. 2013. <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/6572> Accessed in 09/06/13.
36. Myers AS, Brannan RG.: Efficacy of fresh and dried egg white on inhibition of oil absorption during deep fat frying. *Journal of Food Quality*, 2012; 35: 239-246.
37. Seppanen CM, Saari Csallany A. Formation of 4-hydroxynonenal, a toxic aldehyde, in soybean oil at frying temperature. *J. of the Am. Oil Chemists' Society.* 2002; 79: 1033-1038.
38. Mozaffarian D, Pischon T, Hankinson SE, Rifai N, Joshipura K, Willett WC. Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004; 79: 606-612.
39. Tsuzuki W, Matsuoka A, Ushida K. Formation of trans fatty acids in edible oils during the frying and heating process. *Food Chem.* 2010; 123: 976-982.
40. Aladedunye FA, Przybylski R.: Degradation and nutritional quality changes of oil during frying. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 2009; 86: 149-156
41. Bansal G, Zhou WB, Tan TW, Neo FL, Lo HL.: Analysis of trans fatty acids in deep frying oils by three different approaches. *Food Chemistry*, 2009; 116: 535-541.
42. Henry CJK.: Impact of fried foods on macronutrient intake, with special reference to fat and protein. *Grasas y Aceites.* 1998; 49: 336-339.
43. Zhang J, Wu D, Liu D, Fang Z, Chen J, Hu Y, Ye X.: Effect of cooking styles on the lipid oxidation and fatty acid composition of grass carp (*ctenopharynyodon idellus*) fillet. *Journal of Food Biochemistry*, 2013; 37: 212-219.
44. Deman JM.: *Principles of Food Chemistry*, 3rd ed., Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD, 1999, pp. 118-49.
45. Ismail A, Ikram EHK.: Effects of cooking practices (boiling and frying) on the protein and amino acids contents of four selected fishes. *Nutrition & Food Science.* 2004; 34: 54-59.
46. Oluwaniyi OO, Dosumu OO, Awolola GV.: Effect of local processing methods (boiling, frying and roasting) on the amino acid composition of four marine fishes commonly consumed in Nigeria. *Food Chemistry*, 2010; 123: 1000-1006.
47. Steiner-Asiedu M, Daniel A, Njaa LR.: Effects of local processing methods (cooking, frying and smoking) on three fish species from Ghana: part 2 – amino acids and protein quality, *Journal of Food Chemistry*, 1991; 41: 227-36.
48. Gokoglu N, Yerlikaya P, Cengiz E. Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Food Chem.* 2004; 84: 19-22.
49. Avallone S, Rojas-Gonzalez J, Trystram G, Bohuon P.: Thermal Sensitivity of Some Plantain Micronutrients during Deep-Fat Frying. *J. Food Sci.* 2009; 74.
50. Ozeren A, Ersoy B.: The effect of cooking methods on mineral and vitamin contents of African catfish. *Food Chem.* 2009; 115: 419-422.
51. Asghari L, Zeynali F, Sahari MA.: Effects of boiling, deep-frying, and microwave treatment on the proximate composition of rainbow trout fillets: changes in fatty acids, total protein, and minerals. *J. Appl. Ichthyol.* 2013: 1-7.
52. Czech A, Stachyra K.: Effect of processing treatments (frozen, frying) on contents of minerals in tissues of 'frutti di mare'. *International Journal of Food Science and Technology*, 2013, 48: 238-245.
53. Jimenez-Monreal AM, Garcia-Diniz M., Martinez-Tome M, Marical M, Murcia A.: Influence of Cooking Methods on Antioxidant Activity of Vegetables. *J. Food Sc.* 2009; 74: 97-103.
54. Somsu W, Kongkachuichai R, Sungpuag P, Charoensiri R.: Effects of three conventional cooking methods on vitamin C, tannin and myo-inositol phosphates contents in selected Thai vegetables. *J. Food Comp. Anal.* 2008; 21: 187-197.
55. Speek AJ, Speek-Saichua S, Schreurs WHP.: Total carotenoid and b-carotene content of Thai vegetables and effect of processing. *Food Chem.* 1998; 27: 245-257.

56. Manorama R, Rukmini C. Nutritional evaluation of crude palm oil. *J. Oil Tech. Association*; 1991; 22: 83-87.
57. Wong KC. Oxidation of some components of palm oil. In: *International Developments in Palm Oil*, W. Newall & DA Earp (Eds.), 1977, pp. 187-202.
58. Fillion L, Henry CJK.: Nutrient losses and gains during frying: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 1998; 49: 157-168.
59. Barrera-Arellano D, Ruiz-Méndez MV, Velasco J, Márquez-Ruiz G, Dobarganes M.C.: Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in unsaturation degree and natural antioxidant content. *J. Sci. Food Agric.* 2002; 82: 1696-1702.
60. Kourimska L, Gordon MH.: The effects of antioxidants on changes in oils during heating and deep frying. *J. Sci. Food Agric.* 1995; 68: 347-353.
61. Boskou D, Elmadfa I.: *Frying of Foods: Oxidation, Nutrient and Non-Nutrient Antioxidants, Biologically Active Compounds and High Temperatures*, CRC Press, New York, EUA: 2010, p. 276.
62. Asp N, Bjorck I.: Resistant starch, *Trends Food Sci. Tech.* 1992; 3: 111-113.
63. Rimac-Brnčić S, Lelas V, Rade D, Šimundić B.: Decreasing of oil absorption in potato strips during deep fat frying. *J. Food Eng.* 2004; 64: 237-241.
64. Zhang Q, Saleh SM, Chen J, Shen Q.: Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: A review. *Chemistry and Physics of Lipids.* 2012; 165: 662- 681.
65. Aladedunye FA, Przybylski R.: Minor components in oils and their effects on frying performance. *Lipid Technology*, 2013; 25: 87-90.
66. Blumenthal MM.: A new look at the chemistry and physics of deep-fat frying. *Food Tech.* 1991; 45: 68-71.
67. Pokorny J.: Substrate influence on the frying process. *Grasas y Aceites.* 1998; 49: 265-270.

Recibido: 26-02-2013

Aceptado: 13-06-2013

**COMPLETE SU COLECCION DE
ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION. ALAN.**



Apreciado suscriptor:

Ofrecemos la oportunidad de completar su colección de ALAN a precios reducidos

Escribanos indicando los ejemplares (Volumen y Número) faltantes en su colección a:

OFICINA EDITORIAL

Apartado 62778

Chacao

Fax: (58-212) 286.0061

Caracas 1060

email: info@alanrevista.org

Venezuela

Usted recibirá confirmación de disponibilidad y una cotización de precios

Ajustes endocrino-metabólicos durante el ayuno de Ramadán en jóvenes deportistas.

Gurrero-Morilla Raúl, Ramírez-Rodrigo Jesús, Ruiz-Villaverde Gonzalo, Sánchez- Caravaca M^a Ángeles, Pérez-Moreno Barbara Alejandra, Villaverde-Gutiérrez, Carmen

Facultad de Ciencias de la Salud (Sección de Fisiología).
Ceuta. Granada. Universidad de Granada, España.

RESUMEN. El precepto islámico del Ramadán (R), implica importantes modificaciones fisiológicas debido a las restricciones hídricas y dietéticas a lo largo del día y durante un mes, lo que tiene una especial repercusión física e intelectual de los musulmanes, particularmente en sociedades occidentales, en las que no se producen reajustes horarios para las actividades cotidianas. Entre las modificaciones impuestas por el R, el ayuno intermitente día/noche, desencadena mecanismos de adaptación para rentabilizar el consumo energético. El objetivo del presente estudio ha sido valorar algunos cambios endocrino-metabólicos que acontecen a lo largo de la jornada, durante el mes de ayuno, en jóvenes que tienen que continuar con su actividad y entrenamiento deportivo habitual. Diez jóvenes musulmanes, varones, sanos, sometidos a entrenamiento deportivo, con edades entre 18 y 25 años que realizaron el R. Se analizaron parámetros bioquímicos y hormonales en plasma, una semana previa al R, primera y cuarta del periodo de ayuno (mañana y tarde) y semana posterior. Durante el R, se observa un descenso de los parámetros bioquímicos a lo largo del día, especialmente de la glucemia, siendo estos cambios más evidentes en la primera semana. La concentración de cortisol se encuentran significativamente elevada durante todo el mes, como consecuencia del cambio de ritmo circadiano de secreción. El R obliga al organismo a un ajuste endocrino-metabólico con el fin de preservar la eficiencia energética durante la jornada. Este control se vuelve más eficaz conforme avanza el mes de ayuno y la consecuente adaptación fisiológica.

Palabras clave: Ramadán, ayuno, actividad física, control energético.

SUMMARY. Endocrine-metabolic adjustments during Ramadan fasting in young athletes. The Islamic precept of R implies important physiological modifications due to the hydric and dietetic restrictions along a whole month plus a day, all of which have a crucial repercussion over the physical and intellectual performance of Muslims, particularly in occidental societies, in which there is no hour readjustments for daily activities. Among the imposed modifications by Ramadan in daily habits, intermittent fasting along day and night causes adaptation mechanisms to optimize the energy consumption. The objective of this study was to analyze the metabolic-endocrine changes that happen during daily working hours, along the month of fasting in young subjects who have to continue their usual activities and sport training. Ten young muslim subjects, male, healthy, set to sport training, ages in between 18 and 25 who completed Ramadan. Plasma biochemical and hormonal parameters were analyzed in plasma, a week before Ramadan, in the first and fourth of the fasting month and a week after conclusion. During Ramadan, have been observed a drop of biochemical parameters along daytime, especially those related to glycemia, being these changes stronger in the first week. The concentration of cortisol found to be significantly high during the whole month as a consequence of adaptation to the change of circadian secretion rhythms. Ramadan obliges subject's organisms to readjust their endocrine and metabolic system in order to preserve the energetic efficiency during daytime. This auto control becomes more efficient as long as the month advances due to physiological adaptations.

Key words: Ramadan, fasting, physical activity, energy control

INTRODUCCIÓN

El precepto islámico del Ramadán (R), impone a las personas que lo practican importantes modificaciones fisiológicas y psicológicas debido a las restricciones hídricas y dietéticas a las que se ven sometidos desde la salida hasta la puesta del sol, a lo largo de un

mes, lo que tiene una especial repercusión en el rendimiento físico e intelectual, particularmente en las sociedades multiculturales de tipo occidental, en las que no se producen los reajustes horarios en las actividades cotidianas, que sí son habituales en los países de mayoría musulmana (1-4).

La situación de ayuno diurno alternando con la ingesta nocturna propia del R representa un cambio importante de hábitos que repercuten cualitativa y cuantitativamente en la dieta (3), lo que implicaría ajustes en los mecanismos fisiológicos de control de la homeostasis energética, en forma de respuestas y adaptaciones endocrino-metabólicas, dado lo prolongado del periodo. El estudio de los mecanismos de adaptación endocrino-metabólicas, en relación a los procesos energéticos durante el transcurso del ayuno y en dos momentos de una misma jornada (mañana y tarde) en jóvenes deportistas que residen en sociedades occidentales, continúa sin ser esclarecido. Se ha informado de cambios circadianos que afectan a la oxidación de los diferentes nutrientes, con modificaciones del cociente respiratorio por aumento en la oxidación de grasas y disminución en la de hidratos de carbono, como estrategia de compensación metabólica para mantener la composición corporal (5). Según otros autores, para conservar la energía almacenada, se produce una disminución del metabolismo (6). Por otra parte, se ha querido generalizar un modelo de respuesta al ayuno, según el cual, la mayoría de los parámetros metabólicos estarían incrementados durante los primeros días de ayuno, como consecuencia de las restricciones en la ingesta y de la hemoconcentración que sigue a la deshidratación por la falta de aporte de líquidos. Posteriormente, como resultado de un proceso de adaptación, se produciría la estabilización de dichos parámetros para volver a los valores previos al ayuno una vez finalizado el R (1, 2). Evidencias previas de un modelo de esta naturaleza se encuentran en otro trabajo, en el que se informa de incrementos de colesterol, ácido úrico y urea, durante los primeros días de R (7).

Con relación a la glucemia, diferentes autores refieren un descenso en los niveles plasmáticos diurnos, como consecuencia de las condiciones impuestas por el ayuno (8-12). No obstante, hay autores que no han constatado este descenso, refiriendo cifras de glucemia similares antes y durante el ayuno (11, 12).

Respecto a la dieta, se describen cambios en la misma durante el mes del R, observándose un aumento del consumo de glucosa y proteínas en detrimento de la ingesta de grasas (3).

En relación con parámetros hemodinámicos y R, la bibliografía muestra variaciones moderadas de la presión arterial (PA) y descenso de la frecuencia cardíaca (FC) (4, 13), que se justifican por los cambios en los

patrones de sueño y la alteración nutricional, durante este periodo. Se han comunicado descensos progresivos que afectan tanto a PA como FC, relacionados con la reducción de la volemia por la deshidratación y la disminución del tono simpático (6, 14).

Nuestro principal objetivo ha sido valorar los cambios endocrino-metabólicos que acontecen a lo largo de la jornada, durante el mes de ayuno, en jóvenes que tienen que continuar con su actividad y entrenamiento físico-deportivo habitual, para aproximarnos a la realidad de estos adolescentes que tienen que compaginar el Ramadán con su vida cotidiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño: Se ha seguido un diseño longitudinal de muestras pareadas durante el periodo de ayuno, estructurado en seis sesiones, *Semana Previa:* Siete días antes de iniciarse el R por la mañana (Sesión 1); *Semana 1:* A los siete días del comienzo por la mañana y por la tarde (Sesiones 2 y 3); *Semana 4:* El día 24º de ayuno por la mañana y por la tarde (Sesiones 4 y 5) y, finalmente, *Semana Posterior:* La semana posterior al ayuno, por la mañana (Sesión 6). En cada sesión se recogieron muestras de sangre y de orina, para determinaciones bioquímicas, hormonales y hematológicas, además de realizar medidas antropométricas y registro de constantes fisiológicas. Las muestras se obtuvieron en las sesiones previstas en horarios de mañana (08:00 a 09:00) y de tarde (17:00 a 18:00). La insulina se determinó por radioinmunoanálisis (RIA). Para el resto de determinaciones se utilizaron las técnicas habituales de laboratorio con el autoanalizador Hitachi 911 Boehringer. Para las determinaciones hemodinámicas se usó un tensiómetro aneroides Riester.

Muestra: Un total de 10 jóvenes musulmanes, varones sin patología conocida, con edades comprendidas entre 18 y 25 años, fueron seleccionados aleatoriamente entre jóvenes residentes en Ceuta, que realizaban el ayuno de R (Tabla 1). Los sujetos fueron convenientemente informados y participaron voluntariamente, firmando el consentimiento. El tamaño de la muestra se vio comprometido por las dudas en torno a la posibilidad de que la extracción de sangre fuese una práctica NO permitida durante el mes del Ayuno, consultada la autoridad religiosa de esta comunidad, se les concede autorización expresa para poder realizar el estudio.

Procedimiento: Los sujetos eran personas físicamente activas, según anamnesis previa, sometidos a

TABLA 1. Talla y peso de la muestra

	TALLA (cm)	PREVIA	SEM 1M	SEM 1T	SEM 4 M	SEM 4 T	POST
1	158	52	50,5	50,4	50	50	50
2	175	75,3	76,5	75,1	75,5	74,6	77
3	173	70,3	69,5	68,3	71,5	70,1	70,5
4	161	53	52	51,1	53,6	52,5	54
5	170	79,9	80	78,8	80,5	79	80,9
6	172	53	51	50	51	50,5	52
7	176	61	58,2	57,5	58,6	57,1	59,1
8	145	46	48,3	47,8	48,3	47	48,9
9	181	68,8	68,1	67,7	67,2	66,5	68,3
10	174	76	75,5	74,3	74,2	73,5	75,8

Los valores indican los niveles medidos de peso (kg.). En: la semana previa al inicio del Ramadán (PREVIA), séptimo día de Ramadán de mañana (SEM. 1 M), séptimo día del Ramadán de tarde (SEM. 1 T) cuarta semana de Ramadán de mañana (SEM 4 T), cuarta semana del Ramadán de tarde (SEM. 4 T) una semana después de su finalización (POST), así como de la talla.

entrenamiento deportivo, de forma continuada, desde tres meses antes del comienzo del Ramadán hasta un mes después de finalizar el mismo.

Durante el primer mes, el entrenamiento se realizaba 3 días por semana, y consistía en carrera de intensidad entre el 60-80% de la Frecuencia Cardíaca Máxima (FCM), de 35-40 minutos diarios, en métodos continuos o interválicos extensivos. Antes de iniciar la carrera, se realizaba un trabajo de fuerza-resistencia del tren superior a una intensidad entre el 60-70% 1 Repetición Máxima, realizando 3 series con repeticiones, de más a menos (16-14-12) y descanso de 30 segundos entre series. El trabajo de fuerza tenía el objetivo de compensar la musculatura del miembro superior, que era poco utilizada en los entrenamientos de resistencia.

En el segundo mes, el entrenamiento fue 4 días por semana y la intensidad del ejercicio entre 60-85% de la FCM. Con volúmenes de 40-50 minutos diarios y 15 repeticiones por serie, manteniendo la misma carga que en el primer mes, para el trabajo del tren superior.

Durante el tercer mes, se llegó a 5 días por semana, de los cuales una sesión era de trabajo regenerativo, la duración de las sesiones fue de 35-45 minutos de trabajo y una intensidad de 70-85% de la FCM, excepto la sesión de trabajo recuperador, que se efectuaba entre el 55% y el 60% de la FCM y una duración de 30 minutos. El trabajo del miembro superior aumentó en 3 repeticiones por serie, manteniendo la intensidad de los meses anteriores.

Durante el mes de R y el mes posterior, se continuó con el entrenamiento a razón de 5 días a la semana, en sesiones de 30-40 minutos a una intensidad entre el

60-80% de la FCM, mediante métodos interválicos extensivos y continuos. El trabajo del tren superior se estabilizó en 18 repeticiones por serie.

Tratamiento Estadístico: Por las características muestrales y la naturaleza de los datos se optó por el uso de estadística no paramétrica, utilizando el test de *Wilcoxon* para muestras pareadas. Se ha considerado como límite de significación valores de probabilidad $p \leq 0,05$. Para el tratamiento informático de los datos se han utilizado las aplicaciones Excel y Microsoft Word® y el paquete estadístico SPSS 17.0® para windows.

RESULTADOS

Como puede observarse, en la Tabla 2, las variaciones más significativas se produjeron en la *Semana 1* del R, con una glucemia 102 mg/dL en la muestra de la mañana y 71 mg/dL por la tarde, significativamente diferentes a los encontrados la *Semana previa* al inicio del ayuno ($p < 0,001$ y $p < 0,01$, respectivamente). Durante la *Semana 4* del ayuno, la glucemia se mantiene en valores similares a los de las *Semanas Previa y Posterior* al ayuno, tanto por la mañana como por la tarde, con niveles de 93,5 mg/dL y 82 mg/dL respectivamente.

En relación a los triglicéridos, durante la *Semana 1* se observan niveles similares a la *Semana previa* (56 mg/dL) por la mañana, con un descenso estadísticamente significativo por la tarde ($p < 0,05$), respecto a los encontrados por la mañana y en la *Semana previa* al ayuno (58,5 mg/dL). Entre la mañana y la tarde de la cuarta semana del R no se observan diferencias significativas y tampoco con la semana previa al comienzo del ayuno.

TABLA 2. Medias y significación de los parámetros analizados

	PREVIA	SEM 1M	SEM 1T	SEM 4. M	SEM 4.T	POST
Insulina ($\mu\text{U/mL}$)	6,4	7,4	2,9	7,5	3,1	6,6
Niveles de significación:			b)** e) **		d)**	g)**
Glucosa (mg/dL)	86,5	102	71	93,5	82	85,5
Niveles de significación:		a)**	b)** e) **			
Urea (mg/dL)	29,5	40	32,5	37,5	27	29,5
Niveles de significación		a)*	e) **	f)**		
Trigliceridos (mg/dL)	58,5	56	35	61,5	52,5	81
Niveles de significación			b) * e) *			
Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	4,2	15,6	15,1	13,9	16,6	9,2
Niveles de significación		a) **	b) **	c) **	d) **	g) **
Volumen plasmático (%)	57,4	61,3	54,6	58,1	53,6	56,6
Niveles de significación		a)*			d) **	F) **

Los valores indican las medianas en: la semana previa al inicio del Ramadán (PREVIA), séptimo día de Ramadán de mañana (SEM. 1 M), séptimo día del Ramadán de tarde (SEM. 1 T) cuarta semana de Ramadán de mañana (SEM 4 T), cuarta semana del Ramadán de tarde (SEM. 4 T) una semana después de su finalización (POST). Se indican en negrita los que han resultado significativos:

a) Previa con primera semana de mañana b) Previa con primera semana de tarde c) Previa con cuarta semana de mañana d) Previa con cuarta semana de tarde e) Primera semana de mañana con primera semana de tarde f) Cuarta semana de mañana con cuarta semana de tarde g) Previa con posterior. (*) $p < 0,050$ (**) $p < 0,010$

En la Fig. 1 se muestran los niveles de cortisol e insulina plasmáticos según el modelo establecido. Para el cortisol se observa un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,01$) a lo largo del ayuno, respecto a los niveles promedio de la *Semana previa*. Dicho aumento se mantiene durante todo el mes, sin mostrar diferencias significativas entre mañana y tarde, ni entre las *Semanas 1* y 4.

Para la insulina, se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$) en la *Semana 1* por la tarde, respecto de la mañana y de la *Semana* previa al ayuno, que se repite siguiendo el mismo patrón en la *Semana 4*. Los niveles de insulina se restablecen en la *Semana posterior* a la finalización del ayuno.

En relación a los niveles de urea plasmáticos, en la *Semana 1* por la mañana la urea se encuentra significativamente elevada ($p < 0,05$), respecto a la *Semana previa* al ayuno, disminuyendo significativamente por la tarde ($p < 0,01$). Este patrón se repite en la *Semana 4* del ayuno aunque con indicios de significación para los niveles de mañana ($p = 0,08$) en comparación con la *Semana previa*. Por la tarde el descenso resulta estadísticamente significativo ($p < 0,01$).

En la tabla 2 se observan las variaciones producidas en el volumen plasmático según el método de Dill y Costill (16), con aumento significativo por la mañana y disminución por la tarde ($p < 0,05$), en re-

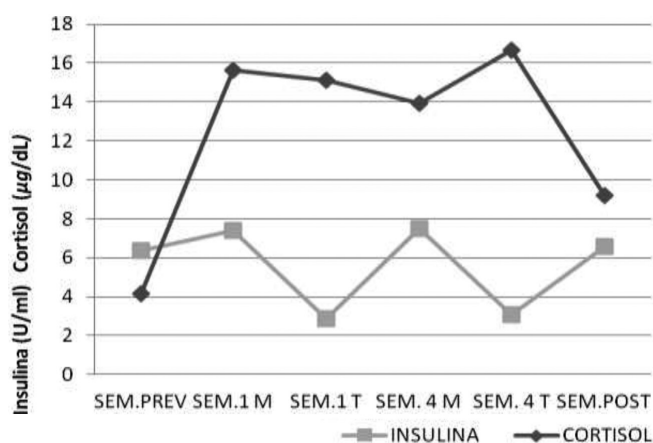


FIGURA 1. Medianas de insulina (U/mL) y cortisol ($\mu\text{g/dL}$) medidos en plasma obtenidos en situación, Sem. Previa: una semana previa al ayuno; Sem 1: Primera semana del ayuno (mañana y tarde); Sem 4: Cuarta semana del ayuno (mañana y tarde) y Sem. Post: una semana posterior al concluir el ayuno.

lación a las semanas previa y posterior del ayuno.

DISCUSIÓN

Durante el mes del R, se observa una fase de choque correspondiente al transcurso de la *Semana 1* del ayuno, donde se observan las mayores diferencias en los parámetros estudiados, en comparación con los valores previos y durante la jornada. Ya en la *Semana 4* se puede observar la adaptación fisiológica al ayuno de R, donde

las diferencias con la *Semana previa* y durante el día, son mínimas y las limitaciones energéticas para la práctica del ejercicio físico son escasas. Estos resultados estarían en la línea de aquellos autores que sugieren el cambio de una fase de choque a una de adaptación durante el mes del R (1,2).

Tanto en la *Semana 1* como en la *Semana 4*, nuestros resultados muestran un aumento estadísticamente significativo de la glucemia por la mañana respecto a la *Semana previa* al ayuno y una disminución por la tarde, lo que sugiere una relación directa con la ingesta de alimentos especialmente ricos en carbohidratos, que las personas suelen hacer cada día a altas horas de la madrugada (3,9, 10). Este aumento en la glucemia de la mañana no puede justificarse como efecto de una hemoconcentración, ya que el volumen plasmático también se encuentra aumentado, como consecuencia de la ingesta nocturna de agua y de la sobrehidratación que suelen realizar antes de comenzar el día (4). Por el contrario, en la glucemia de la tarde, sí tendría relevancia la disminución del volumen plasmático por la hemoconcentración derivada de la actividad diaria sin ingesta de agua, sin embargo se observa una glucemia significativamente disminuida, lo que informa de la dimensión real de la depleción de glucosa producida.

En la *Semana 4*, las variaciones que experimenta la glucemia tanto por la mañana como por la tarde no son significativas entre sí, ni tampoco en relación con la *Semana previa* al ayuno, lo que sugiere un proceso de adaptación con una regulación más eficiente, estos resultados se alinean con aquellos autores que no muestran variaciones significativas de la glucemia (12, 17).

En relación a los triglicéridos, se produce un descenso estadísticamente significativo en la *Semana 1* por la tarde con relación a la mañana y a la *Semana previa*, a pesar de la pérdida de volumen plasmático reseñada. Nuestros resultados concuerdan con los que muestran que el ayuno favorece la utilización de las grasas como recursos energéticos en ausencia de la reposición de glucosa (11,10), lo que es coherente con el aumento de cortisol observado y de insulina disminuido (18). Aun cuando los niveles medios de triglicéridos son algo menores que los basales en la *Semana 4*, merece destacarse que estos cambios no son significativos, ni tampoco entre la mañana y la tarde, en la línea de una adaptación fisiológica de mayor eficacia.

Con relación a la urea, se muestran los cambios observados entre mañana y tarde, tanto en la *Semana 1*

como en la *Semana 4* de ayuno. Así, los valores obtenidos por la mañana son significativamente superiores a los de la tarde y *Semana previa* al ayuno. Probablemente, estos resultados estén evidenciando el desplazamiento de las comidas principales a horas nocturnas junto al incremento en la ingesta de proteínas (1,3,4).

En este sentido, el aumento en la secreción de cortisol durante todo el ayuno con respecto a los niveles previos al comienzo del mismo ($p < 0,01$), sugieren también una variación del ritmo circadiano de secreción con posibles acrofases en torno a las 9:00 y a las 20:00 horas (figura 1), sin que puedan descartarse otros picos nocturnos, en consonancia con lo sugerido de varias fases a lo largo del día (19). Por su parte, la insulina también muestra un patrón de secreción ajustado a la nueva modalidad de ingesta, con valores más altos por la mañana que por la tarde cuando el efecto de las horas de ayuno se ha acumulado (20).

Durante la *Semana 1* de R, el descenso de los niveles de glucosa al finalizar el día sugiere que se pueda afectar el rendimiento de actividades de potencia aeróbica y anaeróbica láctica (20). Si bien, podemos destacar que durante la *Semana 4* del ayuno, debido a los mecanismos de adaptación fisiológicos, no se observan cambios que justifiquen restricción energética para la práctica del ejercicio físico.

Respecto a las adaptaciones hemodinámicas, al final de la *Semana 1* del R, los valores de presión arterial media por la mañana, son significativamente superiores a los encontrados la *Semana previa*. (Figura 2 y 3) Diferentes factores contribuyen a este cambio, entre los que destacan el aumento del volumen plasmático a causa de la sobrehidratación nocturna que sería responsable de un incremento del volumen sistólico y, en consecuencia del aumento del gasto cardíaco. En estas condiciones, para evitar incrementos excesivos de la PA, estaría justificada la disminución de la FC, significativamente más baja que la basal ($p < 0,05$). Por otra parte, el porcentaje de variación de la resistencia periférica total (RPT), determinada mediante la fórmula de Siconolfi (21), en relación con la situación basal, muestra valores positivos, lo que sugiere un aumento posiblemente secundario al incremento del tono simpático.

Por la tarde, la situación es diferente, con caída de los valores de PA ($p = 0,08$) que se aproximan a la significación estadística y una disminución destacable de la RPT (-22%). Estos cambios habrían provocado ma-

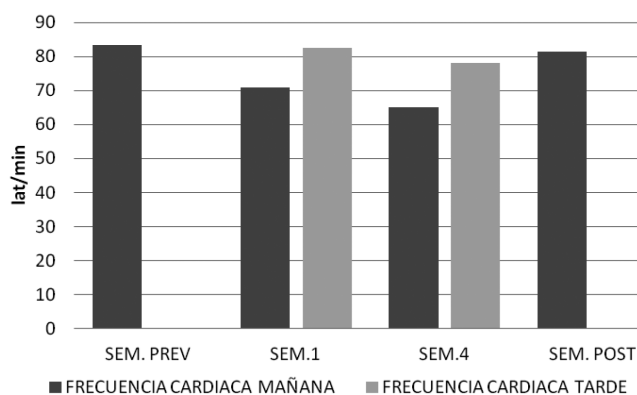


FIGURA 2. Medianas de la frecuencia cardiaca obtenida en situación de reposo en Sem. Prev: una semana previa al ayuno; Sem. 1: Primera semana del ayuno (mañana y tarde); Sem. 4: Cuarta semana del ayuno (mañana y tarde) y Sem. Post: una semana posterior al concluir el ayuno.

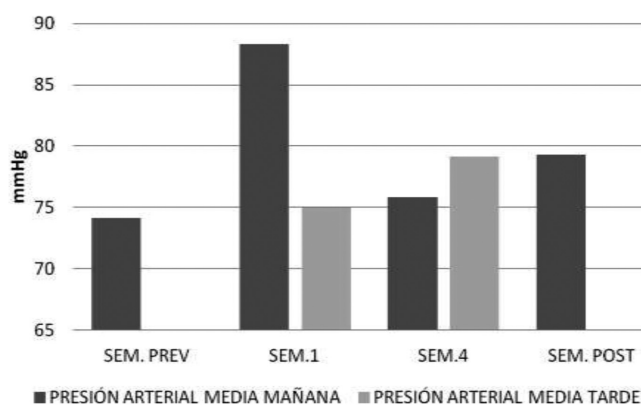


FIGURA 3. Medianas de la presión arterial media obtenida en situación de reposo, Sem. Prev: una semana previa al ayuno; Sem. 1: Primera semana del ayuno (mañana y tarde); Sem. 4: Cuarta semana del ayuno (mañana y tarde) y Sem. Post: una semana posterior al concluir el ayuno.

yores caídas de la PA y comprometido el gasto cardíaco, de no ser compensados con el incremento de la FC ($p < 0,01$). Probablemente, una disminución del volumen sistólico como consecuencia de la deshidratación al final de la jornada, sería suficiente para provocar una caída de la PA, agravada por una variación negativa de la RPT, posiblemente debida a la disminución del tono simpático por efecto del ayuno (14,15). Ante estos cambios, el aumento de FC que tiene lugar al final de la jornada ($p < 0,01$), habría contrarrestado el efecto hipotensor y contribuido al mantenimiento del gasto cardíaco.

Durante la *Semana 4*, los datos apoyan una situa-

ción de adaptación, en la que no se producen variaciones significativas de la PA, que se mantiene ligeramente más alta por la mañana que por la tarde. Al parecer, es nuevamente el control ejercido sobre la FC, que se eleva por la tarde ($p < 0,05$), y la contribución del tono simpático vascular que modera la disminución de la RPT, lo que probablemente contribuya a compensar la reducción del volumen plasmático, manteniendo el gasto cardíaco y la PA en las últimas horas de la jornada.

Tras finalizar el R, los valores hemodinámicos parecen sugerir un nuevo estado de readaptación y retorno hacia los hábitos de vida normales, que requiere un periodo de tiempo algo más prolongado, una vez finalizado el ayuno.

A pesar de las limitaciones impuestas por el ayuno del R, probablemente por su carácter intermitente, los déficits diurnos resultan compensados con la ingesta nocturna. El desarrollo de la vida diaria entre los musulmanes que lo practican pone de manifiesto que la actividad física y el entrenamiento deportivo pueden seguir desempeñándose, con algunas consideraciones referidas especialmente a la capacidad adaptativa del individuo y las condiciones en las que el esfuerzo es llevado a cabo, lo que redundaría finalmente en el rendimiento físico.

En conclusión, nuestros datos ponen de manifiesto una variación de los parámetros endocrinos-metabólicos, que es más intensa durante la *Semana 1* del ayuno que durante la *Semana 4* del mismo. La principal observación de este estudio ha sido, que bajo las condiciones del ayuno, los parámetros fisiológicos estudiados, tienden a equilibrarse a lo largo del R. de tal manera que alcanzan su estabilización tras superar una primera fase de respuesta y posterior adaptación a la nueva situación, que no representa ningún impedimento para la práctica deportiva.

Limitaciones:

La mayor limitación del presente estudio fue el reducido tamaño muestral, condicionado por el contenido religioso del mes de ayuno, lo que planteaba a los practicantes serias dudas, sobre la realización de analíticas durante el R, y con ello las posibilidades de generalizar los resultados. Por otra parte, sería interesante poder valorar también la respuesta metabólica en las mujeres. Consideramos que estos resultados deben ser corroborados con nuevos estudios en los que se obtengan de manera directa resultados en pruebas o test deportivos,

con el fin de clarificar la relación entre las adaptaciones que el propio ayuno impone y el rendimiento deportivo durante el ayuno de R.

REFERENCIAS:

1. Jiménez M, Ramírez J. Influencias del periodo del Ramadán en la aplicación de las didácticas específicas. En: Actas Congreso Nacional de Didácticas Específicas. 2001; IEC: 705-710
2. Guerrero Morilla R, Ramírez Rodrigo J, Sánchez Caravaca MA, Ruiz Villaverde G, Pérez Moreno BA, Villaverde Gutiérrez C. Variaciones en el ión potasio durante el ayuno del Ramadán. Resultados preliminares en jóvenes musulmanes. *Nutrición Hospitalaria*. 2011; 26(4):792-797.
3. Guerrero Morilla R, Ramírez Rodrigo J, Sánchez Caravaca MA, Villaverde Gutiérrez C, Ruiz Villaverde G, Pérez Moreno BA. Modificaciones dietéticas en jóvenes musulmanes que practican el ayuno del Ramadán. *Nutrición Hospitalaria*. 2009; 24(6):738-743.
4. Jiménez-Martín M, Sánchez-Caravaca MA, Villaverde-Gutiérrez C, Ramírez-Rodrigo J, Ruiz-Villaverde G. Repercusión hemodinámica e hidroelectrolítica del ayuno de Ramadán en escolares adolescentes. *Nutrición clínica y dietética Hospitalaria*. 2004; 24 (1): 15-21.
5. Nomani M. Dietary fat, blood cholesterol and uric acid levels during Ramadán fasting. *Internacional Journal Ramadan Fasting Research*. 1997; 1(1):1-6.
6. Swileh N, Schnitzler A, Hunter, GR, Davis B. Body composition and energy metabolism in resting and exercising muslims during Ramadan fast. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 1992; 32(2), 156-163.
7. Adlouni A, Ghalim N, Benslimane A, Lecerf JM, Saile R. Fasting during Ramadan induces a marked increase in high-density lipoprotein cholesterol and decrease in low-density lipoprotein cholesterol. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 1997; 41(4): 242-249.
8. Mahoob S, Sattarivand R, Nouri M, Arefhosseini, S. Effect of Ramadan fasting on serum lipid profiles in normal and hyperlipidemic subjects. *Saudi Medical Journal*. 1999; 20 (12): 947-950.
9. Qujeq D, Bijani K, Kalavi K, Mohiti J, Aliakbarpour H. Effects of Ramadan casting on serum low-density and high-density lipoproteína-cholesterol concentrations. *Annals of Saudi medicine*. 2002; 22 (5-6): 297-299.
10. Afrasiabi A, Hassanzadeh S, Sattarivand R, Mahboob S. Effects of Ramadan fasting on serum lipid profiles on 2 hyperlipidemic groups with or without diet pattern. *Saudi Medicine Journal*. 2003; 24(1):23-6
11. Aksungar FB, Eren A, Ure S, Teskin O, Ates G. Effects of intermittent fasting on serum lipid levels, coagulation status and plasma homocysteine levels. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2005; 49(2):77-82.
12. Sarraf-Zadegan N, Atashi M, Naderi GA, Baghai AM, Asgary S, Fatehifar MR, et al. The effect of fasting in Ramadan on the values and interrelations between biochemical, coagulation and hematological factors; *Annals Saudi Medicine*. 2000; 20(5-6):377-81.
13. Habbal R, Azzouzi L, Adnan K, Tahiri A, Chraibi N. Variations of blood pressure during the month of Ramadan. *Archives des Maladies du Coeur et Vaisseaux*. 1998; 91(8), 995-998.
14. Roky R, Iraki L, Hajkhalifa R, Lakhdar, N. Hakkou, F. Daytime alertness, mood psychomotor performances, and oral temperature during Ramadan intermittent fasting. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2000 ; 44(3), 101-107.
15. Iraki L, Bogdan A, Hakkou F, Amrani N, Abkari A, Tuitou Y. Ramadan diet restrictions modify the circadian time structure in humans. a study on plasma gastrin, insulin, glucose, and calcium and on gastric PH. *Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism*. 1997; 82(4), 1261-73.
16. Dill DB, Costill DL. Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *Journal of Applied Physiology*. 1974; 37:247-248.
17. Beltaifa L, Bouguerra R, Ben Slama C, Jabrane H, El-Khadhi A, Ben Rayana MC et al. Food intake, and anthropometrical and biological parameters in adult Tunisians during casting at Ramadan. *Eastern Mediterranean Health Journal*. 2002; 8 (4-5): 603-11
18. Dikensoy E, Balat O, Cebesoy B, Ozkur A, Cicek H, Can G. The effect of Ramadan fasting on maternal serum lipids, cortisol levels and fetal development. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2009; 279(2):119-23.
19. Merl V, Peters A, Oltmanns KM, Kern W, Hubold C, Hallschmid M, et al. Preserved circadian rhythm of serum insulin concentration at low plasma glucose during fasting in lean and overweight humans. *Metabolism, Clinical and Experimental*. 2004; 53(11) 1449-1453.
20. Souissi N, Souissi H, Sahli S, Tabka Z, Dogui M, Ati J et al. Effect of Ramadan on the diurnal variation in short-term high power output. *Chronobiology International*. 2007; 24(5):991-1007.
21. Siconolfi S.F. Estimation of percent change in total peripheral resistance during exercise and recovery. *Journal of cardiopulmonary rehabilitation*. 1982; 2. 291-296.

Recibido: 15-01-2013

Aceptado: 14-05-2013

Impacto de los factores de riesgo en osteoporosis sobre la densidad mineral ósea en mujeres perimenopáusicas de la Ciudad de Querétaro, México.

María de los Angeles Aguilera-Barreiro, José Alberto Rivera-Márquez, Héctor Miguel Trujillo-Arriaga, Juan Manuel Ruiz-Acosta, Mario Enrique Rodríguez-García.

Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Unidad Iztapalapa, México, D.F.

Laboratorio Biomédico de Querétaro, Querétaro, México.

Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, México.

RESUMEN. Es indispensable evaluar los factores de riesgo en osteoporosis, principalmente los modificables, como: los estilos de vida, para prevenirla, ya que es un grave problema de salud pública. Se estudiaron 805 mujeres (35-55 años) de la ciudad de Querétaro, México. Se obtuvieron datos personales, historia familiar, hábitos como: fumar, actividad física, consumo de alcohol y de cafeína (refresco de cola y café). Las participantes completaron el cuestionario de riesgo de osteoporosis (19 factores, con uno, existe riesgo) (International Osteoporosis Foundation). Se evaluó: Índice de Masa Corporal (IMC), riesgo cardiovascular y complejión corporal (Talla/Circunferencia de muñeca). Se realizó una densitometría ósea (DXA) en dos regiones diagnósticas: columna lumbar y cadera total y las participantes se clasificaron en: densidad mineral ósea (DMO) normal, DMO baja y osteoporosis. La prevalencia de osteoporosis fue de 7% y de DMO baja fue de 34%, predominantemente en región lumbar y en aquellas con menopausia. La edad fue mayor en mujeres osteoporóticas (51 años) y el 85% menopáusicas, con valores menores de: peso, talla, IMC, circunferencia de cintura y cadera, que las normales. Los factores de riesgo modificables que aumentaron el riesgo fueron: bajo peso, fumar y consumo de refresco de cola con 6,5, 1,2 y 1,4 (razón de momios) respectivamente ($p < 0,05$). Factores no modificables significativos: menopausia (quirúrgica), historia de fractura y riesgo de osteoporosis. Se concluye que dentro de los factores de riesgo modificables para la prevención de osteoporosis de mayor impacto en esta muestra son: bajo peso, cigarrillo y el refresco de cola.

Palabras clave: Osteoporosis, densidad mineral ósea baja, factores de riesgo, mujeres perimenopáusicas.

SUMMARY. Impact of risk factors for osteoporosis on bone mineral density in perimenopausal women of the City of Querétaro, México. It is essential to evaluate osteoporosis risk factors, mainly the modifiable, like the lifestyle, in Mexican women in order to prevent it, since it is a serious public health problem. We studied 805 women (35-55 years old) in the City of Queretaro, México. We obtained: personal data, family history, habits, such as smoking, alcohol, caffeine (coffee and soft drink of cola) and physical activity. Participants complete the questionnaire on 19 risk factors for osteoporosis (International Osteoporosis Foundation) one of them with risk. We evaluated: body mass index (BMI), cardiovascular risk and corporal complexion. Bone densitometry was performed in two diagnostic regions: lumbar spine and total hip and participants were classified as normal bone mass density (BMD), low BMD and osteoporosis. The prevalence of osteoporosis was 7% and of low BMD was 34%, predominantly in the lumbar region and in those with menopause. In osteoporotic women, the age was higher (51 years) and 85% menopausal women, also lower values of weight, height, BMI, waist circumference and hip than women with normal bone mass density. The significantly modifiable risk factors were: low weight, smoking and consumption of soft drink of cola with 6,5, 1,2 and 1,4 (odds ratio), respectively ($p < 0,05$). The significantly non-modifiable risk factors were: menopause (surgical), history of fracture and risk. It is concluded that within the modifiable risk factors for the prevention of osteoporosis, those with the greatest impact were low weight, cigarette and soft drink of cola.

Key words: Osteoporosis, low bone mass density, risk factors, perimenopausal women.

INTRODUCCIÓN

La osteoporosis es un problema de Salud Pública Mundial y México no se encuentra exento de presentarla. En mujeres mayores de 50 años, la prevalencia de osteoporosis es del 16% y de densidad mineral ósea baja (DMO) es de 57% (1). En Querétaro, 34% de mujeres premenopáusicas presentan DMO baja (2), ésta prevalencia puede aumentar con el incremento en la esperanza de vida, ya que se incrementará en el año 2050 hasta el 37% (3). Por otro lado, la incidencia de fracturas de cadera es de 8% en mujeres y de 5% en hombres, presentándose después de los 50 años de edad (4), y la de fracturas vertebrales en mujeres es de 19% y en hombres es de 9,4% antes de los 50 años de edad (5).

Existen muchos factores de riesgo en osteoporosis. Uno de los factores que no es modificable es la falta de estrógenos que se presenta en la menopausia, con una pérdida ósea franca (6). La menopausia natural o quirúrgica acelera la pérdida ósea que puede llegar a ser del 2 al 3% anual. El sufrir de una fractura previa en la infancia aumenta también el riesgo de presentar nuevas fracturas en 1,5 a 9,5 veces, dependiendo de la edad, número y localización de las fracturas previas (7). La herencia es uno de los factores determinantes, aún sin ningún otro factor de riesgo, y puede explicar hasta el 80% de los casos de osteoporosis (8). La menarquía tardía (>16 años), es un importante indicador biológico de la futura masa ósea: cuanto más temprana sea la menstruación, mayor será la masa ósea. Con el cierre de la epífisis, el crecimiento longitudinal de hueso cesa, pero el crecimiento transversal continúa por un periodo variable. Por lo tanto, mujeres que se han desarrollado tarde, tienen mayor riesgo de padecer osteoporosis (9). En cuanto a los estilos de vida, un estudio demostró que mujeres que fumaron por 24 años una cajetilla diaria presentan menor DMO en las regiones lumbar y cuello de fémur (10). Sin embargo, el efecto se atenúa si consumen más de 750 mg/día de calcio (10). El fumar tabaco incrementa la conversión hepática de metabolitos de estradiol sin actividad biológica, a expensas de hormonas activas como la estrona y estriol (11). El consumo de alcohol (> 4 onzas/día) también es un factor relacionado con la osteoporosis, ya que tiene efectos tóxicos sobre el metabolismo del hueso y también incrementa el riesgo de fracturas asociadas a trauma (8). En cuanto al consumo

de cafeína, se ha encontrado una asociación negativa entre el aumento en el consumo (mayor de 300 mg o 2 tazas diarias) con DMO baja, pero se atenúa el efecto con el consumo recomendado de calcio (10, 12). La ingesta de calcio es esencial para el crecimiento y mantenimiento del hueso. En mujeres posmenopáusicas el requerimiento es de 1300 mg/día (13), la vitamina D es indispensable para la absorción activa del calcio (14) y disminuye el riesgo de fractura (15), otros minerales son indispensables para el metabolismo óseo como el fósforo, magnesio, zinc y el sodio, el cual puede producir hipercalciuria sobre todo si el consumo de calcio es deficiente (16). El ejercicio y la actividad física a cualquier edad, estimulan la formación ósea y resulta ser una de las mejores herramientas no sólo para prevenir la osteoporosis, sino un coadyuvante muy importante para su tratamiento, siempre aunado a un óptimo consumo de calcio (17). Un peso corporal bajo está asociado con una DMO baja (12), y un incremento en el riesgo de fractura (18). Perder tan sólo el 5% del peso corporal aumenta el riesgo de fracturas en mujeres posmenopáusicas, especialmente en aquellas que son relativamente delgadas de mediana edad (19). De acuerdo con la International Osteoporosis Foundation (IOF), las personas con un IMC < 20 kg/m² tienen el doble de riesgo de sufrir fractura. La presencia de uno o dos factores de riesgo y DMO baja aumenta la probabilidad de fractura de cadera casi 3 veces (RR 2.6); en presencia de 5 o más factores de riesgo aumenta a 27,3 (20).

Aun siendo la osteoporosis un problema de Salud Pública, existen muy pocos datos epidemiológicos en nuestro país y aún menos, datos de los factores de riesgo que más impacto tienen sobre la DMO, factibles de modificar y que deben de evitarse, por lo que el objetivo principal fue el de evaluar la DMO en mujeres perimenopáusicas de 35 a 55 años de edad y determinar sus factores de riesgo asociados a osteoporosis en la Ciudad de Querétaro, México con el fin de obtener datos precisos, para ofrecer medidas preventivas específicas en el área de atención a la salud.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue transversal, comparativo, aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Sujetos. Se estudiaron a 805 mujeres de 35 a 55

años de edad de la Ciudad de Querétaro, México, de un tamaño de muestra mínimo de 614 mujeres, de acuerdo con la prevalencia de osteoporosis en México del 17% (3) y un error del 0,03, con un nivel de confianza del 95%. Los criterios de inclusión fueron: mujeres de 35 a 55 años, sin terapia hormonal de reemplazo, que no consumieran medicamentos y padecieran alguna enfermedad relacionada con la osteoporosis tales como: daño renal, hepático o tiroideo; sin estado de embarazo ni lactancia en ese momento y que no consumieran suplementos vitamínicos, principalmente los relacionados con el metabolismo óseo. Las participantes firmaron una carta de consentimiento informado. Se eliminaron a las mujeres que no cumplieran con toda la información indispensable para el estudio. Las mujeres en estudio fueron divididas en tres grupos basados en su diagnóstico de DMO en: normal, DMO baja y osteoporosis.

Las participantes completaron una historia clínica médica-nutricional con el objeto de evaluar los criterios de inclusión y obtener los datos personales y ginecológicos, historia familiar de osteoporosis y fracturas, estilos de vida como: fumar, consumo de alcohol, cafeína (café y refrescos de cola) y calcio por medio de un recordatorio de 24 horas de tres días incluyendo un fin de semana para el consumo de calcio (utilizando el software Nutrikal), al igual que la actividad física y sedentarismo, se utilizó el Cuestionario Internacional de Actividad Física (IPAQ) (21), formato corto. Las participantes también completaron el cuestionario de riesgo de osteoporosis de la International Osteoporosis Foundation (IOF) (22). Se obtuvo el Índice de masa corporal (IMC) por medio del peso y la talla (kg/cm²) y se clasificó según las guías de la OMS (16). La complexión se obtuvo por medio de la relación talla/circunferencia de muñeca, el tipo morfológico adiposo (ginecoide o androide) y el riesgo cardiovascular se obtuvieron por medio de la relación cintura/cadera, se clasificó de acuerdo con la recomendación OMS (23). La densidad mineral ósea (DMO) se obtuvo de acuerdo con la clasificación de la OMS (24) de acuerdo al score T: DMO normal >-1.0 DS, DMO baja de -1.1 a -2.4 DS y osteoporosis <-2.5 DS, en una o las dos regiones diagnósticas que son la columna lumbar y la cadera total. El densitómetro que se utilizó para medir la DMO fue Hologic QDR* Explorer Series.

Análisis estadísticos. Se realizaron pruebas de tendencia central para las pruebas descriptivas, tanto medias y desviaciones estándar como frecuencias; se utilizaron pruebas de Chi² y razón de momios con su intervalo de confianza para las variables categóricas y análisis de covarianza para la comparación de los tres grupos de estudio con prueba de LSD al 95% de confianza, considerando como covariable, la menopausia. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 20.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se observa la prevalencia del diagnóstico de la DMO. Se observa que la prevalencia de osteoporosis es mayor en columna lumbar y más frecuente en mujeres posmenopáusicas. Referente a la DMO baja, es igual en ambas regiones y estado menopáusico, las mujeres menopáusicas con diagnóstico normal en la región de cadera, presentan mayor prevalencia que en la región columna lumbar, contrario en mujeres premenopáusicas donde, la mayor prevalencia se observa en la región de columna lumbar, cabe aclarar que a cuatro pacientes no se les pudo realizar el estudio a causa de dolor. En total se encontró una prevalencia del 37,2% de DMO baja y un 6.9% de osteoporosis.

TABLA 1. Diagnóstico de DMO por regiones de estudio en mujeres premenopáusicas y menopáusicas (n=805)

Diagnóstico	Región Cadera Total		Región Columna Lumbar	
	N*	%	N*	%
Osteoporosis	2	0,2	53	6,7
Premenopausia	0	0	8	14.8
Menopausia	2	100	45	85.2
DMO baja	126	15,7	250	31,2
Premenopausia	62	49,2	124	49,6
Menopausia	64	50,8	126	50,4
DMO normal	676	84,1	498	62,1
Premenopausia	444	65,7	371	74,5
Menopausia	232	34,3	127	25,5
Total	804&	100	801&	100.0

* Número de observaciones positivas

& Cabe aclarar que a cuatro pacientes no se les pudo realizar el estudio a causa de dolor

En la Tabla 2 se muestran las medias de las variables continuas del estudio por grupo diagnóstico. La edad promedio fue de 45 años, siendo significativamente mayor en el grupo de las mujeres con osteoporosis ($p < 0,05$). La menarquía también se observa de mayor edad en las mujeres con DMO baja y con osteoporosis con significancia estadística, sin embargo se encuentran todas dentro de la edad normal de menarquía, sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) la edad de la menopausia, al igual que en el número de embarazos por grupo. Referente a la antropometría, las medidas de peso, estatura, IMC (todas presentaron sobrepeso), circunferencia de cintura y circunferencia de cadera fueron menores en las mujeres con osteoporosis con respecto a las mujeres con diagnóstico normal ($p < 0,05$), sin embargo, clínicamente presentan un bajo riesgo cardiovascular y una

morfología ginecoide comparado con todos los grupos diagnósticos. Es importante mencionar que en todos los grupos, la complexión promedio fue mediana, sin embargo, las mujeres con DMO baja presentaron menor circunferencia en muñeca ($p < 0,05$). Según la clasificación del IMC, 1,4% de las participantes se encontró en bajo peso, el 33,3% con peso normal, el 39,2% con sobrepeso y el 26,1% con obesidad. En cuanto a estilos de vida, es importante destacar que no se observó uso de tabaco en las mujeres con osteoporosis comparado con los otros 2 grupos ($p < 0,05$); el consumo de bebidas alcohólicas fue mayor en las mujeres osteoporóticas con diferencia estadística. No hubo diferencias significativas en el consumo de refrescos de cola, de café o de calcio ($p > 0,05$). Tampoco se encontraron diferencias en el nivel de ejercicio entre los grupos ($p > 0,05$).

TABLA 2. Medias de las variables en estudio por grupos de diagnóstico de acuerdo a la DMO (n=805 mujeres).

Variable	DMO normal Media±DS	DMO baja Media±DS	Osteoporosis Media±DS	Total Media±DS
Edad (años)	43,8±5,4 ^a	46,6±5,9 ^b	51,6±4,3 ^c	45,3±5,9
Edad Menarquía (años)	12,5±1,4 ^a	12,7±1,4 ^b	12,9±1,4 ^b	12,6±1,4
Edad Menopausia (años)	44,8±5,8 ^a	45,4±4,9 ^a	45,8±4,8 ^a	45,2±5,3
Embarazos (n)	2,75±1,54 ^a	3,08±1,65 ^a	3,28±1,66 ^a	3,10±1,61
Peso (kg)	68,7±13,8 ^a	65,2±12,5 ^b	61,1±10,9 ^c	67,1±13,6
Talla (cm)	157,0±5,6 ^a	155,6±5,7 ^b	154,6±5,6 ^b	156,4±5,7
IMC (kg/m ²)	28±4,7 ^a	27±4,5 ^b	26±4,5 ^c	27,4±4,7
Circunferencia muñeca (cm)	14,9±0,91 ^a	14,8±0,85 ^b	15,1±0,90 ^a	14,9±0,9
Complexion: Talla/muñeca	Mediana	Mediana	Mediana	Mediana
Circunferencia cintura (cm)	86,1±10,6 ^a	85,2±10,9 ^a	82,9±9,6 ^b	85,6±10,8
Circunferencia cadera (cm)	103,1±10,5 ^a	101,1±11,3 ^b	98,6±9,2 ^b	102,2±10,3
Índice cintura/cadera (cm/cm)	0,83±0,5 ^a	0,83±0,06 ^a	0,83±0,05 ^a	0,83±0,5
Cigarros/día	0,68±2,3 ^a	0,67±2,5 ^a	0,00±0,0 ^b	0,45±1,5
Bebidas alcohólicas/semana (vasos)	0,34±1,2 ^a	0,23±0,9 ^a	0,67±2,0 ^b	0,41±1,3
Tazas de café	0,84±0,9 ^a	0,90±1,1 ^a	0,72±0,8 ^a	0,82±0,9
Refresco de cola (vasos)	0,67±1,0 ^a	0,52±0,8 ^a	0,30±0,5 ^a	0,49±0,7
Minutos ejercicio/día	13,7±22,2 ^a	15,3±25 ^a	13,3±14,7 ^a	14,1±20,6
Calcio/día (mg)	1007±465 ^a	1045±352 ^a	966±393 ^a	993±404

^{abc} Valores en la misma fila con diferentes literales son significativamente diferentes de acuerdo al análisis de covarianza, menopausia como covariable, prueba de LSD, $p < 0,05$.

Los factores de riesgo categóricos según el diagnóstico densitométrico se muestran en la Tabla 3. Se observa una mayor prevalencia de menopausia en las mujeres con osteoporosis (85,5%) con un riesgo de 3,4 veces mayor de tener osteoporosis comparado con las mujeres sin menopausia. El riesgo de osteoporosis es 1,3 veces mayor en mujeres con menopausia quirúrgica comparada con la natural. La mayoría de las mu-

TABLA 3. Factores de riesgo clasificados por DMO y su riesgo de osteoporosis (n=805 mujeres)

Variable	DMO normal		DMO baja		Osteoporosis		Chi ² (P)*	OR (IC)
	N=468*	%	N=282*	%	N=55*	%		
Con menopausia	118	25,2	134	47,5	47	85,5	82,7(0,00)	3,4(2,8-4,1)
Sin menopausia	350	74,8	148	52,5	8	14,5		
Causa menopausia								
Natural	80	67,8	96	72,2	41	87,2		
Quirúrgica	38	32,2	37	27,8	6	12,7	6,49(0,01)	1,3(1,1-1,5)
Embarazos								
1-2	272	63,7	172	64,7	34	68		
>3	155	36,3	94	35,3	16	32	0,36(0,55)	0,9(0,5-1,3)
Diagnóstico Nutricio								
Bajo peso	1	0,2	8	2,8	2	3,6	10,1(0,03)	6,5(2,8-15,1)
Normal	145	31	99	35,1	24	43,6	3,60(0,06)	0,6(0,3-1,02)
Obesidad	129	27,6	71	25,3	10	18,2	2,22(0,90)	0,6(0,3-1,2)
Tipo adiposidad								
Androide	20	29	16	29,6	1	14,3	0,69(0,41)	1,2(0,9-1,7)
Ginecoide	49	71	38	70,4	6	85,7		
Uso cigarrillo	94	20,1	84	30,2	1	1,8	11,2(0,00)	1,2(1,1-1,3)
No uso cigarrillo	370	79,1	194	69,8	54	98,2		
Consumo alcohol	156	33,6	84	30,2	19	35,2	0,05(0,82)	1,0(0,7-1,5)
No consumo	308	66,4	194	69,8	35	64,8		
Consumo café	343	73,8	196	69,8	43	78,2	0,50(0,48)	1,0(0,9-1,3)
No consumo	122	26,2	85	30,2	12	21,8		
Realizar ejercicio	255	54,5	153	54,6	34	61,8		
No realizar ejercicio	213	45,5	127	45,4	21	38,2	1,07(0,30)	1,1(0,9-1,4)
Refresco de cola	343	73,8	184	65,9	34	61,8	3,52(0,05)	1,4(1,0-2,1)
No refresco de cola	122	26,2	95	34,1	21	38,2		
Historia de fractura	15	3,3	21	7,8	7	13,5	11,8(0,00)	4,1(1,7-9,6)
No historia de fractura	445	96,7	248	92,2	45	86,5		
Cuestionario IOF								
Con riesgo	135	29	116	43	33	37	23,8(0,00)	2,1(1,7-2,7)
Sin riesgo	329	70,9	154	57	20	37,7		
Antecedente osteoporosis								
Si	146	31,5	89	31,7	13	24,1	1,26(0,26)	1,1(0,9-1,3)
No	317	68,5	192	68,3	41	75,9		

*Número de observaciones positivas & Comparación de normales con osteoporóticas. P= significancia estadística (p<0,05) OR= Razón de momios IC= Intervalo de confianza.

eres tuvieron 1-2 embarazos, sin diferencias significativas entre los grupos. Referente al bajo peso, se encontró la mayor prevalencia en mujeres con osteoporosis, el cual aumento el riesgo de osteoporosis en 6,5 veces ($p < 0,05$), las mujeres con peso normal también se observan con mayor prevalencia en osteoporóticas pero sin riesgo de osteoporosis, contrario a la obesidad, donde se encontró mayor prevalencia en las mujeres con DMO normal y DMO baja; sin embargo, no se asocio a un menor riesgo de osteoporosis ($p > 0,05$). La mayoría de las mujeres presentaron una distribución del tejido adiposo del tipo ginecoide, lo cual corresponde con riesgo cardiovascular normal. En cuanto a estilos de vida, las mujeres osteoporóticas en promedio no fuman; sin embargo, las mujeres con DMO baja si presentan este hábito lo que resultó en un riesgo de 1,2 veces mayor de presentar osteoporosis en un futuro. El consumo de alcohol y de café fue muy similar en los tres grupos, sin aumentar el riesgo de osteoporosis. Por otro lado, el consumo de refresco de cola fue mayor en mujeres con DMO normal, con un riesgo de 1,4 veces mayor de presentar osteoporosis, cabe aclarar que este riesgo es de consumo sin importar la cantidad, que en la tabla 2 se observa sin diferencia significativa entre grupos. El realizar ejercicio fue similar entre los grupos, sin encontrar riesgo en las que no lo realizan. Referente a la historia familiar de osteoporosis, se observa una baja prevalencia en los tres grupos, incluso menor en osteoporosis; sin embargo, la historia de fractura y riesgo de osteoporosis es significativamente mayor en las mujeres con osteoporosis, con un riesgo alto de 4,1 y 2,1 veces, respectivamente.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio significativos arrojan resultados importantes para la prevención de la osteoporosis que impactan a la DMO como son los factores de riesgo modificables que deben ser cuidados en mujeres mexicanas de 35 a 55 años de edad, como son: el bajo peso, el consumo de refresco de cola que deben ser cuidados por un especialista en nutrición y el consumo de cigarrillo que debe ser eliminado. Los resultado de los factores no modificables de impacto en estas mujeres fue la estatura baja, la edad, la menopausia sobretodo la quirúrgica, la historia de fractura y por supuesto el riesgo de osteoporosis por medio

del cuestionario de la IOF que lo predice.

La prevalencia que se encontró en este estudio es semejante al estudio de Aguilera, 2005, de 34% de masa ósea baja en mujeres más jóvenes (30 a 35 años) de Querétaro (2) contra 37% en el presente estudio, y a nivel Nacional fue menor, tanto en masa ósea baja como en osteoporosis, ya que las mujeres que se estudiaron eran mayores de 50 años (1). En cuanto a las regiones de estudio, era de esperarse que tanto la masa ósea baja como la osteoporosis se encontrara en la región lumbar, principalmente, ya que las fracturas en esta región se presentan en menores de 50 años (3,5). Es importante indicar que las mujeres, entre mayores sean, presentan disminución de masa ósea y osteoporosis, de ahí que los estudios se enfoquen a mayores de 50 años. Sin embargo entre más jóvenes se realicen estudios, el impacto en la prevención será mayor. Referente a la antropometría (peso, talla, IMC, circunferencias de cintura y cadera), los valores son menores en las mujeres con osteoporosis, lo cual concuerda con los resultados de algunos estudios que refieren que el peso corporal es el factor más constante relacionado con la masa ósea, tanto en las mujeres de edad avanzada (25) como en las adultas jóvenes (26). Un peso corporal bajo está asociado con una masa ósea baja, y un incremento en el riesgo de fracturas (18) esto concuerda con el riesgo presente en las mujeres en estudio de 6,5 veces mayor, mientras que la obesidad está asociada con un incremento de la masa ósea (27).

Los estilos de vida que pueden modificarse para prevenir osteoporosis con mayor prevalencia en las mujeres con osteoporosis en el presente estudio fue el consumo de alcohol, el cual no fue ni de una copa diaria, ya que sólo consumían una o dos copas por semana. Además, el de cigarro y el consumo de refresco de cola aumentaron también el riesgo 1,2 y 1,4 veces, respectivamente. Es importante indicar que los fumadores presentan otros hábitos que se vinculan con la disminución de la DMO como son, bajo peso corporal, consumo mayor de cafeína y alcohol, y en las mujeres como ya se mencionó menopausia más temprana, las mujeres del presente estudio que fuman, consumen más bebidas alcohólicas, café y refresco de cola, sin embargo referente al peso presentan mayor sobrepeso que las que no fuman, y no en bajo peso como era de esperarse, sin embargo, cabe aclarar que fuman muy poco (un promedio de $0,45 \pm 1,5$) lo que puede explicar estos resultados significativos ($P < 0,05$). Referente al

consumo de refresco de cola, que entre otras sustancias contiene cafeína, acelera la pérdida ósea en la región lumbar en mujeres posmenopáusicas mayores aumentando el riesgo si presentan polimorfismo del gen receptor de vitamina D (VDR) (12), la vitamina D lleva a cabo numerosas funciones en el hueso a través de su VDR ya que actúa directamente sobre los osteoblastos y sobre los precursores de los osteoclastos y por lo tanto interviene activamente tanto en la formación como en la resorción ósea. La proteína VDR es una fosfoproteína de 427 aminoácidos y 48 kDa en la que se reconocen 2 dominios fundamentales, uno de unión al ADN (DBD) y otro de unión al ligando (calcitriol) (LBD). Además, el refresco de cola contiene ácido fosfórico, utilizado como aditivo, que en el humano provoca desmineralización ósea, debilitando los huesos y por tanto incrementándose la posibilidad de tener fracturas, ya que si la relación calcio/fósforo se encuentra por arriba de 1,5, se estimula la hormona paratiroidea y ésta a su vez, aumenta la actividad osteoclástica (28). Estas son dos razones importantes por lo que debe de eliminarse el consumo de refresco de cola de la dieta, ya que México, es el segundo país, después de Estados Unidos de América, con el mayor consumo en el mundo.

Cabe aclarar que las mujeres estudiadas consumen un buen aporte de calcio (1000 mg/día), por lo que en este estudio el consumo de cafeína en el refresco de cola (12 mg/día) y número de cigarrillos (1/2 al día) es mucho menor al reportado en la literatura (300 mg/día y 20 cigarrillos diarios durante 24 años respectivamente), y aun así, resultaron ser un factor de riesgo para la osteoporosis, por lo que ambos se deben evitar, más que el mismo café el cual no contiene ácido fosfórico (10,12). Es importante mencionar que no se estimó el consumo de sal ya que es muy difícil medirlo, tampoco se obtuvo el consumo de vitamina D y exposición solar, sin embargo en Querétaro todo el año tiene días soleados y esto colabora con la mejor absorción.

CONCLUSIÓN

Los factores de riesgo modificables que impactan la DMO y que se deben de evitar para prevenir osteoporosis en mujeres mexicanas perimenopáusicas de 35 a 55 años de edad, son: el bajo peso, el consumo de cigarrillo y de refresco de cola, por su contenido de cafeína y ácido fosfórico, más que el consumo de café

o de alcohol, con el fin de prevenir osteoporosis.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. 14059, México.

REFERENCIAS

1. Murillo-Urbe A, Delezé-Hinojosa M, Aguirre E, Villa A, Calva J, Cons Fj, Briseño A, González G, Morales J, Peña H, Guerrero G, Orozco J, Morales G, Elizondo J. Osteoporosis in Mexican postmenopausal women. Magnitude of the problem. Multicenter study. *Ginecol Obstet Mex* 1999 May; 227-233.
2. Aguilera-Barreiro MA, Guerrero-Mercado AS, Méndez-Jiménez TE, Milián-Suazo F. Efecto del calcio dietético vs el citrato de calcio sobre marcadores bioquímicos convencionales en mujeres perimenopáusicas. *Salud Pública Méx.*2005;47(4): 259-267.
3. Clark P.; Carlos F.; Vázquez M.J. Epidemiología, costos y carga de la osteoporosis en México. *Rev Met Óseo Min.* 2010;8(5): 152-161.
4. Clark P, Lavielle P, Franco-Marina F, Ramírez E, Salmerón J, Kanis JA, Cummings SR. Incidence rates and life-time risk of hip fractures in Mexicans over 50 years of age: a population based study. *Osteoporos Int.*2005;16(12):2025-203.
5. Clark P, Cons Molina F, Delezé M, Ragi S, Haddock L, Zanchetta JR, Jaller JJ, Palermo L, Talavera JO, Messina DO, Morales-Torres J, Salmerón J, Navarrete A, Suarez E, Pérez CM, Cummings SR. The prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries: the Latin American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). *Osteopros Int.*2008; DOI 10.1007/s00198-008-0657-4.
6. Cummings SR, Nevitt MC. Risk factors form hip fracture in White women. *N Eng J Med.*1995;332:767-73.
7. Klotzbuecher CM, Ross PD. Patients with prior fractures has an increased risk of future fractures: A summary of the literature and statistical synthesis. *J Bone Miner Res.*2000;15:721-39.
8. Melton LJ III, Atkinson EJ. Vertebral fractures predict subsequent fractures. *Osteoporosis Int.*1999;10:214-21.
9. Muñoz-Cachón MJ, Salces I, Arroyo M, Ansotegui L, Rocandio AM, Rebato E. Edad de menarquía e indicadores de adiposidad universitarias del País Vasco. *Antropología.*2006;12: 53-61.
10. Jasminka Z, L, Rhonda AB, Lisa T, Zelijka CO. To drink or Not drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly

- women?. *J Am College Nutr.* 2012;21(6):536-544.
11. Michnovicz JJ, Hersheopf RJ, Naganuma H. Increased 2-Hydroxylation of Estradiol as a Possible Mechanism for the Anti-Estrogenic Effect of Cigarette Smoking. *Eng J Med.* 1986;315(21):1305-1309.
 12. Prema Rapuri, J. Christopher Gallagher, H Karimi Kinyamu and Kay L Ryschon. Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr.* 2001;74:694-700.
 13. http://www.iofbonehealth.org/sites/default/files/PDFs/good_nutrition_for_healthy_bones.pdf. 15/mayo/2013
 14. Bischoff-Ferrari HA, Willett WC, Wong JB, et al. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA.* 2005; 293:2257-2264.
 15. Heike A. Bischoff-Ferrari HA, Walter C, Willett WC, Wong JB, et al. Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* may. 2005; 293:2257-64.
 16. Taucher B, Dainty JR, Spinks CA, Majsak-Newman G, Berry DJ, Hoogewerff JA, Foxall RJ, Jakobsen J, Cashman kD, Flynn A, Fairweather-Tait SJ. Sodium and bone health: the impact of moderately high and low salt intakes on calcium metabolism in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2008; 23:1477-85.
 17. A. Mavroei, AD Stewart, DM Reid, HM Macdonald. Physical activity and dietary calcium interactions in bone mass in Scottish postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2009;20(3):409-416.
 18. Espallargues M, Sampietro-Colom L, Estrada MD, Sola M, del Rio L, Setoain J, Granados A. Identifying bone-mass-related risk factors for fracture to guide bone densitometry measurements: a systematic review of the literature. *Osteoporos Int.* 2001;12:811-22.
 19. Langlois JA, Mussolino ME, Visser M, Looker AC, Harris T, Madans J. Weight loss from maximum body weight among middle-aged and older white women and the risk of hip fracture: the NHANES I epidemiologic follow-up study. *Osteoporos Int.* 2001;12:763-8.
 20. Bray GA. Clasificación y valoración de las obesidades. *Obesidad: Aspectos básicos y aplicaciones clínicas.* Ed. Interamericana. 1989; p.191-218.
 21. www.ipaq.ki.se y en Booth, M.L (2000). Assessment of Physical Activity: An International Perspective. *Research Quarterly for Exercise and Sport,* 71(2):s114-20.
 22. <http://regions.iofbonehealth.org/download/osteofound/filemanager/risktest/risk-test-spanish.pdf> 15 mayo 2013.
 23. Hernández Y, Hernández R. Relación del índice cintura-cadera con la masa y el porcentaje de grasa corporal. *Arch Latinoamer Nutr.* 1997;47(4): 315-322.
 24. Lewiecki EM, Baim S, Langman CB and Bilezikian JP. The official positions of the 430 International Society from Clinical Densitometry: perceptions and commentary. *J Clin Densitometry* 2009; 12(3):267-271.
 25. Edelstein SL, Barret-Connor E. Relation between body size and bone mineral density in elderly men and women. *Am J Epidemiol.* 1993;138:160.
 26. Halioua L, Anderson JB. Lifetime calcium intake and physical activity habits: Independent and combined effects on the radial bone of healthy premenopausal caucasian women. *Am J Clin Nutr.* 1989;49:534.
 27. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J Bone Miner Res.* 1993;8:567-73.
 28. Whiting SJ, Boyle JL, Thompson A, Mirwald RL and Faulkner RA. Dietary protein, phosphorus and potassium are beneficial to bone mineral density in adult men consuming adequate dietary calcium. *J Am Clin Nutr.* 2002;21:402-409.

Recibido: 10-01-2013

Aceptado: 26-05-2013

Prevention of liver steatosis through fish oil supplementation: correlation of oxidative stress with insulin resistance and liver fatty acid content

Alejandra Espinosa, Rodrigo Valenzuela B., Daniel González-Mañán, Amanda D'Espessailles T., Juan Guillermo Gormaz, Cynthia Barrera R., Gladys Tapia O.

Medical Technology School, Nutrition and Dietetics School, Molecular and Clinical Pharmacology Program, Institute of Biomedical Sciences Faculty of Medicine, University of Chile, Santiago, Chile.

SUMMARY. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is triggered by a nutritional-metabolic alteration characterized by triacylglycerides accumulation, insulin resistance (IR), oxidative stress and depletion of polyunsaturated fatty acid (PUFA). The n-3 PUFA, such as eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, would be hepatoprotective against the development of NAFLD by stimulating lipolysis and inhibit lipogenesis. So, fish oil supplementation (EPA + DHA) prevents HFD-induced NAFLD. In this context, the aim of this study is to evaluate the correlation between liver oxidative stress with IR and levels of PUFA in supplemented mice. Male mice C57BL/6J (n=9) were fed for 12th week: a) control diet (20% protein, 70% carbohydrate, 10% lipids), b) control diet and fish oil supplementation (200 mg EPA+DHA/kg/day), c) high fat diet (20% protein, 20% carbohydrate, 60% lipids), and d) high fat diet and fish oil supplementation. Liver steatosis (histology), insulin resistance (HOMA), liver oxidative stress (GSH/GSSG, carbonyl protein and 8-isoprostanes) and liver fatty acid content were evaluated. The significant decrease in liver oxidative stress parameters ($p < 0.05$, ANOVA followed by Newman Keuls test) were correlated (Pearson test) with HOMA and levels of PUFA, along with the hepatoprotection observed. It concludes that prevention of NAFLD by supplementation with fish oil (EPA+DHA) is dependent of the prevention of liver oxidative stress, IR and PUFA depletion.

Key words: Docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid, insulin resistance, n-3 fatty acids, non-alcoholic fatty liver disease, oxidative stress

RESUMEN. Prevención de la esteatosis hepática mediante suplementación con aceite de pescado: correlación de los niveles hepáticos de ácidos grasos poliinsaturados con el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina. La enfermedad por hígado graso no alcohólica (EHGNA) está provocada por una alteración metabólico-nutricional caracterizada por la acumulación de triacilglicéridos, resistencia a la insulina, estrés oxidativo y disminución de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Los AGPI ω -3, como los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), serían hepatoprotectores contra la EHGNA al estimular la lipólisis e inhibir la lipogénesis hepática. La suplementación con aceite de pescado (EPA + DHA) previene la esteatosis hepática inducida por una dieta alta en grasas. En este contexto, el objetivo de este estudio es evaluar la correlación entre el estrés oxidativo hepático, la resistencia a la insulina y los niveles de AGPI ω -3 en ratones suplementados. Ratones machos C57BL/6J (n=9) alimentados durante 12 semanas con: a) dieta control (20% proteína, 70% hidratos de carbono, 10% lípidos), b) dieta control y suplementación con 200 mg de EPA+DHA/kg/día, c) dieta alta en grasa (20% proteína, 20% hidratos de carbono, 60% lípidos), y d) dieta alta en grasas más EPA+DHA. Se evaluaron la esteatosis hepática (histología), resistencia a la insulina (HOMA), estrés oxidativo hepático (GSH/GSSG, proteínas carboniladas y 8-isoprostanos) y el contenido de ácidos grasos hepáticos. La disminución significativa en los parámetros hepáticos de estrés oxidativo ($p < 0,05$, ANOVA seguido de Newman-Keuls) se correlacionó positivamente (test de Pearson) con el HOMA y los niveles de AGPI ω -3, junto con la hepatoprotección observada. Se concluye que la prevención de EHGNA por suplementación con EPA+DHA, se acompaña de una correlación inversa entre el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina y la disminución de AGPI ω -3 hepáticos.

Palabras clave: Acido docosahexaenoico, acido eicosapentaenico, resistencia a la insulina, ácidos grasos ω -3, enfermedad por hígado graso no alcohólica, estrés oxidativo.

INTRODUCTION

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by pathological accumulation of fat at hepatic level in the absence of any other

disease related to liver steatosis, which includes a wide spectrum of liver diseases ranging from mild asymptomatic fatty liver to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and cirrhosis (1). NAFLD is considered the hepatic expression of the metabolic syndrome, a condition associated with hypertension,

insulin resistance (IR), obesity and dyslipidemia (2). Although the pathogenic mechanisms involved in hepatic lipid accumulation are not completely understood, liver steatosis may result from an imbalance between lipid availability, either from enhanced blood uptake and/or *de novo* lipogenesis, and lipid disposal, either from decreased mitochondrial and peroxisomal fatty acid (FA) β -oxidation and/or reduced ability of lipid output by the liver (3). The establishment of steatosis in the liver may eventually lead to lipid peroxidation with production of concomitant hepatic injury (4). Alterations in the bioavailability of long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) occur in cardiovascular disease, obesity, type II diabetes, and NAFLD, in association with the inflammatory response component of these pathologies (5,6). NAFLD is characterized by impairment in the bioavailability of liver n-6 and n-3 LCPUFAs, with concomitant significant depletion of n-3 LCPUFA content and enhancement in the n-6/n-3 LCPUFA ratio (6). It is important to point out that LCPUFAs are crucial components for membrane functions, due to their role in establishing adequate membrane fluidity, or signalling functions due to their role as second messengers regulating signal transduction processes, with a minor contribution to the energy reserves within the cell (7). Under physiological conditions, the liver is able to synthesize most of LCPUFAs from dietary precursors, whereas other organs such as testicles and brain have a limited capacity (8).

Within the n-3 fatty acid family, eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3, EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6 n-3, DHA) are the most important fatty acids since they are involved in several functions in the normal development of human from their early embryonic life to the elderly (9). DHA is important during fetal and postnatal neurogenesis (9). Similarly, health properties (anti-inflammatory and anticoagulant) of EPA suggest that the consumption of this fatty acid is beneficial in the prevention and treatment of non-transmissible chronic diseases and other inflammatory diseases (5,10). In fact, prevention of ischemia/reperfusion injury in the liver by n-3 LCPUFAs has been established (11). Furthermore, recent studies suggest that the anti-steatotic effects of EPA and DHA in the liver include directing fatty acids away from triglyceride storage with promotion of their oxidation, as well as an enhanced glucose flux to glycogen synthesis (12). In the view of these considerations, the present

study was aimed to test the hypothesis that dietary fish oil supplementation prevents liver steatosis and IR induced by high fat diet administration in mice, and correlates IR and PUFA depletion with liver oxidative stress. For this purpose, parameters related to the metabolic syndrome (serum glucose, insulin), liver oxidative stress (GSH/GSSG, protein carbonyl and 8-isoprostanes), liver steatosis (morphological characteristic) and fatty acid composition were determined.

MATERIAL AND METHODS

Animals, diet and supplementation with fish oils

Weaning male C57BL/6J mice weighing 12-14 g (Bioterio Central, ICBM, Faculty of Medicine, University of Chile) were randomly assigned to each experimental group and allowed free access to specially formulated control or high fat diets (control diet: 10% fat-derived kcal, 20% protein, and 70% carbohydrate; high fat diet: 60% fat-derived kcal, 20% protein, and 20% carbohydrate; Research Diet INC, Rodent Diet, Product data D12450B and D12492, USA). Animals received water *ad libitum* and were housed on a 12-hour light/dark cycle. From days 1 to 84 (12 weeks), the n-3 PUFA supplemented groups received fish oil (Acolest TG Product. Procaps, Colombia) and the control groups isovolumetric amounts of saline, thus comprising four experimental groups: (a) control diet (control), (b) control diet plus fish oil, (c) high fat diet (HFD), and (d) HFD plus fish oil. Under these conditions, the fish oil groups received oral supplementation of 200 mg/kg/day of fish oil, which contained 108 mg/kg/day of EPA and 92 mg/kg/day of DHA. Weekly controls of body weight and diet intake were performed through the whole period. At the end of the 12th week, animals were fasted (6-8 h), anesthetized with ketamine/xylazine (150 mg/kg/10 mg/kg). Blood samples were obtained by cardiac puncture for serum AST, ALT, glucose and insulin assessments. Liver samples were frozen in liquid nitrogen (for determination of fatty acid composition) or fixed in phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin, and stained with hematoxylin-eosin (for morphology assessment). The histology score was defined as the sum of the steatosis and inflammation scores, both graded as absent (0), mild (1), moderated (2) and severe (3) (13). Experimental animal protocols and animal procedures complied with the Guide for the Care and Use of

Laboratory Animals (National Academy of Sciences, NIH Publication 86-23, revised 1985) and were approved by Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Chile (CBA 0386 FMUCH).

Measurements of serum glucose and insulin

Serum glucose (mM) was measured using specific diagnostic kits (Wiener Lab, Argentina). A commercial immunoassay kit for mice serum insulin assessment ($\mu\text{U}/\text{mL}$) was used, according to the manufacturer's instructions (Mercodia, Uppsala, Sweden). IR was estimated by the homeostasis model assessment method (HOMA) [$\text{fasting insulin } (\mu\text{U}/\text{mL}) \times \text{fasting glucose } (\text{mM})/22.5$].

Liver parameters related to oxidative stress

In anesthetized animals, livers were perfused in situ with a cold solution containing 150 mM KCl and 5 mM Tris (pH 7.4) to remove blood. Total reduced glutathione (GSH), carbonyl protein and total protein contents were measured (14). 8-isoprostanes (pg/g) were measured using specific diagnostic kits (Cayman 8-isoprostanes EIA kits, USA).

Fatty acid analysis

Fatty acid analyses of both diets and liver samples were performed by gas-liquid chromatography (GLC). Samples were assessed for lipid extraction according to Bligh and Dyer (15) and transformed into fatty acid methyl esters (FAME) with methanolic boron trifluoride (12% methanolic solution), and stored at -20°C until analysis. The GLC of FAME was performed using Hewlett-Packard equipment (model 6890A), with a capillary column (Agilen HP-88, 60m \times 0.25mm; I.D. 0.25 mm) and flame ionization detector for FAME detection. Hydrogen was the carrier gas. The retention times of FAME were compared to a standard mixture (Nu-Check Prep). C23:0 was used as internal standard. Fatty acids were expressed as $\text{g}/100\text{g}$ liver.

Net changes in hepatic EPA and DHA induced by HFD was calculated by subtracting mean values in the control diet group from individual values in the group subjected to control diet supplemented with fish oil and the mean values in the HFD group from individual values in the group given HFD and fish oil.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the

GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc. San Diego, USA). The values shown represent the mean \pm SEM for the number of separate experiments indicated. Statistical significance of differences between mean values was assessed by a one-way ANOVA and the Newman-Keuls test. A p-value of <0.05 was considered significant. The Pearson order correlation coefficient was used.

RESULTS

Body weight increment

There were significant differences in the final weight but not in the initial weight. The (c) group (39.8 ± 7.7 g) presented the higher increment in the body weight compared to the other groups. Also within the other groups there were not observed significant differences in the body weight ($a=33.2 \pm 1.1$ g; $b=29.2 \pm 2.9$ and $d=32.5 \pm 3.5$).

Liver steatosis

The (c) group showed the higher increment in liver steatosis compared to other groups with severe liver steatosis (60-80% micro and macro vesicular) (Fig. 1C). Other groups did not show liver steatosis; groups (a) and (b) under 5% (Fig. 1A and 1B), group 8d under 10% micro and macro vesicular (Fig. 1D).

Metabolic parameter related to insulin resistance

Table 1 shows the insulin resistance index (HOMA) in the experimental groups. The (c) group presented the higher value in HOMA compared to other groups. Although HOMA of (d) index is greater ($P<0.05$) than (a) and (b) groups, this value lies within normal ranges.

Liver parameters related to oxidative stress

Table 1 shows the liver parameters related to oxidative stress in hepatic samples. The (c) group showed a significant depletion of total GSH/GSSG and an increment in protein carbonyl and 8-isoprostanes levels compared to the other groups. Within the other groups there were not observed significant differences although (d) group showed higher 8-isoprostane value compared to (a) and (b).

Hepatic fatty acid content

Table 2 shows the fatty acid composition of hepatic samples. Total saturated fatty acid (SAFA) content was

significantly higher in HFD mice compared to all other experimental groups. However, control diet and HFD plus fish oil groups showed higher total SAFA value compared to control diet plus fish oil group. Total monounsaturated fatty acid (MUFA) content was significantly higher in HFD group compared to control and control diet plus fish oil groups. Total polyunsaturated fatty acid (PUFA) and long-chain polyunsaturated fatty acid (LCPUFA) content were significantly higher in con-

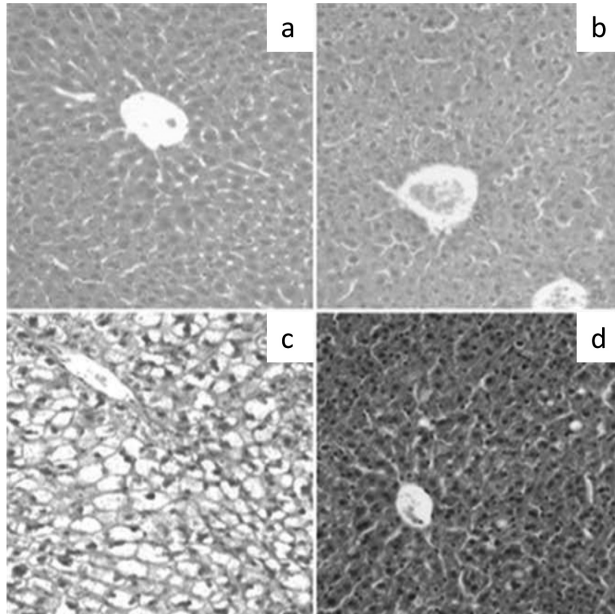


FIGURE 1.

Effect of fish oil supplementation on liver histology in mice subjected to high fat diet (HFD).

Representative liver sections from animals given (a) control diet, (b) control diet plus fish oil, (c) HFD, and (d) HFD plus fish oil (hematoxylin-eosin liver sections from a total of 9 animals per experimental group; original magnification x 40).

TABLE 1. Liver oxidative stress parameters and homeostasis model assessment (HOMA) index for all experimental groups.

	Groups		
	a	b	c
HOMA	1.7 ± 0.2 ^c	1.5 ± 0.3 ^c	9.1 ± 1.2 ^{a,b,d}
GSH/GSSG	20.2 ± 2.5 ^c	20.4 ± 3.2 ^c	11.7 ± 1.5 ^{a,b,d}
Carbonyl protein (nmoles carbonyl /mg protein)	1.6 ± 0.3 ^c	2.1 ± 0.4 ^c	4.2 ± 1.1 ^{a,b,d}
8-isoprostanes (pg/mg liver)	10.2 ^{c,d} ± 0.4	10.3 ± 0.5 ^{c,d}	14.8 ± 0.9 ^{a,b,d}

Values represent means ± SDM for twelve mice per experimental groups: (a) control diet (b) control diet plus fish oil (c) HFD (d) HFD plus fish oil. Significant differences between groups are indicated by the letters identifying each group (P<0.05 one-way ANOVA and Newman-Keuls test).

trol diet plus fish oil group compared to the other groups; control diet and HFD groups did not shown significant differences in PUFA and LCPUFA contents. Control group showed an increased n-6 total PUFA content compared to all others group; in contrast, n-3 total PUFA content was higher in control diet plus fish oil group compared to the all other groups. However, in the HFD group the value was significantly low compared to control without supplementation and HFD plus fish oil. In other hand, EPA and DHA content were significantly different in all groups; the highest value was observed in control diet plus fish oil group and it was significantly low in HFD group. In addition, the n-6/n-3 ratio was also significantly different in all groups; it was significantly high HFD group compared to all others and significantly low in control plus fish oil. The net changes in liver EPA and DHA content induced by HFD in non-supplemented and subjected to fish oil supplementation mice were significantly different; EPA and DHA were significantly reduced in mice fed with HFD. However, EPA was significantly more reduced than DHA (Fig. 2).

Correlation between liver oxidative stress, insulin resistance and fatty acid composition

In the studied mice, insulin resistance (HOMA index) was correlated with the liver parameters of oxidative stress, where the HOMA index was positively correlated with the protein carbonyl ($r=0.82$; $P<0.0001$) (Fig. 3A) and 8-isoprostanes ($r=0.78$; $p<0.0001$) (Fig 3B), and negatively correlated with GSH/GSSG ratio ($r=0.5$; $p<0.001$) (Fig 3C).

The liver oxidative stress, specifically the lipoperoxidation indicators (8-isoprostanes) was correlated with liver fatty acid composition. The liver oxidative stress was positively correlated with SAFA ($r=0.71$; $p<0.0001$), MUFA ($r=0.75$; $P<0.0001$) (Fig. 4a) and n-6/n-3 ratio ($r=0.73$, $p<0.0001$) hepatic content. However, the PUFA ($r=-0.81$; $p<0.0001$), LCPUFA ($r=-0.80$; $p<0.0001$), n-6 total PUFA ($r=-0.58$; $P<0.0003$), n-3 PUFA ($r=-0.71$;

TABLE 2. Fatty acid composition of total lipids in hepatic tissue for all experimental groups.

Fatty acid	Fatty acid composition (g/100g FAME)			
	Groups			
	a	b	c	d
18:2, n-6	12.6 ± 1.6	12.1 ± 1.2	9.7 ± 1.8	11.8 ± 1.6
18:3, n-3	0.3 ± 0.07	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2
20:4, n-6 (AA)	12.9 ± 1.6 ^{c,d}	10.6 ± 0.7 ^{c,d}	8.77 ± 0.9 ^{a,b}	8.1 ± 1.1 ^{a,b}
20:5, n-3 (EPA)	0.5 ± 0.1 ^{b,c,d}	5.7 ± 0.8 ^{a,c,d}	0.21 ± 0.1 ^{a,b,d}	1.0 ± 0.5 ^{a,b,c}
22:6, n-3 (DHA)	3.9 ± 0.5 ^{b,c,d}	8.8 ± 0.9 ^{a,c,d}	1.7 ± 0.4 ^{a,b,d}	5.1 ± 0.6 ^{a,b,c}
Total SAFA	38.7 ± 2.7 ^{b,c}	33.8 ± 1.8 ^{a,c,d}	45.2 ± 3.6 ^{a,b,d}	40.1 ± 11.1 ^{b,c}
Total MUFA	29.1 ± 1.8 ^c	25.3 ± 1.1 ^{c,d}	31.0 ± 1.8 ^b	29.1 ± 1.8 ^b
Total PUFA	32.3 ± 2.8 ^{b,c}	39.9 ± 1.9 ^{a,c,d}	23.7 ± 2.4 ^{a,b,d}	32.5 ± 2.4 ^{b,c}
LCPUFA	20.5 ± 2.5 ^{b,c}	26.7 ± 1.6 ^{a,c,d}	11.8 ± 0.8 ^{a,b,d}	16.9 ± 1.4 ^{b,c}
Total n-6 PUFA	25.7 ± 3 ^{b,c,d}	22.7 ± 2.7 ^a	19.9 ± 4.4 ^a	19.8 ± 3.5 ^a
Total n-3 PUFA	5.5 ± 0.6 ^{b,c,d}	14.2 ± 1.2 ^{a,c,d}	2.2 ± 0.5 ^{a,b,d}	6.6 ± 0.9 ^{a,b,c}
n-6/n-3 ratio	4.7 ± 0.9 ^{b,c,d}	1.6 ± 0.2 ^{a,c,d}	8.9 ± 1.9 ^{a,b,d}	3.4 ± 0.7 ^{a,b,c}

Fatty acid composition was determinate in liver total lipids by GLC in all experimental groups: (a) control diet (b) control diet plus fish oil (c) HFD (d) HFD plus fish oil. Values represent means ± SDM for twelve mice per experimental group. Significant differences between groups are indicated by the letters identifying each group ($P < 0.05$ ANOVA and the Newman-Keuls test). Saturated fatty acid (SAFA) are 12:0, 14:0, 16:0 and 18:0. Mono-unsaturated fatty acids (MUFA) are 14:1, n-7, 16:1, n-7 and 18:1. Poly-unsaturated fatty acids (PUFA) are 18:2, n-6 and 18:3, n-3. Long-chain poly-unsaturated fatty acids are 20:4, n-6, 20:5, n-3 (eicosapentaenoic acid, EPA), 22:5, n-3, and 22:6, n-3 (docosahexaenoic acid, DHA). Table adapted from Valenzuela et al., 2012 (18).

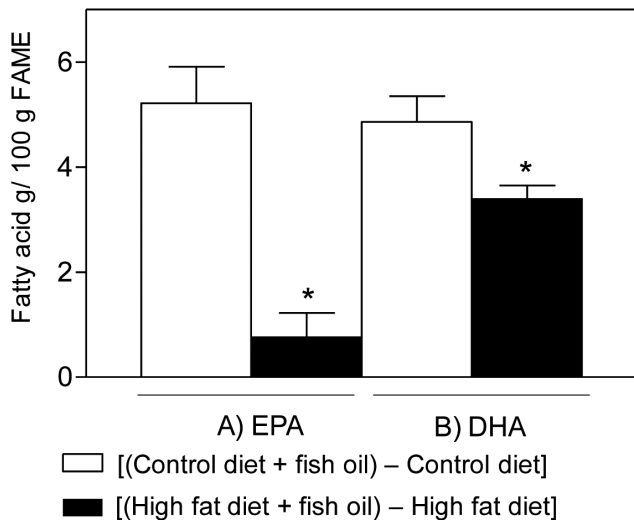


FIGURE 2. Net changes in hepatic EPA and DHA induced by HFD) in non-supplemented mice and animals subjected to fish oil supplementation. Values shown means ± SDM for net changes in EPA and DHA contents in control diet and high fat diet, of nine mice per experimental group. $P < 0.05$ assessed by Student's t-test for unpaired data.

$p < 0.0001$), EPA ($r = -0.50$; $p < 0.001$) and DHA ($r = -0.66$; $p < 0.0001$) hepatic content were negatively correlated with liver oxidative stress (Fig. 4a and 4b).

DISCUSSION

The data presented showed that HFD in mice induces liver macro and microvesicular steatosis, IR, liver oxidative stress and depletion of PUFA, especially n-3 PUFA. Alterations related with oxidative stress were generated by the increasing availability and oxidation of fatty acid in the liver (4), and the increment in generation of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria (3). The liver oxidative

stress is associated with depletion of PUFA, especially EPA and DHA, and with an important increment of n6/n-3 ratio (6). The molecular mechanisms whereby HFD induced liver steatosis include two principal elements: (i) insulin resistance-dependent peripheral lipolysis and FA mobilization to the liver; (ii) stimulation of hepatic de novo lipogenesis under conditions of liver n-3 LCPUFA depletion (3,4,16). Fish oil supplementation (108 mg/kg/day of EPA and 92 mg/kg/day of DHA) in mice subject to HFD prevents liver steatosis along with prevention of IR and liver oxidative stress. In this context, the fish oil rich in EPA and DHA supplementation is related with prevention and treatment of IR (4,5). This effects are explained by the regulation of lipid metabolism mediated by n-3 LCPUFAs, associated with the following mechanisms: i) activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) triggers fatty acid oxidation through the induction of expression of acyl-CoA oxidase and carnitine palmitoyl transferase 1- α ; ii) down-regulation of sterol

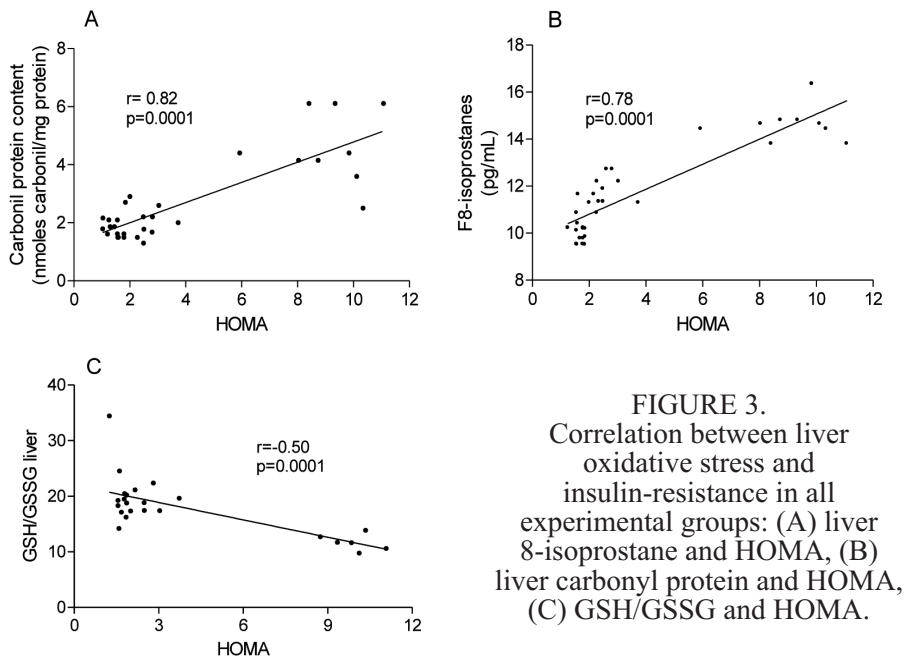


FIGURE 3. Correlation between liver oxidative stress and insulin-resistance in all experimental groups: (A) liver 8-isoprostane and HOMA, (B) liver carbonyl protein and HOMA, (C) GSH/GSSG and HOMA.

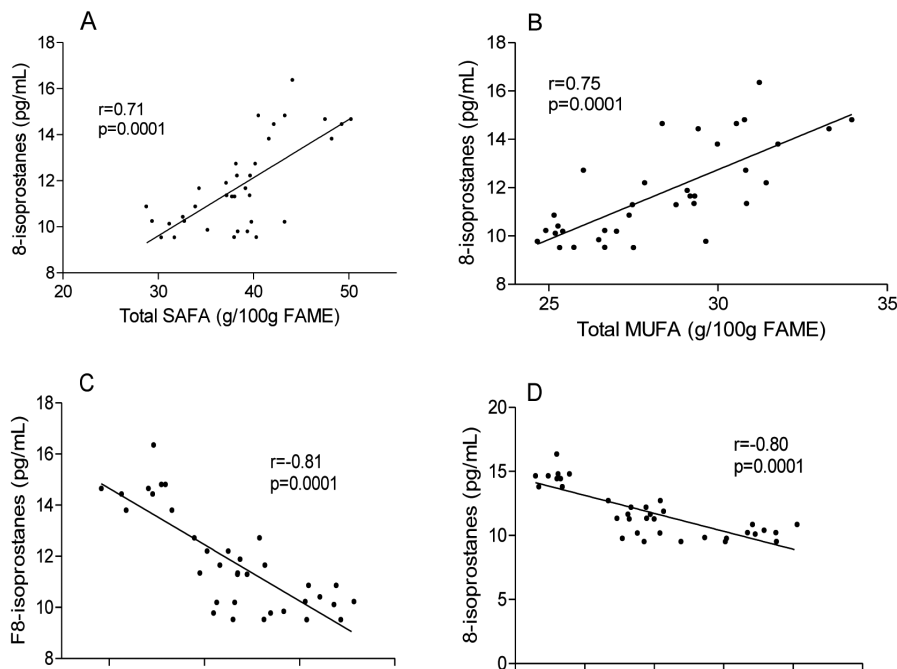


FIGURE 4a. Correlation between lipid liver oxidative stress and fatty acid composition of liver total lipids: (A) SAFA, (B) MUFA, (C) PUFA, (D) LCPUFA.

regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) expression and its processing, with inhibition of the transcription of lipogenic genes (fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase, stearoyl-CoA desaturase-1), reducing de novo lipogenesis (4,6,16). The significant reduction in the increase of hepatic parameters related to oxidative stress generated in HFD group due to fish oil supplement-

tation might be an effect related to an increase in antioxidant capacity generated by these fatty acids in the liver (6,17). These mechanisms would be associated with n-3 LCPUFA indirect antioxidant action, implying regulation of the proteins expression such as heme oxygenase, glutamate cysteine ligase (17), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase, glutathione S-transferase and catalase, where the main mechanism would be the activation of Nrf2 by lipid peroxidation products of these fatty acids (17). The oxidative stress reduction generated by ω -3 PUFAs are not yet fully understood but some studies suggest that consumption of alpha linolenic acid (ALA), EPA and DHA can reduce oxidative damage in humans and animals (5,18). In other study was observed a significant decrease in plasma concentrations of hydrogen peroxide when performed exercise in athletes supplemented with EPA (2224 mg / day) and DHA (2208 mg / day) (19). In turn, there was an increase in plasma levels of GPX, superoxide dismutase (SOD) and iron reducing potential along with a decrease in malondialdehyde levels in hemodialysis patients receiving 3g/day of EPA/DHA for 2 months (20). A similar situation was observed in older adults supplemented with 2 g of fish oil/day (25% EPA, DHA 52.4%, 5.8% docosapentaenoic acid (DPA))

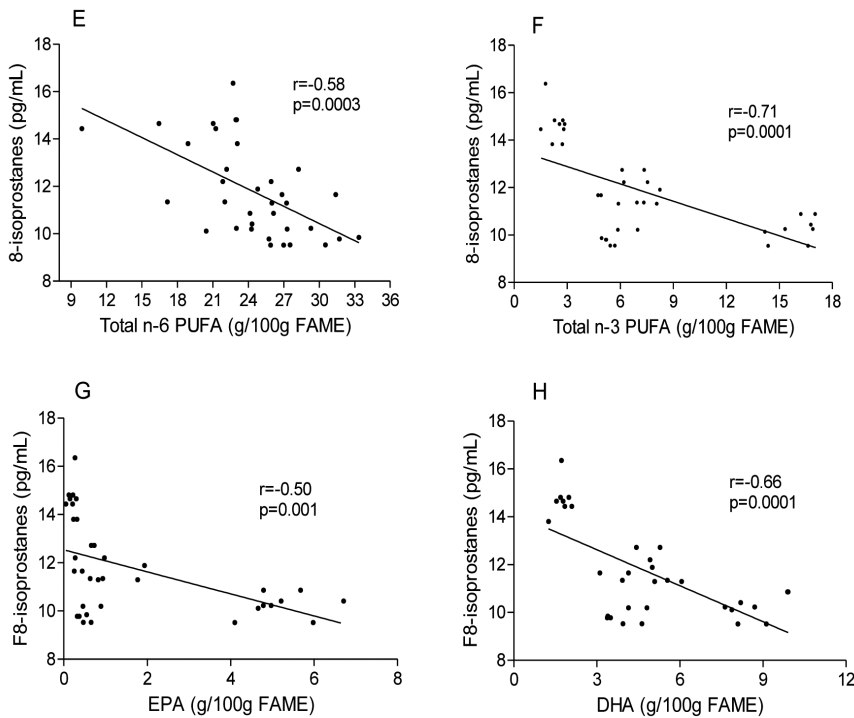


FIGURE 4b. Correlation between lipid liver oxidative stress and fatty acid composition of liver total lipids: (E) n-6 PUFA, (F) n-3 PUFA, (G) EPA, (H) DHA.

which increased both the plasma activity of SOD and glutathione concentration (21). In the same way, in other study was found that dietary supplementation for 30 days with fish oil (0.4 g/kg/day) increased erythrocyte catalase activity and decreases the plasma levels of malondialdehyde and NO in male Wistar rats fed a normal diet (22).

EPA and DHA depletion and their content in liver induced by HFD in non-supplemented mice versus animals subjected to fish oil supplementation were significantly different. EPA and DHA were significantly reduced in mice fed with HFD. In addition, EPA was significantly more reduced than DHA. The significant depletion of EPA and DHA in (d) group can be attributed to the consumption of this fatty acid for the activation of hepatoprotective mechanisms to prevent liver steatosis, IR and liver oxidative stress. So, the effects produced by fish oil dietary supplementation can be explained directly by the presence of EPA and DHA, as well as fatty acid derivatives such as resolvines and protectins (10). Results from the present study can establish that supplementation with fish oil prevents liver steatosis, IR and liver oxidative stress in

mice fed with HFD, where this effects are directly correlated with liver oxidative stress status (GSH/GSSG, protein carbonyl and 8-isoprostanes). Future works must be focused on the study of molecular mechanisms involved in the hepatoprotection generated by fish oil supplementation against the injury induced by HFD in mice, especially the mechanisms that may involve lipid metabolism (PPAR- α , PPAR- γ and SREBP-1c), redox activation of Nrf2 and/or down-regulation of inflammatory gene expression through interactions involving n-3 LCPUFA-dependent PPAR- α activation and further PPAR- α -mediated inhibition of NF- κ B p65 subunit by inactive complex formation. In addition to studying the fish oil beneficial effects will be necessary to evaluate whether this ef-

fect is observed in oils rich in α -linolenic acid where the consumption of this oils produce an increase in both hepatic content of EPA and DHA and in PPAR- α expression (23).

REFERENCES

1. Bellentani S., Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol.* 2009; 8:S4-S8.
2. Alberti K.G., Zimmet P., Shaw J. IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome - a new worldwide definition. *Lancet.* 2005; 366: 1059- 62.
3. Musso G., Gambino R., Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progr Lipid Res.* 2009; 48: 1-26.
4. Videla L.A., Rodrigo R., Araya J., Poniachik J. Insulin resistance and oxidative stress interdependency in non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Mol Med.* 2006; 12: 555-8.
5. Poudyal H., Panchal S.K., Diwan V., Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res.* 2011; 50: 372-87.

6. Valenzuela R., Videla L.A. The importance of the long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in development of non-alcoholic fatty liver associated with obesity. *Food Funct.* 2011; 2: 644-8.
7. Uauy R., Mena P., Rojas C. Essential fatty acids in early life: structural and functional role. *Proc Nutr Soc.* 2000; 59: 3-15.
8. Brenner R.R. Hormonal modulation of $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases: case of diabetes. *Prostag Leukotr Ess.* 2003; 68: 151-62.
9. Campoy C., Escolano-Margarit M.V., Anjos T., Sza-jewska H., Uauy R. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Br J Nutr.* 2012; 107: S85-106.
10. Serhan C.H., Petasis N. Resolvins and Protectins in Inflammation Resolution. *Chem Rev.* 2011; 111:5922-43.
11. Mardones M., Valenzuela R., Romanque P., Covarrubias N., Anghileri F., Fernández V., Videla L.A., Tapia G. Prevention of liver ischemia reperfusion injury by a combined thyroid hormone and fish oil protocol. *J Nutr Biochem.* 2012; 23: 1113-20.
12. Capanni M., Calella F., Biagini M.R., Genise S., Raimondi L., Bedogni G., Svegliati-Baroni G., Sofi F., Milani S., Abbate R., Surrenti C., Casini A. Prolonged n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006; 23: 1143-51.
13. Piro S., Spadaro L., Russello M., Spampinato D., Oliveri C.E., Vasquez E., Benigno R., Brancato F., Purrello F., Rabuazzo A.M. Molecular determinants of insulin resistance, cell apoptosis and lipid accumulation in non-alcoholic steatohepatitis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008; 18: 545-52.
14. Reznick A.Z., Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233: 357-63.
15. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian J Biochem Physiol.* 1959; 37: 911-7.
16. Pettinelli P., Del Pozo T., Araya J., Rodrigo R., Araya A.V., Smok G., Csendes A., Gutierrez L., Rojas J., Korn O., Maluenda F., Diaz J.C., Rencoret G., Braghetto I., Castillo J., Poniachik J., Videla L.A. Enhancement in liver SREBP-1c/PPAR- α ratio and steatosis in obese patients: correlations with insulin resistance and n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid depletion. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1792: 1080-6.
17. Gao L., Wang J., Sekhar K.R., Yin H., Yared N.F., Schneider S.N., Sasi S., Dalton T.P., Anderson M.E., Chan J.Y., Morrow J.D., Freeman M.L. Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *J Biol Chem.* 2007; 282: 2529-37.
18. Valenzuela R., Espinosa A., González-Mañán D., D'Espessailles A., Fernández V., Videla L.A., Tapia G. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation significantly reduces liver oxidative stress in high fat induced steatosis. *Plos One.* 2012; 7:e46400.
19. Bloomer R.J., Larson D.E., Fisher-Wellman K.H., Galpin A.J., Schilling B.K. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on resting and exercise-induced inflammatory and oxidative stress biomarkers: a randomized, placebo controlled, cross-over study. *Lipids Health Dis.* 2009; 19, 8-36.
20. Tayyebi-Khosroshahi H., Houshyar J., Tabrizi A., Vatankeh A.M., Razzagi Zonouz N., Dehghan-Hesari R. Effects of omega-3 fatty acid on oxidative stress in patients on hemodialysis. *Iran J Kidney Dis.* 2010; 4, 322-26.
21. Romieu I., Garcia-Esteban R., Sunyer J., Rios C., Alcaraz-Zubeldia M., Velasco S.R., Holguin F. The effect of supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids on markers of oxidative stress in elderly exposed to PM(2.5). *Environ Health Perspect.* 2008; 116, 1237-47.
22. Iraz M., Erdogan H., Ozyurt B., Ozugurlu F., Ozgocmen S., Fadillioglu E. Brief communication: omega-3 essential fatty acid supplementation and erythrocytes oxidant/antioxidant status in rats. *Ann Clin Lab Sci.* 2005; 35, 169-73.
23. González-Mañán D., Tapia G., Gormaz J.G., D'Espessailles A., Espinosa A., Masson L., Varela P., Valenzuela A., Valenzuela R. Bioconversion of α -linolenic acid to n-3 LCPUFA and expression of PPAR-alpha, acyl coenzyme A oxidase 1 and carnitine acyl transferase I are incremented after feeding rats with α -linolenic acid-rich oils. *Food Funct.* 2012; 3: 765-72.

Recibido: 24-01-2013

Aceptado: 15-05-2013

Efecto de una intervención educativa sobre el consumo de frutas, verduras y pescado en familias de niños preescolares y escolares

Gabriela Fretes, Judith Salinas, Fernando Vio

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile. Santiago, Chile.

RESUMEN. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de una intervención educativa sobre el consumo de frutas, verduras y pescado en familias de niños preescolares y escolares mediante una intervención de tres meses y una evaluación antes y después, en 27 familias intervenidas y 32 controles, de colegios municipales de una comuna de Santiago, Chile. Al inicio y final de la intervención se aplicó a cada niño y su padre una encuesta de frecuencia de consumo de frutas, verduras y pescado y de conocimientos, actitudes y prácticas de alimentación familiar. La intervención consistió en seis talleres de cocina de 90 minutos cada uno para los encargados de la preparación de alimentos en el hogar, utilizando además video y fotografía participativa. Los resultados mostraron un mayor consumo de frutas, verduras y pescado en el grupo intervenido (test de *Kolmogorov-Smirnov*, test de *Wilcoxon*, $p < 0,05$). Al comparar el consumo pre-post por grupo, las diferencias resultaron significativas para el intervenido en todos los casos (test de *Wilcoxon para muestras pareadas*, $p < 0,05$). En los padres, el consumo de frutas aumentó en 135,8 g, el de verduras en 19,5 g y el de pescado en 10,2 g diarios. En los niños, las frutas aumentaron 92,1 g, las verduras 65,9 g y el pescado 5,2 g al día. Todas las familias intervenidas ($n=22$) incorporaron algún cambio significativo en la alimentación saludable de su hogar. Los resultados muestran que es posible realizar cambios en los hábitos alimentarios de las familias, con la implementación de una intervención educativa que incluya talleres de cocina y materiales audiovisuales.

Palabras clave: Alimentación saludable; educación nutricional; consumo de frutas, verduras y pescado; talleres de cocina.

SUMMARY. Effect of a nutrition education intervention on consumption of fruits, vegetables and fish in families of preschoolers and scholars. The objective of this study was to assess the impact of a nutrition education intervention on fruits, vegetables and fish consumption in pre-school and school age children families, through a three months education intervention with a pre-post evaluation in 27 intervened families and 32 controls from public schools in Santiago, Chile. A food-frequency questionnaire on fruits, vegetables and fish, and a survey on food and nutrition knowledge, attitudes and practices were applied to children and their parents. The intervention consisted in six 90 minutes cooking workshops, including the utilization of videos and photovoice for those who cooked in the families. Results showed a significant more consumption of fruits, vegetables and fish in the intervened than in the control group (test de *Kolmogorov-Smirnov*, test de *Wilcoxon*, $p < 0,05$). Comparing pre-post consumption by group, significance differences were for the intervened group in all cases. (test de *Wilcoxon for paired samples*, $p < 0,05$). In parents, fruit consumption increased 135.8 g, vegetables 19.5 g, and fish 10.2 g per day. In children, the increase in fruits was 92.1 g, vegetables 65.9, and fish 5.2 g per day. All the intervened families ($n=22$) introduced a significant healthy food improvement at home. Results showed that it is possible to change food habits in families with the implementation of a nutrition education intervention including cooking workshops, videos and photovoice.

Key words: Healthy food; nutrition education; fruits, vegetables and fish consumption; cooking workshops.

INTRODUCCIÓN

El ámbito escolar es un espacio privilegiado para implementar actividades y programas integrales de promoción de salud. Las escuelas tienen el privilegio de poder aprovechar las oportunidades que permiten influir favorablemente en la vida de los docentes con los estudiantes, sus respectivas familias y comunidades. Dentro del perfil de una escuela promotora de la salud,

la familia juega un rol importante como agente protector de la salud, en el apoyo de la promoción de la salud y de los estilos de vida saludable (1) así como también, en la provisión de los conocimientos y motivación necesaria para la adopción y mantenimiento de comportamientos saludables (2).

El presente estudio se ubica en el marco de un proyecto para elaborar, aplicar y evaluar un programa

de intervención con materiales educativos en alimentación saludable para profesores, alumnos de prebásica, básica y sus familias. Se escogió la prebásica y básica porque en esas edades se forman los hábitos alimentarios de los niños a través de sus profesores y familias. Este enfoque integral con los niños, sus padres y profesores no se ha dado anteriormente y se basa en la experiencia aprendida en proyectos anteriores (3-4).

Durante el primer año del proyecto se realizaron encuestas de conocimientos y consumo alimentario en escolares, sus padres y profesores (5), en donde se evidenció que los niños tenían un excelente conocimiento de lo que era una alimentación saludable, con un adecuado consumo. En los padres y profesores, a pesar de tener conocimientos suficientes, su consumo era muy poco saludable. En una segunda etapa, se trabajó con grupos focales para padres y profesores en donde opinaron que un nuevo programa de intervención en alimentación saludable debe incorporar a los niños, los padres y la comunidad escolar en su conjunto. Sin embargo, se identificó como dificultad la baja colaboración de los padres y apoderados en estos temas. En una tercera etapa, se realizó una consulta a expertos mediante el método Delphi basada en los resultados de las encuestas y los grupos focales (6), cuyos principales consensos sobre educación en alimentación saludable dirigida a la familia fueron priorizar los materiales educativos audiovisuales por sobre los escritos y actividades participativas como talleres de cocina, juegos, actividades, por sobre las pasivas como información en reuniones de padres, entrega de material educativo y conferencias de expertos. En Chile han existido variadas y diferentes iniciativas para enfrentar el problema de la obesidad infantil, especialmente desde la educación en alimentación y nutrición a los niños en las escuelas (7). Para ello se han utilizado diferentes programas de educación, con materiales de distinto tipo, pero son muy pocos los que consideran una intervención en los grupos de preescolares y escolares junto con sus padres midiendo cambios de hábito y consumo alimentario. Para medir el cambio se escogió el consumo de frutas, verduras, pescado y prácticas de alimentación familiar para lo cual existen estudios previos validados (4, 8-9). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de una intervención educativa sobre el consumo de frutas, verduras y pescado en familias de niños preescolares y escolares de colegios municipales de una comuna de Santiago, Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño

Intervención en educación en alimentación y nutrición por un periodo de 3 meses, con una evaluación antes y después, en un grupo intervenido y uno control de niños preescolares y escolares y sus padres de colegios municipales de una comuna de la Región Metropolitana de Chile.

Sujetos y métodos

El muestreo realizado fue por conveniencia. Se seleccionaron tres colegios municipales de la comuna de Macul, con un Índice de Vulnerabilidad Escolar mayor a un 40%, información proporcionada por el Sistema Nacional de Asignación con Equidad del Ministerio de Educación (10), ubicados en sectores alejados entre sí para evitar de esta forma el traspaso de información entre los mismos.

Para calcular el tamaño de la muestra, se utilizaron los resultados obtenidos de las encuestas alimentarias realizadas en escolares de 18 colegios de la Región Metropolitana (9). Se tomaron los datos en gramos (g), de alimentos saludables recomendados por las guías alimentarias chilenas y que fueron de interés en el estudio: frutas, verduras y pescado. Se estimó un cambio de consumo de 80 g de frutas, 80 g de verduras y 15 g de pescado, con lo que dio un número de 57 familias por grupo, para una potencia del 80% y una significación de 5% ($\alpha=0,05$).

Se incluyeron a todas las familias de acuerdo a la clasificación de Reca (11) con niños entre 4 y 8 años de edad de prekindergarten, kínder, 1° y 2° básico de tres colegios municipales de la comuna de Macul. Se excluyeron las familias cuyos padres presentaron problemas de dicción o audición para responder a la entrevista y los analfabetos.

Se informó a los padres sobre el proyecto por medio de reuniones de apoderados y de comunicaciones en los cuadernos de tareas de los niños, obteniéndose la participación de 59 apoderados, 27 en los colegios intervenidos y 32 del control, resultando éste el tamaño de muestra final. Cada apoderado firmó el consentimiento informado, autorizado por el Comité de Ética del INTA.

Instrumentos de medición

Para determinar las prácticas de alimentación familiar, se utilizó un instrumento validado que consistió en una encuesta para ser aplicada al padre del niño.

Para su validación (12), se hizo una prueba piloto, se validó la información obtenida, se evaluó estabilidad temporal a través de test-retest, la concordancia inter-observadores y la consistencia interna.

Para estimar el consumo de frutas, verduras y pescado en gramos consumidos por día de cada niño y su padre, se utilizó una encuesta de frecuencia de consumo cuantificada adaptada para el estudio, utilizando como apoyo un libro con imágenes de porciones de alimentos (13) elaborado en Argentina y validado con niños chilenos (8).

Estas encuestas fueron aplicadas antes y después de la intervención educativa en alimentación y nutrición, tanto al grupo intervenido como al grupo control.

Intervención educativa en alimentación y nutrición

Se desarrolló durante tres meses y consistió en seis sesiones de talleres de alimentación saludable de 90 minutos cada uno, cada 15 días, con un tema por sesión: alimentación saludable; importancia de las comidas en familia; cómo incluir 5 porciones de frutas y verduras al día; consumo de pescado, y consejos para la compra de frutas, verduras y pescado. La sexta sesión se dedicó a compartir las experiencias vividas por los participantes. Los talleres se desarrollaron en las instalaciones del INTA y en uno de los colegios. Participaron los padres encargados de la preparación de las comidas de los niños de prekindergarten, kínder, primero y segundo básico de los colegios intervenidos. Fueron dirigidos por un coordinador (nutricionista), apoyado por un experto en cocina y tres facilitadores (dos nutricionistas y una educadora de párvulos) que ayudaron a conducir el desarrollo de las actividades y a regular la interacción entre los participantes. La metodología fue participativa, privilegiando el conocimiento y la experiencia de cada participante como fuente de aprendizaje individual y colectivo. Se utilizaron recursos pedagógicos participativos como talleres prácticos de cocina y uso de las Tecnologías de la Información y Comunicación (TIC) con fotografía participativa (14) y un video educativo (15), con los cuales se buscó lograr la participación a través del diálogo grupal y la reflexión crítica

Evaluación cualitativa de la intervención educativa

Se evaluó el proceso de intervención educativa como modelo pedagógico a través de métodos cualitativos. Para ello se utilizaron encuestas de opinión personal inicial, final y de monitoreo que fueron com-

pletadas por los participantes del taller. Se evaluaron expectativas de aprendizaje, satisfacción con respecto al contenido, metodología y organización del taller, cambios realizados en la alimentación del hogar, entre otros. Además, se midió adherencia a los talleres a través de una hoja de asistencia y se consideró que había cumplido con la intervención educativa al participante que asistió al 60% de los talleres.

Análisis estadístico

Los resultados de las encuestas se expresaron a través de tablas de frecuencias. Las variables cuantitativas fueron resumidas con medidas de posición (centralidad) y dispersión según su ajuste a la normalidad. Las variables cualitativas se expresaron como porcentajes.

Se evaluó la normalidad de las variables cuantitativas, las cuales no se distribuyeron en forma normal por el número de sujetos de la muestra que no fue suficiente para aplicar pruebas paramétricas, debiendo utilizarse pruebas no paramétricas.

Se compararon los resultados de las prácticas de alimentación familiar en ambos grupos, al inicio y al final de la intervención, mediante el *test exacto de Fisher* y el *test de Simetría*.

Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov y Wilcoxon para comparar el consumo de frutas, verduras y pescado (g promedio por día) de apoderados y de los niños, entre el grupo intervenido y el grupo control. Para la comparación pre-post intervención se utilizó el *test de Wilcoxon* para muestras pareadas.

Los análisis estadísticos fueron realizados con el software estadístico STATA 11.1 (Stata Corp, College Station, TX) (16).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del INTA.

RESULTADOS

La muestra inicial de apoderados estuvo constituida por 55 mujeres (93,2%) y 4 hombres (6,78%) con una edad promedio de 35,8±8,2 años. La muestra de niños resultó homogénea con 30 niños (50,8%) y 29 niñas (49,2%) con una edad promedio de 5,5±1,3 años. La distribución por cursos fue de 16 niños y sus familias de pre-kínder, 15 de kínder, 14 de primero básico y 14 de segundo básico. La mayor parte de los padres (71,2%) tenían educación media o técnica completa, y más de la mitad (55,9%) trabajaba. Las

familias eran en su mayoría nuclear biparental (50,9%), extensa monoparental (22%) o extensa biparental (10,2%) (Tabla 1).

Finalizaron con la intervención 22 padres y sus niños, registrándose una pérdida del 18,5% (5 padres) durante la misma. El grupo control se mantuvo con 32 padres. La asistencia de los apoderados participantes en los talleres fue buena (84,8%) y una vez iniciados, un 81,5% completó la experiencia educativa.

En la Tabla 2 y Tabla 3 se describen los resultados de las prácticas de alimentación de la familia. Cabe destacar que en promedio, el 90% de familias comen juntos cuando están en la casa; el 50% ven la TV durante las comidas, y en el 65% de los hogares existen recomendaciones de alimentación para los niños. Más del 80% de las familias realizan 3 comidas diarias (desayuno, almuerzo y merienda de la tarde). En el 75% de los casos, la madre es la encargada principal de la preparación de los alimentos y en el 48% hace las compras de la casa. La mitad de las familias nunca sale a comer fuera de la casa.

Al inicio y al final de la intervención, no hubo diferencias en las prácticas de alimentación de la familia entre el grupo intervenido y el control (*test exacto de Fisher*, $p > 0,05$). La variable existencia de recomendaciones de alimentación saludable en el hogar mostró diferencias significativas (inicial-final) en el grupo intervenido (*test de Simetría*, $p < 0,05$).

En la Tabla 4 se describe el consumo de frutas, verduras y pescado de los padres. Al inicio, no existieron diferencias significativas entre el grupo intervenido y el control. Al final de la intervención, el consumo de frutas, verduras y pescado mejoró significativamente en el grupo intervenido (*test de Kolmogorov-Smirnov*, *test de Wilcoxon*, $p < 0,05$). Al comparar el consumo pre-post por grupo, en el intervenido las diferencias resultaron significativas en todos los casos (*test de Wilcoxon* para muestras pareadas, $p < 0,05$). En el grupo control disminuyó el consumo de frutas y verduras ($p < 0,05$) y el consumo de pescado no mostró diferencia significativa.

En la Tabla 5 se observan los datos del consumo de frutas, verduras y pescado de los niños. Al igual que los apoderados, al inicio no existieron diferencias significativas entre el grupo intervenido y el control. Al final de la intervención, los niños del grupo intervenido mostraron un mayor consumo de frutas, verduras y pescado (*test de Kolmogorov-Smirnov*, *test de Wil-*

TABLA 1. Características generales de las familias: intervención educativa en alimentación saludable en familias de niños preescolares y escolares, Chile 2012.

Característica	n	%
Género del padre		
Femenino	55	93,22
Masculino	4	6,78
Género del niño		
Femenino	29	49,2
Masculino	30	50,8
Cursos de los niños		
Pre kínder	16	27,12
Kínder	15	25,42
1° básico	14	23,73
2° básico	14	23,73
Educación de la madre		
Básica	8	13,56
Media	28	47,46
Técnica completa	14	23,73
Técnica incompleta	1	1,69
Universitaria incompleta	2	3,39
Universitaria completa	6	10,17
Actividad de la madre		
Trabaja	33	55,93
Estudia	1	1,69
Está en la casa	25	42,37
Tipo de familia		
Nuclear biparental	30	50,85
Nuclear monoparental	4	6,78
Extensa biparental	6	10,17
Extensa monoparental	13	22,03
Reconstituidas	3	5,08
No vive con los padres	3	5,08
Total	59	100

coxon, $p < 0,05$). Al comparar el consumo pre-post, en el grupo intervenido las diferencias fueron significativas en todos los casos (*test de Wilcoxon* para muestras pareadas, $p < 0,05$). En el grupo control, hubo disminución en el consumo, pero las diferencias no fueron significativas.

El 100% ($n=22$) de las familias intervenidas incorporó algún cambio significativo en la alimentación de su hogar como un mayor consumo de frutas, verduras y pescado, realización de un desayuno saludable, ali-

TABLA 2. Prácticas de alimentación familiar: intervención educativa en alimentación saludable en familias de niños preescolares y escolares, Chile 2012.

Familias	Intervenidas		Controles	
	Inicial <i>n</i> =27 <i>n</i> (%)	Final <i>n</i> =22 <i>n</i> (%)	Inicial <i>n</i> =32 <i>n</i> (%)	Final <i>n</i> =32 <i>n</i> (%)
Comidas en familia				
Si	24 (88,89)	21 (95,45)	29 (90,63)	28 (87,5)
No	3 (11,11)	1 (4,55)	2 (6,25)	4 (12,5)
A veces	0	0	1 (3,13)	0
TV durante las comidas				
Si	15 (55,56)	6 (27,27)	13 (40,63)	16 (50)
No	5 (18,52)	9 (40,91)	9 (28,13)	10 (31,25)
A veces	7 (25,93)	7 (31,82)	10 (31,25)	6 (18,75)
Existencia de recomendaciones de alimentación saludable				
Si	18 (66,67)*	19 (86,36)*	22 (68,75)	20 (62,5)
No	9 (33,33)*	3 (13,64)*	10 (31,25)	12 (37,5)
Comidas que se realizan en el hogar				
Desayuno	25 (92,59)	21 (95,45)	30 (93,75)	30 (93,75)
Almuerzo	23 (85,19)	20 (90,91)	29 (90,63)	29 (90,63)
Merienda de media tarde	22 (81,48)	17 (77,27)	28 (87,50)	30 (93,75)
Cena	13 (48,15)	12 (54,55)	15 (48,88)	14 (43,75)
Colación nocturna	1 (3,70)	0	3 (9,38)	0
Frecuencia de comidas fuera de la casa				
1-2 veces por semana	0	2 (9,09)	3 (9,38)	4 (12,5)
3-4 veces por semana	0	0	0	0
1-2 veces al mes	13 (48,15)	9 (40,91)	12 (37,50)	13 (40,63)
3-4 veces al mes	4 (14,81)	2 (9,09)	1 (3,13)	1 (3,13)
Nunca	10 (37,04)	9 (40,91)	16 (50)	14 (43,75)

* $p < 0,05$, test de Simetría

mentación más ordenada, porciones adecuadas. En el 45,5% de los hogares no hubo dificultad alguna para implementar los cambios en la alimentación. Las dificultades expresadas por algunos apoderados para cambiar fueron problemas económicos, tiempo y gustos por la comida. En la encuesta de opinión personal inicial realizada a los participantes en los talleres, la mayoría manifestó su interés en poder “aprender a cocinar más sano para la familia”. Al finalizar la intervención, se evaluó la satisfacción de los participantes con los contenidos que se trabajaron durante los

talleres y el 100% de los participantes calificó con la nota máxima el ítem “los contenidos cubrieron sus expectativas”. Las expectativas de aprendizaje de los participantes fueron bastante altas en cuanto a “aprender a cocinar de manera más saludable”, a “cómo poder llevar una vida más saludable”, a “cómo hacer más interesante el comer sano, de forma entretenida”. Estas expectativas fueron ampliamente cumplidas de acuerdo a lo manifestado al finalizar la intervención. El 100% consideró como algo muy útil para su vida cotidiana aprender a consumir más frutas y verduras, incluir más vegetales a la hora de cocinar, combinar alimentos, colores y sabores, utilizar pocos ingredientes y realizar una comida entretenida.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio constituyen un modelo innovador para el futuro diseño de intervenciones educativas en alimentación y nutrición con enfoque familiar. En la última década,

se han puesto en marcha una serie de programas educativos en alimentación y nutrición utilizando las escuelas como espacio de promoción de salud (3, 4, 7, 8, 17). La mayoría de las acciones realizadas hasta hoy día se encuentran dirigidas al individuo, siendo minoría las relacionadas con el mejoramiento del entorno y la participación de los padres (7). La familia ocupa un rol crítico en la educación alimentaria que incluye los modelos parentales de ingesta, el valor cultural de la comida y la disponibilidad de alimentos en el hogar, además de formar parte importante del entorno social

del niño donde se aprenden y ponen en práctica los hábitos alimentarios. El patrón de conducta alimentaria familiar tiene un papel relevante en el comportamiento de alimentación del niño, constituyendo un factor modificable para la prevención de la obesidad infantil (18).

Con la presente investigación se desarrolló, implementó y evaluó un modelo pedagógico innovador de educación en alimentación y nutrición para la familia, el cual incluyó el uso de las TIC (fotografía participativa y video educativo) y talleres de cocina saludable, enfoque que anteriormente no se había dado, ya que las intervenciones en general utilizaban charlas y materiales educativos escritos como trípticos y folletos, con los cuales los padres trabajaban los temas de alimentación saludable en el hogar (19).

La posibilidad de proveer información relevante desde la escuela hacia las familias, y desde las familias a la escuela, aparece como una dimensión indispensable para un mayor involucramiento y compromiso de todos los actores del sistema (17).

Las iniciativas que intentan integrar a los padres y los niños como familia en la formación y fortalecimiento de una vida más saludable constituyen un desafío, ya que según el Informe de Capital Humano en Chile (20) se ha establecido que la mayor participación de los padres se da en aquellos cuyos hijos asisten a escuelas privadas, y en orden decreciente, padres con hijos en establecimientos particulares subvencionados y municipales. Sería interesante comparar la adherencia de los

TABLA 3. Compra y preparación de los alimentos en la familia: intervención educativa en alimentación saludable en familias de niños preescolares y escolares, Chile 2012.

Familias	Intervenidas		Controles	
	Inicial n=27 n (%)	Final n=22 n (%)	Inicial n=32 n (%)	Final n=32 n (%)
Persona que compra los alimentos habitualmente en la casa				
Mamá	13 (48,15)	7 (31,82)	15 (46,88)	14 (43,75)
Papá	1 (3,70)	1 (4,55)	2 (6,25)	2 (6,25)
Abuela (o)	2 (7,41)	3 (13,64)	6 (18,75)	6 (18,75)
Empleada casa particular	0	0	0	0
Otro	1 (3,70)	1 (4,55)	0	0
Ambos padres	7 (25,93)	8 (36,36)	7 (21,88)	8 (25)
Mamá y abuela	1 (3,70)	1 (4,55)	2 (6,25)	2 (6,25)
Papá y abuela	2 (7,41)	1 (4,55)	0	0
Compra de frutas				
Si	25 (92,59)	22 (100)	31 (96,88)	31 (96,88)
No	2 (7,41)	0	1 (3,13)	1 (3,13)
Compra de verduras				
Si	25 (92,59)	22 (100)	31 (96,88)	32 (100)
No	2 (7,41)	0	1 (3,13)	0
Compra de pescado				
Si	23 (85,19)	21 (95,45)	29 (90,63)	30 (93,75)
No	4 (14,81)	1 (4,55)	3 (9,38)	2 (6,25)
Persona que prepara la alimentación de los niños en la casa				
Mamá	20 (74,11)	16 (76,19)	24 (75)	24 (75)
Papá	0	0	1 (3,13)	0
Abuela (o)	3 (11,11)	2 (9,52)	5 (15,63)	6 (18,75)
Empleada casa particular	0	0	0	0
Otro	1 (3,70)	0	0	0
Mamá y abuela	3 (11,11)	3 (14,29)	2 (6,25)	2 (6,25)

apoderados de escuelas particulares subvencionadas y privadas para observar si el bajo grado de interés y compromiso por llevar una vida más saludable se da en todos los niveles socioeconómicos, o es una característica de los que asisten a escuelas municipales.

Uno de los mayores determinantes del consumo de frutas y verduras en los niños es el consumo de sus padres (21). A pesar de la corta duración de la inter-

TABLA 4. Consumo de frutas, verduras y pescado de los padres: intervención educativa en alimentación saludable en familias de niños preescolares y escolares, Chile 2012.

Padres	Intervenidos			Controles		
	Inicial <i>n</i> =27	Final <i>n</i> =22	Inicial <i>n</i> =32	Final <i>n</i> =32		
Alimentos	X (DE)	X (DE)	X (DE)	X (DE)		
	p25 p50 p75 [Min-Max]	p25 p50 p75 [Min-Max]	p25 p50 p75 [Min-Max]	p25 p50 p75 [Min-Max]		
Frutas (g/día)	103,1 (83,7) ** 57,1 85,7 150 [0-400]	238,9 (87,8) */ ** 150 250 300 [107,1-400]	116,7 (89,3) ** 42,8 107,1 164 [0-350]	94,8 (82,8) */ ** 36,4 67,85 146,4 [0-310]		
Verduras (g/día)	103 (53,6) ** 50 121,4 150 [21,4-200]	122,5 (38,6) */ ** 92,8 125 155 [57,1-210]	99,9 (47,5) ** 72,5 87,85 150 [7,1-200]	76,5 (38,7) */ ** 51,75 80 102,5 [7-165]		
Pescado (g/día)	14,2 (2,1) ** 7,1 9,44 22,3 [0-38,5]	24,4 (19,4) */ ** 15,7 19,45 30 [4,3-100]	15,1 (1,93) 7,1 10,65 25 [0-41,4]	11,2 (7,3) * 6,65 8,55 17,8 [0-25,7]		

p*<0,05, test Kolmogorov-Smirnov, test de Wilcoxon, *p*<0,05, test de Wilcoxon para muestras pareadas

TABLA 5. Consumo de frutas, verduras y pescado de los niños: intervención educativa en alimentación saludable en familias de niños preescolares y escolares, Chile 2012.

Niños	Intervenidos			Controles		
	Inicial <i>n</i> =27	Final <i>n</i> =22	Inicial <i>n</i> =32	Final <i>n</i> =32		
Alimentos	X (DE)	X (DE)	X (DE)	X (DE)		
	p25 p50 p75 [Min-Max]	p25 p50 p75 [Min-Max]	p25 p50 p75 [Min-Max]	p25 p50 p75 [Min-Max]		
Frutas (g/día)	138,8 (72,9) ** 100 107,1 150 [35,7-330]	230,9 (74,7) */ ** 178,5 250 250 [100-400]	112,4 (80,3) 51,4 100 164,25 [11,4-300]	96,3 (50,1) * 60,7 92,85 117,8 [21,4-250]		
Verduras (g/día)	55,87 (41,4) ** 23,5 50 75 [3,5-175]	121,8 (46,7) */ ** 80 112,5 175 [55-200]	49,62 (25,7) 27,15 48,2 73,2 [8,5-91,4]	43,9 (21,5) * 28,55 39,3 56,05 [7,85-100]		
Pescado (g/día)	9,1 (4,9) ** 7,1 7,14 14,3 [0-18,5]	14,3 (5,6) */ ** 11,4 14,3 17,1 [4,3-28,5]	10 (7,7) 7,1 7,1 14,3 [0-28,5]	8,7 (5,4) * 7,1 7,1 13,95 [0-22,8]		

p*<0,05, test Kolmogorov-Smirnov, test de Wilcoxon, *p*<0,05, test de Wilcoxon para muestras pareadas

intervención educativa, se obtuvo un cambio significativo a nivel familiar en el consumo de frutas, verduras y pescado, el cual fue mayor al promedio alcanzado en otras intervenciones educativas realizadas a nivel nacional e internacional, en donde el promedio de incremento fue de +0,3 a +0,99 porciones de frutas y

verduras al día (22). Esto podría deberse al enfoque participativo con uso de las TIC y al carácter práctico de la intervención. Sin embargo, el efecto a largo plazo debe ser evaluado en futuros estudios para conocer la permanencia del cambio de hábitos en el tiempo.

El consumo de frutas fue el que mostró un mayor cambio. Esto coincide con un estudio reciente realizado en escolares chilenos (4). Las frutas son más fáciles de consumir y tienen una mayor aceptación por la población en general, antes que las verduras y el pescado. En el grupo control, hubo una disminución en el consumo lo cual se puede explicar por el aumento de precios de los alimentos en los meses de invierno en los que se realizó la intervención.

Los resultados muestran que es posible realizar cambios en los hábitos de consumo alimentario de las familias de preescolares y escolares de nivel socioeconómico bajo con el diseño e implementación de un modelo pedagógico innovador que incluya actividades participativas y utilización de las TIC. Además, se destaca la excelente satisfacción de los participantes con los talleres de alimentación saludable realizados, lo cual sin duda alguna contribuyó a la hora de implementar los cambios en la alimentación de sus hogares. Sin embargo, no hubo un cambio significativo en las prácticas de alimentación familiar, por lo cual se sugiere profundizar con un tiempo de intervención más largo en temas como ver televisión durante las comidas, la importancia de comer en familia y la compra de alimentos saludables.

Se concluye que la familia cumple un rol fundamental en la formación de buenos hábitos alimentarios en los niños desde edades tempranas, por lo cual es importante incorporarla en los procesos educativos en alimentación y nutrición con actividades participativas e innovadoras.

Este estudio fue financiado por el proyecto FONDECYT #1110044 de Educación del Concurso Regular 2011: Elaboración, aplicación y evaluación de un programa de intervención con materiales educativos en alimentación saludable para profesores, alumnos de pre-básica, básica y sus familias. Investigador Principal: Fernando Vio del Río / Coinvestigadora: Judith Salinas Cubillos.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia de Cooperación Internacional de Chile (AGCI) por otorgar una beca a la alumna por el periodo 2011-2012 para la realización de este estudio como parte de la tesis del Magister en Nutrición de Alimentos del INTA.

REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud, SEREMI de Salud Magallanes y Antártica Chilena. Unidad de Promoción de la Salud. Guía Estrategia Establecimientos Promotores de Salud, Santiago, 2009.
2. Mikkila V, Rasanen L, Raitakari OT, Pietinen P, Viikari J. Longitudinal changes in diet from childhood into adulthood with respect to risk of cardiovascular diseases: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Eur J Clin Nutr.* 2004; 58:1038-45.
3. Kain J, Leyton B, Concha F, Salazar G, Lobos L, Vio F. Estrategia de prevención de obesidad en escolares: Efecto de un programa aplicado a sus profesores (2007-2008) *Rev Med Chil.* 2010; 138:181-7.
4. Vio F, Zacarías I, Lera L, Benavides C, Gutierrez A. Prevención de obesidad en escuelas básicas de Peñalolén: componente alimentación y nutrición. *Rev Chil Nutr.* 2011; 38(3):268-76.
5. Vio F, Salinas J, Lera L, González CG, Huenchupán C. Conocimientos y consumo alimentario en escolares, sus padres y profesores: un análisis comparativo. *Rev Chil Nutr.* 2012; 39(3): 34-9.
6. Vio F, Lera L, Fuentes-García A, Salinas J. Método Delphi para identificar materiales educativos sobre alimentación saludable para educadores, escolares y sus padres. *Arch. Latinoam Nutr.* 2012(3): 275-82.
7. Salinas J, Vio del Río F. Programas de salud y nutrición sin política de Estado: el caso de la Promoción de Salud Escolar en Chile. *Rev Chil Nutr.* 2011; 38(2):100-16.
8. Olivares S, Kain J, Lera L et al. Nutritional status, food consumption and physical activity among Chilean school children: a descriptive study. *Eur J Clin Nutr.* 2004; (58):1278-85.
9. Liberona Y, Castillo O, Engler V, Villarroel L, Rozowski J. Nutritional profile of schoolchildren from different socio-economic levels in Santiago, Chile. *Public Health Nutr.* 2010; 14(1):142-9.
10. Ministerio de Educación, JUNAEB. Prioridades 2008-2009 por RBD Básica, Media y comunal IVE-SINAE. Disponible en http://junaeb.cl/prontus_junaeb/site/artic/20100118/pags/20100118133326.html (Consultado el 14.12.12)
11. Reca IC. La familia chilena en los noventa. Documentos de trabajo, de planificación y estudios N° 27. Santiago: SERNAM; 1993.
12. Arribas, M. Diseño y validación de cuestionarios. *Matronas Profesión* 2004; 5:23-9.
13. Vásquez M, Witriw A. Modelos visuales de alimentos. Tablas de relación peso/volumen. 1ª ed. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 1997.

14. Wang C, Burris MA. Photovoice: concept, methodology and use for participatory needs assessment. *Health Education & Behaviour*. 1997; 24(3):369-87.
15. Banks M. Métodos visuales e investigación de campo. En: *Los datos visuales en investigación cualitativa*. Ediciones Morata: Madrid; 2010.
16. StataCorp 2009. *Stata Statistical Software: Release 11*. College Station, TX: StataCorp LP.
17. Waters E, de Silva-Sanigorski A, Hall BJ, Brown T et al. Interventions for preventing obesity in children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011, Issue 12. Art. No.: CD001871. DOI:10.1002/14651858.CD001871.pub3.
18. Campbell KJ, Crawford DA, Ball K. Family food environment and dietary behaviors likely to promote fatness in 5-6 year-old children. *International Journal of Obesity* 2006; 30: 1272-80.
19. Nyberg G, Sundblom E, Norman A, et al. A healthy school start - Parental support to promote healthy dietary habits and physical activity in children: Design and evaluation of a cluster-randomised intervention. *BMC Public Health*. 2011; 11:185.
20. Brunner J, Elacqua G. Entre la desigualdad y la efectividad. Informe del Capital Humano en Chile. Escuela de Gobierno. Universidad Adolfo Ibañez. 2003.
21. Jones L, Colin DS, Rogers I, Emmett P. Influences on child fruit and vegetable intake: sociodemographic, parental and child factors in a longitudinal cohort study. *Public Health Nutrition*. 2010; 13(7):1122-30.
22. Knai C, Pormerleau J, Lock K, et al. Getting children to eat more fruit and vegetables: A systematic review. *Preventive Medicine* 2006; 42: 85-95.

Recibido: 14-01-2013

Aceptado: 26-04-2013

**COMPLETE YOUR ARCHIVOS LATINOAMERICANOS
DE NUTRICION. ALAN. COLLECTION**



Dear subscriber:

We are offering the opportunity to complete your ALAN collection at *discounted* prices

Just inform us of your missing issues (Volume and Number) by writing to

EDITORIAL OFFICE

Apartado 62778

Chacao

Caracas 1060

Venezuela

Fax: (58-212) 286.0061

email: info@alanrevista.org

You will receive availability confirmation and a price quotation

Macronutrientes en la leche madura de madres adolescentes y adultas

*Thais Álvarez de Acosta, Isabel Cluet de Rodríguez, María Rossell Pineda,
Emiro Valbuena, Eva Ugueto, Laura Acosta.*

Servicio de Emergencia de Pediatría y Unidad Docente del Hospital Universitario de Maracaibo.
Facultad de Medicina y Facultad de Veterinaria de la Universidad del Zulia. Venezuela.

RESUMEN. Estudio no experimental, prospectivo y comparativo para evaluar los niveles de macronutrientes en la leche madura de madres adolescentes. Fueron analizadas 52 muestras de leche madura de madres sanas y eutróficas, divididas en 2 grupos: Grupo A n=24 constituido por la leche de madres adolescentes de 10 a 18 años y Grupo B n=28 conformado por leche de madres adultas de 19 a 35 años, quienes acompañaban a sus hijos 1 a 6 meses de edad hospitalizados desde agosto 2009 a agosto de 2010. Las muestras fueron analizadas para determinar las concentraciones de carbohidratos, lípidos y proteínas. Las características maternas de los grupo A y B respectivamente fueron; etnia mestiza el 59,4% y el 39,9%, promedio de índice de masa corporal: fue de $23,55 \pm 1,01$ kg/m² y $24,2 \pm 0,38$ kg/m². Fueron primigestas 87,5% en el A y 35,7% en el B. Edad de los niños entre 1 a 2 meses: grupo A 66,6% y grupo B 71,4%. Edad maternal: grupo A 75% tenían entre 16 y 18 años y en el B 28,5% tenían entre 19 y 21 años. En A la concentración de proteínas fue $1,8 \pm 0,7$ g/100ml y en B $1,9 \pm 0,7$ g/100ml. La concentración de grasas en las adolescentes fue $3,8 \pm 1,5$ g/100ml y en las adultas $3,9 \pm 1,3$ g/100ml. La concentración de los carbohidratos en las adolescentes fue $6,8 \pm 0,8$ g/100ml y en las adultas $6,6 \pm 0,9$ g/100ml, siendo $P > 0,05$ no estadísticamente significativo en los 3 casos. La concentración de macronutrientes en la leche madura de madres adolescentes y el valor energético de la misma fue similar al de las madres adultas.

Palabras clave: Leche madura, adolescentes, macronutrientes.

SUMMARY. Macronutrients in mature milk of teenagers and adult mothers. This is a comparative, prospective and non-experimental study that evaluated the level of macronutrients in teenage mothers' mature breastmilk. The sample was represented by mature milk of 52 healthy and eutrophic mothers, divided in two groups: A n=24 constituted by adolescent mothers's milk among 10 and 18 years and B n=28 formed by adult mothers's milk among 19 and 35 years who accompanied their children 1-6 months of age hospitalized, from august 2009 to august 2010. The samples were analyzed to determine concentrations of carbohydrates, lipids and proteins. The maternal characteristics of group A and B respectively were: mestizo ethnicity 59.4% and 39.9%, average BMI: were 23.55 ± 1.01 kg/m² and 24.2 ± 0.38 kg/m². Primiparous were 87.5% in A and 35.7% in B. Age of children aged 1-2 months was 66.6% (A) 71.4% (B). Maternal age: group A 75% had between 16 and 18 years and group B 28.5% were between 19 and 21 years. About macronutrient concentrations, median protein level in A was $1,8 \pm 0,7$ g/100ml and $1,9 \pm 0,7$ g/100ml for B median fat concentration in teenage group was $3,8 \pm 1,5$ g/100ml and in adults $3,9 \pm 1,3$ g/100ml. Median carbohydrates level in teenage was $6,8 \pm 0,8$ g/100ml and in B Group was $6,6 \pm 0,9$ g/100ml, being non statistically significant in all three cases. The macronutrient concentrations and energetic value in teenage mothers's mature breastmilk were similar than the adult mother's milk.

Key words: Mature milk, adolescent, macronutrients.

INTRODUCCIÓN

La lactancia materna exclusiva es el mejor alimento durante los primeros seis meses de vida de los niños, ya que proporciona, todos los nutrientes requeridos en su justa cantidad, proporción y composición, para garantizarles un adecuado creci-

miento y desarrollo. La leche humana ofrece también protección contra las enfermedades diarreicas e infecciones respiratorias agudas, mayor estabilidad psicológica al niño, evita estados alérgicos al tener elementos inmunológicos y facilita el desarrollo de los maxilares, la erupción y alineación de los dientes (1).

La leche madura, es producida a partir de los 15 días

de vida del recién nacido hasta los 6 meses después del nacimiento (2) es de buena calidad, contiene un 88% de agua y su osmolaridad es semejante al plasma, lo cual permite al niño mantener un perfecto equilibrio electrolítico. Igualmente contiene macronutrientes donde destacan los carbohidratos con concentración de 7 g/100ml, las grasas con 3,8 g/100ml y las proteínas con 0,9 g/100 ml.

En relación a los carbohidratos en la leche humana se han identificado más de 50 oligosacáridos de diferentes estructuras, sin embargo, la lactosa es el carbohidrato principal presente en la leche materna en una proporción del 98% y se sintetiza en la glándula mamaria a partir de glucosa y galactosa. Aporta, junto con la grasa, la energía necesaria para el normal crecimiento y desarrollo del bebé, favorece la implantación de una flora acidófila y promueve la absorción del calcio (2, 3).

Las grasas representan una importante fuente de energía para el bebé y aportan aproximadamente el 50% a 60% de las calorías totales que requiere el neonato. Están compuestas en un 98% por triglicéridos y son fuente de ácidos grasos esenciales, tales como el ácido oleico (32,8%) y el palmítico (22,6%), siendo éstos los más abundantes de éste grupo. El tercero en abundancia es el ácido linoléico (13,6%) (3). En los últimos años se ha destacado el rol de los ácidos araquidónico y docosahexaenóico en el desarrollo del cerebro y la retina del neonato (3).

En relación a las proteínas se conoce que tienen una concentración en la leche materna madura de 0,9 g/100, del cual el 0,7 % corresponde a proteínas con funciones nutritivas y el 0,2 % tienen funciones biológicas, inmunológicas o fisiológicas. En cuanto a la fracción nutritiva destaca la caseína, la cual se encuentra presente en un 40 % y se le reconoce por estimular el sistema inmunológico del lactante. La α -lactalbúmina tiene un alto valor nutritivo ya que forma parte de la enzima lactosa-sintetasa, interviniendo en la síntesis de lactosa. Dentro de la fracción de proteínas con funciones biológicas, inmunológicas o fisiológicas tenemos la lactoferrina, la cual en el tracto intestinal del bebé compite con algunas bacterias por el hierro, ejerciendo un efecto bacteriostático, en sinergismo con la IgA secretoria. También se le conoce propiedad bactericida (3,4).

Dentro del grupo de enzimas lácteas, destaca la lisozima, la cual presenta una acción bactericida en el

intestino del lactante. Otra enzima importante es la lipasa, la cual favorece la alta absorción de grasas en los bebés alimentados con lactancia materna. Entre los componentes del nitrógeno no proteico pueden destacarse la taurina y los nucleótidos. La taurina, además de intervenir en la conjugación de ácidos biliares, está presente en el sistema nervioso central (3).

El otro grupo de sustancias que compone la leche humana, esta dado por los micronutrientes, como lo son las vitaminas: K, D, B12, niacina, ácido fólico y ácido ascórbico; minerales como el calcio, hierro, fósforo, magnesio, zinc, potasio y flúor elementos traza como el cobre, cobalto y selenio. También contiene cromo, manganeso y aluminio (3,4).

Por estas y muchas otras bondades de la leche humana, cada día se fomenta más en las madres que este sea el único alimento para sus hijos hasta los seis meses de vida, lo cual ha impulsado a muchas organizaciones a desarrollar programas y estrategias de promoción de la lactancia materna, como la Organización Mundial de la Salud (5), además este organismo define la adolescencia como el "período de la vida en el cual el individuo adquiere la capacidad reproductiva, transita los patrones psicológicos de la niñez a la adultez, consolida la independencia socio – económica" y fija sus límites entre los 10 y 19 años. La adolescencia se caracteriza por el incremento de las necesidades nutricionales debido a la aceleración del crecimiento (estirón puberal) y al aumento de la masa corporal (6,7,8).

Estudios realizados por las Naciones Unidas (9) revelaron que entre los años 2000 y 2005 el 10% de los nacimientos ocurridos a nivel mundial provenían de madres entre 15 y 19 años. Latinoamérica y África presentaron los mayores porcentajes, 16,3% y 15,8% respectivamente. Venezuela estuvo incluida en este estudio, con una de las tasas más altas de nacimientos provenientes de madres adolescentes en Latinoamérica (20,5%), siendo superada por República Dominicana y Nicaragua con 20,7% y 24% respectivamente. En la adolescencia los requerimientos nutricionales y energéticos se ven aumentados, porque representa un segundo brote de crecimiento (5).

El embarazo en la adolescencia representa un esfuerzo fisiológico extra y la lactancia podría exacerbar aun más la demanda de nutrientes y energía evidenciados en la concentración de macro y micronutrientes en la leche de estas madres. Se ha descrito que la composición de macronutrientes de la leche humana es

prácticamente uniforme entre etnias y edades (6,8).

Debido a lo anteriormente expuesto y a la limitada bibliografía publicada al respecto en la presente investigación se determinó los niveles de carbohidratos, proteínas y lípidos en la leche madura de madres adolescentes y adultas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue de tipo no experimental, prospectivo, y comparativo. La muestra estuvo conformado por la leche madura de 52 madres, divididos en 2 grupos: Grupo A o Grupo Estudio $n=24$ constituido por la leche madura de madres adolescentes con edades comprendidas entre 10 y 18 años de edad y Grupo B o Grupo Control $n=28$ conformado por madres adultas de 19 a 35 años, quienes acompañaban a sus hijos con edades comprendidas entre 1 mes y 6 meses de edad, hospitalizados en el Servicio de Emergencia Pediátrica del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo, en el Estado Zulia, Venezuela en el período comprendido de agosto de 2009 a agosto de 2010.

En ambos grupos se realizó:

- Consentimiento informado de la madre.
- Se procedió a pesar y tallar a la madre, se le determinó su estado nutricional según el Índice de Masa Corporal (IMC) ($\text{Peso} / \text{talla}^2$ en Kg/m^2), tomando como valor de referencia de 18,5 a 24,9 kg/m^2 , correspondiente al normopeso. (10,11)
- Toma de muestra de leche materna madura. Se utilizó un procedimiento referido como extracción u ordeño manual (12). Se realizaron 3 extracciones en diferentes momentos del amamantamiento: la primera se realizó antes de colocar al niño al pecho, la segunda se llevó a cabo 10 a 15 minutos luego de iniciada la lactancia y la tercera muestra se tomó luego de finalizado el amamantamiento. Se tomó muestra a las 7 am, 3 pm y 7 pm del mismo día recogidas hasta obtener una muestra única de 10cc, la cual se colocó en envases de polipropileno estériles, se cerraron y se refrigeraron a 8°C , analizándose a las 48 horas, en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia.
- Se determinaron los carbohidratos por el Método

de Fehling (13), las grasas por el Método de Gerber (14) y las proteínas por el Método de Kjeldahl (15).

- Análisis estadístico: se utilizó la prueba t de Student para diferencias de medias, medidas de tendencia central y dispersión (media y error estándar), siendo significativo cuando $p < 0,05$ (16).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se observa que en el grupo A, hubo un total de 24 madres estudiadas, mientras que en el grupo B se estudiaron 28 madres. En el grupo A el 59,4% eran mestizas, el 20,8% eran de etnia blanca, el 18,8% eran indígenas de la etnia wayúu y el 1% era de etnia negra. En el grupo B el 49,4% de las madres eran de etnia mestiza, el 39,9% eran indígenas de la etnia wayúu y el 10,7% eran blancas. No hubo madres de la etnia negra en este grupo. Con respecto al índice de masa corporal, en el grupo A el promedio fue de $23,55 \pm 1,01 \text{ Kg}/\text{m}^2$ y en el grupo B fue de $24,2 \pm 0,38 \text{ Kg}/\text{m}^2$. En relación a la paridad, en el grupo A el 87,5 % de las madres eran primigestas y el 12,5% de ellas habían tenido su segunda gesta. Ninguna de las madres de este grupo tuvo 3 gestas o más. En el grupo B el 35,7% de las madres eran primigestas y otro 35,7% tenían 3 o más gestas, mientras que el 28,6% de las madres habían tenido la segunda gesta. Con respecto a la edad de los lactantes, en el grupo A el 66,6% de los lactantes tenían entre 1 y 2 meses, mientras que el 33,3% de los lactantes tenían de 3 a 4 meses. No hubo niños con 5 a 6 meses de edad en este grupo. En el grupo B el 71,4% de los lactantes tenían de 1 a 2 meses, el 21,4% tenían 3 a 4 meses de edad y el 7,2% tenían entre 5 y 6 meses de vida.

En la Tabla 2 se determina que el 75 % de las madres del grupo A tenían entre 16 y 18 años y el 25 % tenían entre 13 y 15 años. No hubo madres dentro del grupo etario de 10 a 12 años. La edad promedio en este grupo fue de $16,4 \pm 1,2$ años. En el grupo B se observó que el 28,5% de las madres tenían entre 19 y 21 años de edad; el 25% tenían entre 22 y 24 años; otro 25% tenían entre 25 y 27 años; el 14,5 % estaban dentro del rango de 28 a 30 años, mientras que el 3,5 % de este grupo tenían entre 31 a 33 años y entre 34 y 36 años respectivamente. El promedio de la edad en las madres adultas fue de $24 \pm 3,9$ años.

TABLA 1. Características de las madres adolescentes, adultas y de los niños

Características	Grupo A	Grupo B
	Madres adolescentes N=24	Madres adultas N=28
Etnias:	%	%
Mestiza	59,4	49,4
Blanca	20,8	10,7
Indígena (Etnia Wayuu)	18,8	39,9
Negra	1	0,0
Índice de masa corporal (Kg/m ²) (x ± DE)	23,55 ± 1,01	24,2 ± 0,38
Paridad	%	%
1ra	87,5	35,7
2da	12,5	28,6
≥ 3	0	35,7
Edad de los lactantes (meses)	%	%
1-2	66,6	71,4
3-4	33,4	21,4
5-6	0	7,2

Fuente: Formulario de registro.2010.

TABLA 2. Distribución de las madres productoras de leche madura según la edad

Edades (AÑOS)	Grupo A		Grupo B	
	madres adolescentes		madres adultas	
	N°	%	N°	%
10-12	0	0		
13-15	6	25		
16-18	18	75		
19-21			8	28,5
22-24			7	25
25-27			7	25
28-30			4	14,5
31-33			1	3,5
34-36			1	3,5
Total	24	100%	28	100%

Fuente: Formulario de registro.2010.

X ± Edad de madres adolescentes: 16,4 ± 1,2 años (media ± DE)

X ± Edad de madres adultas: 24,5 ± 3,9 años (media ± DE)

En la Tabla 3 se observa que el promedio de la concentración de proteínas en el Grupo A fue de 1,8 ± 0,7 g/100 ml mientras que en el grupo B fue de 1,9 ± 0,7 g/100 ml, sin significancia estadística P=0,84. En

cuanto a los niveles de grasas, en el Grupo A se identificaron niveles 3,8 ± 1,5 g/100 ml y en el Grupo B el valor fue de 3,9 ± 1,3 g/100 ml, estadísticamente no significativo p=0,87. La evaluación de los carbohidratos reportó que la concentración de este nutriente en el Grupo A fue de 6,8 ± 0,8 g/100 ml, mientras que en el grupo B fue de 6,6 ± 0,99 g/100 ml con valor de p=0,39 sin significancia estadística. En cuanto a las calorías, se observó que en la leche de madres adolescentes el aporte calórico fue de 68,6 ± 19,5 Kcal/100 ml y en la de madres adultas fue 69,1 ± 18,1 Kcal/100 ml. En cuanto al aporte calórico tampoco se pudo identificar diferencias estadísticamente significativas p=0,86 en cuanto al valor energético entre ambos leches.

TABLA 3. Distribución según la concentración de proteínas, grasas y carbohidratos (g/100 ml) y valor calórico (Kcal/100 ml)

Nutrientes y Valor Calórico	Grupo A	Grupo B	p
	Leche de Madres Adolescentes	Leche de Madres Adultas	
Proteínas	1,8 ± 0,7	1,9 ± 0,7	0,84*
Grasas	3,8 ± 1,5	3,9 ± 1,3	0,87*
Carbohidratos	6,8 ± 0,8	6,6 ± 0,9	0,39*
Calorías	68,6 ± 19	69,1 ± 18,1	0,86*

Fuente: Formulario de registro 2010. Media ± DS. *p>0,05 (Estadísticamente no significativo)

DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluaron las características de las madres estudiadas, observándose que el 58,3 % de las adolescentes eran mestizas, mientras que el 20,8 % eran de etnia blanca, el 16,8 %, indígenas de la etnia wayúu y solo el 1% fue de la etnia negra, contrario a lo reportado por Hamilton y col (17), quienes describieron mayor frecuencia de madres adolescentes de etnia negra. En la población indígena de Venezuela la tasa de nacimientos en madres adolescentes asciende a 151 nacimientos por cada mil mujeres de 15 a 19 años, frente a los 89 por cada mil, estimados a nivel nacional en las adolescentes no indígenas entre 1995 y el 2000 (18). El promedio de índice de masa corporal fue de 23,55 ± 0,01 Kg/m², lo cual según la clasificación del estado nutricional de acuerdo con el índice de masa corporal dictada por la OMS (10), se corresponde con normopeso. Con respecto a la paridad, el 87,5 % de las madres adolescentes eran primigestas

y los 12,5 % restantes tenían 2 gestas. Según la OPS (8), los adolescentes, constituyen un grupo particularmente en desventaja en relación al acceso y uso de recursos de salud sexual y reproductiva, lo cual explica que la tasa específica de fertilidad en adolescentes permanezca aún muy alta, en la Región de las Américas. Según encuestas demográficas y de salud, realizadas por esta organización en los últimos años en algunos países de América Latina y El Caribe, el porcentaje de mujeres de 15 a 19 años que ya eran madres o estaban embarazadas por primera vez, al momento de ser encuestadas fluctuó entre 12,2 % en Perú y 25 %, en Nicaragua (9). En relación a la edad de los hijos, de las madres de la presente investigación en el grupo A el 66,6 % de los lactantes tenían entre 1 a 2 meses, mientras que el 33,3 % tenían entre 3 y 4 meses. En la literatura consultada no se encontró información sobre la edad de los hijos, mas sí sobre peso al nacer, malformaciones y riesgo de prematuridad.

En el presente estudio se determinó que el 75 % de las adolescentes participantes tenían entre 16 y 18 años, mientras que el 25 % tenían entre 13 y 15 años de edad. Esto se corresponde con la demografía en los países en desarrollo, donde uno de cada seis alumbramientos corresponde a jóvenes de 15 a 19 años de edad (18).

Luego de una revisión exhaustiva en la literatura mundial sobre la composición de macronutrientes de la leche madura de madres adolescentes, se encontraron muy pocas referencias bibliográficas sobre el tema. La más resaltante fue la investigación realizada por Motil y col en 1997 (19), en la cual evaluaron la leche madura de 22 madres, de las cuales 11 eran adolescentes y las otras 11 adultas, los resultados obtenidos demostraron que las madres adolescentes estudiadas produjeron entre 37 % y 54 % menos leche que las madres adultas, sin embargo no hubo diferencias importantes en cuanto a la composición de macronutrientes entre ambos grupos, al igual que en la presente investigación.

En el presente estudio, al evaluar los niveles de proteínas en la leche madura de las madres adolescentes se obtuvo un promedio de $1,8 \pm 0,7$ g/100ml mientras que en el grupo control el promedio fue de $1,9 \pm 0,7$ g/100ml, resultando, $P=0,84$ no estadísticamente significativo. Tampoco hubo variabilidad importante en los niveles de proteínas medidos en el estudio de Lipsman y col (20) cuando comparó leche madura de 20 madres adolescentes con leche madura de 20 ma-

dres adultas. Cocotzin (6) explica que las proteínas y los compuestos nitrogenados son estables en la leche madura sin distinción de etnias, edades y estado nutricional; a diferencia de la investigación realizada por Álvarez y col (21), en la que si hubo diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas al comparar leche madura de madres desnutridas con la de madres eutróficas. También difiere del estudio realizado por Villalobos y col (22), en el cual se observó diferencias estadísticamente significativas en la concentración de proteínas en el calostro de madres guajiras con respecto al grupo de madres no guajiras estudiadas, más no en la leche de transición ni en la leche madura. Sin embargo en este mismo estudio se reportó que las concentraciones de proteínas a los 3 meses fue mayor en mujeres guajiras (2,01 g/100 ml) en comparación con 1,80 g/100 ml en mujeres no guajiras y también fue mayor que las concentraciones reportadas en el grupo de estudio de la presente investigación ($1,8 \pm 0,7$ g/100ml) y que en el trabajo de Carías y col (23), quienes evidenciaron concentraciones de proteínas de (1,17 g/100 ml) para mujeres venezolanas en Caracas.

Según Macías y col (3), la ingesta de proteínas en la madre no modifica los niveles de proteína total en la leche madura, sin embargo, puede provocar modificaciones en la proporción relativa entre las proteínas del suero lácteo y la caseína. El aumento de las proteínas en la dieta materna puede producir aumento del nitrógeno no proteico y de los aminoácidos libres, cuya importancia clínica no se ha determinado (6).

En cuanto a los niveles de grasas obtenidos en el presente estudio, en el Grupo A se determinó una concentración de $3,8 \pm 1,5$ g/100ml y en el Grupo B el valor fue de $3,9 \pm 1,3$ g/100ml, con $p=0,87$ sin diferencias estadísticamente significativas. Esta información se corresponde con lo obtenido por Motil y col (19), en su estudio, y por Lipsman y col (20) quienes en una investigación similar, tampoco obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo en el grupo de adolescentes de nuestra investigación hubo alta variabilidad de los niveles de grasa, probablemente debido a la variación del tiempo entre cada toma de muestra.

Otras investigaciones han reportado variación en cuanto a la concentración de las grasas en madres desnutridas, tal y como lo describió Álvarez y col (21), en un estudio sobre la relación entre el estado nutricional

materno y la composición de macronutrientes de la leche materna madura, en el cual se determinó que hubo disminución estadísticamente significativa de la concentración de grasas en el grupo de madres con desnutrición. Los hallazgos del presente trabajo, en el que se determinó, que no existían diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de grasas en la leche madura de las madres adolescentes y adultas, podrían ser explicados por el hecho de que todas las madres estudiadas adolescentes y adultas fueron eutróficas.

Los lípidos de la leche humana se obtienen de tres fuentes principales: de la dieta, de la movilización de reservas corporales acumuladas durante el embarazo y la síntesis de novo por la glándula mamaria. Algunas investigaciones demostraron que los hábitos alimentarios de diferentes grupos poblacionales afectan la composición de ácidos grasos, al observar que el perfil de ácidos grasos se modifica con la dieta materna, de modo tal que la composición de la grasa ingerida se refleja en la grasa láctea. (3, 6, 22).

Las grasas de la leche materna varían ampliamente en cantidad y calidad. Su concentración aumenta con la edad de la lactancia, es mayor al final que al inicio de la mamada, puede ser diferente entre una y otra glándula y varía de una madre a otra y puede verse afectada por enfermedades maternas que afecten el transporte de lípidos, como la abetalipoproteinemia. Esta variabilidad fue demostrada por Carias y col (23), al reportar que la grasa fue baja en el calostro (2,45 g/100 ml) y aumentó en un 77 % para el 1ro, 3ro y 6to. mes de lactancia en la leche de 45 mujeres venezolanas estudiadas, así como por Patin y col (24), en Brasil quienes observaron aumento de los ácidos grasos poliinsaturados en la leche de madres que tenían alta ingesta de sardinas, rica en omega-3 ácidos grasos poliinsaturados.

La evaluación de los carbohidratos en el presente estudio reportó en el Grupo A $6,8 \pm 0,8$ g/100ml, mientras que en el grupo B el estudio arrojó $6,6 \pm 0,9$ g/100ml, siendo la comparación entre estos grupos no estadísticamente significativo, con $P=0,39$. Estos hallazgos son similares a los obtenidos por Motil y col (19). El principal carbohidrato de la leche materna es la lactosa. Ésta se sintetiza en la mama a partir de la galactosa y glucosa, procedentes de la madre. Mantiene en la leche una concentración constante (7 g/100ml) independientemente de la nutrición materna. Muchos autores, como por ejemplo Emmett y col (25),

refieren que la concentración de la lactosa asciende a medida que se incrementa la edad de la lactancia.

Según Macías y col (3), la lactosa es el parámetro de mayor estabilidad ante la variación de la dieta materna, incluso ante situaciones de desnutrición o suplementación. De forma contraria, en el estudio realizado por Álvarez y col (21), la concentración de carbohidratos fue mayor en la leche de madres desnutridas que en la de madres eutróficas, con significancia estadística. Por otra parte, en la investigación realizada por Lipsman y col (20), la concentración de lactosa fue significativamente más baja en el grupo de adolescentes (6,76 g/100ml) que en la leche de madres adultas y también más baja que el valor de referencia reportado (7,0 - 7,1 g/100ml). Las adolescentes tempranas tuvieron valores marginalmente más bajos de lactosa que las adolescentes mayores, probablemente debido a la inmadurez en el desarrollo de las glándulas mamarias que pudieran presentar.

En nuestro estudio se observó que el aporte calórico en la leche de madres adolescentes, este fue de $68,6 \pm 19,5$ Kcal y en la de madres adultas fue $69,1 \pm 18,1$ Kcal, sin observarse diferencias estadísticamente significativas $p=0,86$, al igual que en la investigación realizada por Motil y col (19), lo cual se explica al no encontrarse diferencias importantes en los macronutrientes estudiados en la leche de madres adolescentes y madres adultas en ambas investigaciones. Nuestros resultados son diferentes a los obtenidos por Álvarez y col (21), quienes reportaron un menor aporte calórico, explicado por la menor concentración de grasas y proteínas en la leche de madres desnutridas. Los resultados del presente estudio indican que las concentraciones de proteínas, grasas y carbohidratos, así como el valor energético de la leche madura de las madres adolescentes son similares al de la leche madura de madres adultas.

REFERENCIAS

1. León-Cava N, Lutter Ch, Ross J, Martin L. Traducción y revisión Rybak N y Vallone F. Cuantificación de los beneficios de la Lactancia Materna. Reseña de la evidencia. Fundación Lac-Mat. Buenos Aires, Argentina. 2002. Citado 18 de Septiembre 2010 Disponible en: http://www.paho.org/spanish/AD/FCH/BOB_contents.pdf [Links].
2. Canepa Mariela A. Estudio de Caso. Un modelo de Cooperación Horizontal: La Red Iberoamericana de

- Bancos de Leche Humana (BLH). 2011. Citado 31-05-2013. Disponible: http://new.paho.org/sscoop/wpcontent/plugins/form/files/15145109Uon_horizontal_BLH.pdf
3. Macías SM, Rodríguez S, Ronayne de Ferrer PA. Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. *Arch Argent Pediatr.* (2006); 104(5): 423-430.
 4. Lawrence RA, Lawrence RM. Chapter IV: Biochemistry of Human Milk. In *Breastfeeding a guide for the medical profession* Elsevier Mosby. España SA. Seventh Edition. 2011. pag 98-152.
 5. Lactancia materna en madres adolescentes. *Monografias.com* (2004). Citado : 04 de febrero de 2009, Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos15/madres-adolescentes/madres-adolescentes.shtml>
 6. Cocotzin LR. Embarazo y lactancia durante la adolescencia. *Rev Hosp Gral Dr. Manuel Gea González.* 2002; 5 (3-4): 55-58.
 7. Cabrera Apitz T. Nutrición en adolescencia. *Arch Venez Pediatr.* 2002; 65. (Supl 3): S-46 S-52.
 8. *Monografias.com* (2005). Embarazo adolescente. Disponible en: www.monografias.com/trabajos32/embarazo-adolescente. Descargado: 03 de febrero de 2009.
 9. Organización Panamericana de la Salud. (2006). El embarazo adolescente. En http://www.clap.opsoms.org/web_2005/estadisticas%20de%20la%20region/textos/e35%206-Descargado: 21-03-09.
 10. Organización Mundial de la Salud. OMS. Clasificación internacional de la OMS del estado nutricional (infrapeso, sobrepeso y obesidad) de acuerdo con el IMC Venezuela. 30-10-2008. Citado el 15 de febrero 2012. Disponible en: <http://www.colegioaltamira.cl/tabla-de-imc-segun-la-oms>
 11. Rodríguez O L, Pizarro Q T. Situación nutricional del niño y del adolescente en Chile. *Rev Chil Pediatr.* 2006; 77(1):70-80.
 12. Ochoa Parra G. Manual para la Extracción, Conservación, Transporte y Suministro de la leche materna. Para mujeres gestantes y madres en periodo de lactancia, agente de salud y comunitario. Ministerio de la Protección Social de la República de Colombia; 2010: 29 – 42. Disponible http://www.google.co.ve/webhp?sourceid=toolbarinstant&hl=en&ion=1&qscr=1&TJ, Sharon K=1T4T5NP_enVE484VE485#hl=en&sugexp=les%3B&gs_rn=4&gs_ri=psy-ab&cp=34&gs_id=3s&xhr=t&q=leche+humana+oms+extraccion+manual&es_nrs=true&pf=p&qscr=1&rlz=1T4T5NP_enVE484VE485&sc=psy
 13. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (1982). Leche fluida. Determinación de Azúcares. Método de Fehling, N° 3219-22.
 14. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (1982). Leche fluida. Determinación de grasa. Método de Gerber, N° 1053-82.
 15. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). (1997). Leche Fluida. Determinación de Proteínas, N° 370:1052-1054.
 16. Estadística Inferencial. Distribución t student. junio 2009. Citado 24 de febrero 2012. Disponible en: <http://pinkkat23.blogspot.com/2009/06/distribucion-t-student.html>
 17. Hamilton BE, Martin JA, Ventura SJ. Births: Preliminary data for 2010. *National Vital Statistics Reports.* 2011; 60(2): S-2.
 18. Beltran Molina L. Fundación Escuela de Gerencia Social. Ministerio del Poder Popular para la Planificación y Desarrollo de Venezuela (2006). Embarazo en Adolescentes. <http://prosalud.org.ve/public/documents/20100804101280942170.pdf>. Descargado: 15 de marzo de 2011.
 19. Motil KJ, Kert B, Thotathucher M. Lactational performance of adolescent mothers shows preliminary differences from that of adult women. *J Adolesc Health.* 1997; 2(6): 442-449.
 20. Lipsman S, Dewey Kathryn G, Lönnerdal BO. Breastfeeding among teenage mothers: Milk composition, infant growth, and maternal dietary intake. *J Pediatr Gastr and Nutr.* 1985; 4: 426-434.
 21. Álvarez de Acosta T, Rossell-Pineda M, Cluet de Rodríguez I, Valbuena E, Fuenmayor E. Macronutrientes en leche de madres desnutridas. *Arch Latinoamer Nutr.* 2009 ; 59 (2): 159-165.
 22. Villalobos de Rivero E, Parra de Soto H, Vera de Soto D. Comparación en la composición de macronutrientes en la leche de madres guajiras y no guajiras. *Arch Venez Puer Ped.* 2001;64(1): 24-36
 23. Carias Diamela, Velásquez de Correa Gladys, Piñero Domingo, Cioccia Anna, Inciarte Haydee, Hevia Patricia. Variaciones temporales en la composición y aporte de macronutrientes y minerales en leche maternas de mujeres venezolanas. *Arch Latinoamer Nutr.* 1997; 47(2):110-7.
 24. Patin R; Vítolo M, Valverde M; Carvalho P; Pastore G; Lopez FA. The influence of sardine consumption on the omega-3 fatty acid content of mature human milk. *J Pediatr.* 2006; 82(1):63-79.
 25. Emmett P, Rogers I. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early Human Development.* 1997; 49:S27-28

Recibido: 13-04-2013

Aceptado: 17-06-2013

Análisis de la calidad microbiológica y potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) y maracuyá (*Passiflora edulis*) costarricenses

Juliana von Breymann, Carolina Chaves, María Laura Arias

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

RESUMEN. El objetivo del presente trabajo fue el determinar algunos de los indicadores de vida útil, higiene y condiciones del proceso y almacenamiento, la asociación entre la pulpa de la fruta y microorganismos patógenos de pulpas de guanábana, mango y maracuyá provenientes de las principales cadenas de supermercados de la gran área metropolitana (GAM) de San José, Costa Rica, así como examinar la potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en ellas. Se analizó un total de 60 muestras, a las cuales se les determinó su pH así como su recuento total aerobio, recuento de mohos y levaduras, bacterias lácticas, número más probable de coliformes totales y fecales y la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25 g del producto. Los rangos de pH encontrados en las pulpas variaron entre 3,1 y 3,9 y los recuentos obtenidos fueron relativamente bajos a excepción de los provenientes de una industria. Ninguna de las muestras analizadas presentó coliformes totales ni fecales. Se confirmó la presencia de *Listeria monocytogenes* en tres muestras, todas provenientes de la industria C. Los bajos recuentos obtenidos pueden deberse a la adición de sustancias preservantes pero también porque son productos pasteurizados; la falta de estos dos elementos puede significar la presencia de bacterias tan peligrosas como *Listeria monocytogenes*.

Palabras clave: Pulpa de frutas, deterioro, *Listeria monocytogenes*

SUMMARY. Analysis of the microbiological quality and potential presence of *Listeria monocytogenes* in custard apple (*Annona muricata*), mango (*Mangifera indica*) and passion fruit (*Passiflora edulis*) pulps from Costa Rica. The objective of this work was to determine some of the indicators associated to shelf life, hygiene, process and storage conditions for some of custard apple, mango and passion fruit pulps distributed by the main supermarket chains of the Metropolitan Area of San José, Costa Rica, as well as to examine the potential presence of *Listeria monocytogenes* in them. Sixty fruit pulp samples were analyzed. Tests included pH determination, total aerobic plate count, yeasts and mold count, lactic bacteria count, total and fecal most probable number and the presence/absence of *Listeria monocytogenes* in 25 g of the product. Fruit pulp's pH ranged between 3,1 and 3,9, and the microbiological counts obtained were relatively low except for one industry. None of the samples analyzed presented total or fecal coliforms. The presence of *Listeria monocytogenes* was confirmed in three samples, all of them coming from industry C. Low microbiological counts obtained may be due to the addition of preserving substances and to the pasteurization of some of the products; lack of these two elements may allow the presence of dangerous bacteria such as *Listeria monocytogenes*.

Key words: Fruit pulps, spoilage, *Listeria monocytogenes*

INTRODUCCIÓN

Las pulpas de frutas se definen como productos que se obtienen por la desintegración de la parte comestible de las frutas, y que usualmente se conservan por medio de pasteurización (1) con el fin de remover 100% de los patógenos y un 90% de los microorganismos de deterioro asociados (2).

Los factores intrínsecos que definen las poblaciones de deterioro de estos productos incluyen su contenido nutricional, rico en carbohidratos, su actividad de agua (aw) y su bajo pH (2). El deterioro de estos productos es originado, principalmente, por mohos, levaduras y bacterias lácticas, incluyendo *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Acetobacter*, los cuales logran resistir el bajo aw de estos productos, su pH y alto

contenido de azúcares (3).

Por otro lado, la asociación entre pulpas de fruta y microorganismos patógenos ha sido ampliamente respaldada, no obstante, existen pocos estudios relacionados con el crecimiento y sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en frutas ácidas (4,5) y este tipo de producto. (6).

Esta bacteria ha representado un reto para las industrias productoras de alimentos, debido a su capacidad de sobrevivir y multiplicarse en temperaturas de refrigeración (7). Al mismo tiempo, se ha descrito que es probable que también sobreviva a algunos procesos térmicos y sanitarios utilizados en producción de alimentos si se encuentra en altas concentraciones (8).

La principal fuente de infección por esta bacteria es el consumo de alimentos contaminados durante su fabricación o producción (9). Las pulpas de fruta pueden representar un riesgo potencial para adquirir dicha bacteria, principalmente porque ésta ha demostrado una gran tolerancia hacia los ambientes de carácter ácido (10).

Las pulpas de fruta representan una actividad de creciente importancia en la economía de Costa Rica, donde en los últimos cinco años se ha notado un elevado aumento en la exportación de este tipo de productos hacia diversos mercados incluyendo Estados Unidos y Europa. Este aumento señala que existe a nivel internacional una demanda creciente para estos alimentos (11).

De la misma manera, a nivel de mercado interno también existe una importante demanda de estos productos por parte de hoteles, restaurantes y supermercados (11) y de hogares de ancianos, centros médicos y centros educativos, entre otros (1).

Dada la creciente importancia y demanda de las pulpas de frutas, es importante determinar si las principales empresas productoras costarricenses están cumpliendo con el control de calidad necesario que garantice la excelencia, higiene e inocuidad de estos productos. El objetivo del presente trabajo fue el determinar algunos de los indicadores de vida útil, higiene y condiciones de proceso y almacenamiento de algunas de las pulpas de fruta provenientes de las principales cadenas de supermercados de la gran área metropolitana (GAM) de San José, Costa Rica, así como examinar la potencial presencia de *Listeria monocytogenes* en ellas, como indicador de riesgo para la Salud Pública.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Origen de las muestras: se analizaron un total de 60 muestras de pulpas de frutas, incluyendo 20 de mango, 20 de guanábana y 20 de maracuyá, de distintos lotes cada una y provenientes de 4 compañías productoras (A,B, C y D) Las muestras se obtuvieron de los principales supermercados de la Gran Área Metropolitana. Estos productos se comercializan, independientemente, refrigerados o a temperatura ambiente. El análisis de las mismas se realizó en el Laboratorio de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología, localizado en la Universidad de Costa Rica. Las muestras fueron transportadas en frío al laboratorio, para evitar el crecimiento de los microorganismos y la contaminación de las mismas. El análisis de éstas se realizó dentro de las 24 horas posteriores a su compra.

Determinación del pH. Los valores de pH se determinaron con el uso del medidor de pH marca Sartorius modelo Pb-11. La medición se realizó directamente del recipiente en que venía el producto.

Análisis microbiológico. Para los análisis microbiológicos, se procedió a pesar 25 gramos de cada pulpa, los cuales se mezclaron por medio del Stomacher con 225 mL de agua peptonada estéril (APE) al 0.1%,. Posteriormente, se procedió a realizar diluciones decimales hasta 10^{-5} utilizando tubos de 9 mL de APE. Para todos los análisis se usó la metodología recomendada por Pouch (12).

Recuento total aerobio mesófilo. A partir de las diluciones realizadas se tomaron 0.1mL y se inocularon en placas de agar estándar + TTC. Se incubaron a 35°C durante 48 horas y se contaron las placas que obtuvieran entre 25-250 unidades formadoras de colonias (UFC).

NMP de coliformes totales y fecales. Se tomó 1 mL de cada dilución y se inoculó en series de 3 tubos con caldo lactosado simple (CLS). Se incubaron a 35°C durante 48 horas. Posteriormente, los tubos que presentaron gas en la campana de Durham, fueron repicados a caldo bilis verde brillante (CBVB) y caldo EC. Se incubaron durante 48 horas a 35°C y 24 horas a 44.5°C para analizar los coliformes totales y fecales respectivamente. Se tomaron como positivos todos los tubos que presentaron gas en la campana de Durham.

Para interpretar los resultados se utilizaron las tablas para NMP de serie de tres tubos.

Recuento de bacterias lácticas. Se tomaron 0.1mL de cada dilución y se inocularon en placas con

agar MRS. Se incubaron en jarra con candela a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente se contaron las placas que obtuvieron entre 25-250 UFC.

Recuento de mohos y levaduras. Se tomaron 0.1 mL de cada dilución y se inocularon por separado en placas con agar papa dextrosa acidificado. Se incubaron durante 5 días a temperatura ambiente. Posteriormente, se contaron las placas que obtuvieron entre 3-30 UFC.

Determinación de la presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en las pulpas de frutas (13). Se utilizó la metodología recomendada por FDA de los Estados Unidos para el aislamiento de la bacteria en los alimentos. Se pesaron 25 gramos de la pulpa y se mezclaron con 225 mL de caldo listeria sin antibióticos. Se incubó a 35°C durante 4 horas. Posteriormente se agregaron los antibióticos (cicloheximida, acriflavina y ácido nalidíxico) y se incubó a 35°C durante 48 horas. Después se rayó en agar Oxford y se incubó a 35°C por 48 horas. La confirmación de las colonias típicas se realizó por medio de una tinción de Gram; la luz de Henry; prueba de oxidasa; prueba de catalasa; prueba de Camp; movilidad a 25°C y utilización de xilosa y ramnosa. Como control positivo se utilizó la cepa ATCC 19116.

RESULTADOS

Los rangos de pH encontrados en las pulpas fueron entre 3,1-3,9 para las pulpas de guanábana; entre 3,5-3,9 para las pulpas de mango y entre 3,1-3,3 para las pulpas de maracuyá.

Los recuentos obtenidos a partir de las diferentes muestras se presentan en la Tabla 1. Es importante destacar que ninguna de las muestras analizadas presentó coliformes totales ni fecales.

De las 60 muestras analizadas 3 dieron un resultado

positivo en forma confirmatoria para *Listeria monocytogenes*; todas estas muestras provenían de la misma industria productora (C).

DISCUSIÓN

La contaminación microbiana de vegetales y frutas está determinada, en gran parte, por la variedad de contaminantes con los que tienen contacto durante la cosecha, el corte y el transporte (8,14). Su procesamiento también aporta nuevas fuentes de contaminación que incluyen operaciones mecánicas como cortar, rebanar y el uso de agua para su lavado. El agua es un excelente medio para distribuir microorganismos en las plantas procesadoras y el hecho de utilizar cloro para lavar las frutas o vegetales no garantiza que queden libres de microorganismos, ya que estos se adhieren fuertemente y pueden formar biofilms (14).

En las pulpas de frutas, el pH ácido y la cantidad de azúcares presentes hacen que se seleccione el crecimiento de mohos, levaduras y bacterias ácido lácticas (3).

Los recuentos de indicadores realizados a las pulpas fueron bajos en las marcas A, B y D en gran parte debido a la adición de sustancias preservantes, tal y como lo menciona su etiquetado, pero también porque son productos pasteurizados, con lo que se retrasa el crecimiento de bacterias y mohos. Cabe destacar que el encontrar inicialmente números bajos de bacterias, no significa que éste no puede aumentar hasta cantidades críticas durante el almacenamiento del producto (15), tal y como lo describen Silveira y colaboradores en un estudio realizado en jugos de frutas pasteurizados y mantenidos en refrigeración (16).

Tradicionalmente el proceso térmico utilizado en las industrias alimentarias tiene como propósito brindar seguridad a los alimentos en el sentido de que elimina microorganismos patógenos (16).

TABLA 1. Recuento total aerobio mesófilo, recuento de bacterias lácticas y de mohos y levaduras obtenido a partir de las pulpas de fruta analizadas.

Tipo de pulpa	Recuento Total Aerobio Mesófilo			Recuento de Bacterias Lácticas			Recuento de Mohos y Levaduras		
	<10 UFC/g n (%)	10-10 ⁴ UFC/g n(%)	>10 ⁴ UFC/g n (%)	<10 UFC/g n (%)	10-10 ⁴ UFC/g n (%)	>10 ⁴ UFC/g n (%)	<10 UFC/g n (%)	10-10 ⁴ UFC/g n (%)	>10 ⁴ UFC/g n (%)
Guanábana	14(70)	3 (15)	3 (15)	14(70)	1 (5)	5 (25)	16 (80)	2 (10)	2 (10)
Mango	15 (75)	3 (15)	2 (10)	17(85)	1 (5)	2 (10)	12 (60)	7 (35)	1 (5)
Maracuyá	14(70)	5 (25)	1 (5)	18(90)	2 (10)	---	8 (40)	7 (35)	5 (25)

La inocuidad de los alimentos muchas veces se aumenta mediante la adición de antimicrobianos que previenen o retrasan el deterioro de los alimentos por causa de microorganismos (17). Tal es el caso de las marcas A, B y D que incluyen el benzoato de sodio como preservante. La marca B también hace uso del ácido cítrico y el sorbato de potasio. Por su parte, la marca C no incluye ningún tipo de preservante. El benzoato de sodio es ampliamente utilizado como preservante de bebidas frutales ya que presenta ventajas como actuar frente a un amplio rango de microorganismos y no ser volátil. Es efectivo contra distintas bacterias y levaduras (18). El ácido cítrico es considerado como un antimicrobiano seguro de usar en la industria alimentaria y está aprobado por la FDA aparte de que tiene actividad antimicrobiana contra un gran número de patógenos (19) y el sorbato de potasio funciona por su forma disociada y puede ser utilizado con eficacia en alimentos con pH ácidos (18). El aislamiento de coliformes totales y fecales en las muestras de pulpa de frutas evaluadas fue negativo. A pesar de lo anterior, se tiene que considerar que la ausencia de dichas bacterias en las muestras analizadas no garantiza la ausencia de patógenos entéricos en el alimento. Esta ausencia se puede explicar por el hecho de que al ser los coliformes bacterias Gram negativas no logran sobrevivir al pH ácido de las pulpas analizadas. (2).

Las bacterias ácido lácticas, junto con los mohos y levaduras, son predominantes en la descomposición de frutas y sus subproductos (3,20) y el hecho de encontrar recuentos altos de estos en productos pasteurizados, implica contaminación post-proceso así como el desarrollo de características organolépticas no deseables durante su almacenaje (16). De las 60 muestras analizadas, solamente una tuvo recuentos de bacterias lácticas superiores a 10^7 y dos muestras presentaron recuentos de mohos y levaduras superiores a este valor. De nuevo, este bajo porcentaje de positividad puede aducirse al uso de antimicrobianos y a la pasteurización de la mayoría de productos.

Listeria monocytogenes fue aislada a partir de tres muestras de pulpa, todas de la marca C.

El control de esta bacteria a nivel de industria alimentaria es bastante complejo debido a que está ampliamente distribuida en la naturaleza, por lo que es muy difícil evitar la contaminación cruzada en los múltiples pasos que se dan desde la cosecha hasta el consumo del producto (8). Además, es sumamente di-

fícil mantener las plantas procesadoras libres de este patógeno debido a su capacidad de formar biofilms y adherirse fuertemente a lugares de difícil acceso a la limpieza (21,22).

Distintas investigaciones demuestran la habilidad de este patógeno para sobrevivir y desarrollarse en pulpas de frutas (23). *Listeria monocytogenes* logra tolerar bien una baja actividad de agua (24), el contenido de carbohidratos de las pulpas de frutas es un adecuado sustrato para su crecimiento (4), aparte de que esta bacteria es considerada como una bacteria ácido tolerante. Esta bacteria logra resistir a pH bajos debido a que la presencia de descarboxilasas de glutamato, que le permiten mantener un pH intracelular adecuado a pesar de que externamente haya un pH bajo (10). Por otro lado, esta respuesta de tolerancia al pH ácido llevada a cabo por *Listeria monocytogenes* le confiere una mayor resistencia a las altas temperaturas, tal y como ha sido demostrado en diversas investigaciones (25).

La temperatura de refrigeración es una estrategia ampliamente utilizada por la industria alimentaria para controlar el crecimiento bacteriano en alimentos listos para el consumo. No obstante, diversos estudios han demostrado la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en temperaturas de refrigeración (4,5). Por este motivo, las temperaturas de refrigeración son consideradas como una fuente selectiva y efectiva de enriquecimiento para la bacteria porque se elimina en gran parte la competencia bacteriana (26).

El hecho de que *Listeria monocytogenes* tenga la capacidad de desarrollarse en condiciones que son inapropiadas para otros patógenos, y que logre crecer bien en temperaturas de refrigeración, la hacen una bacteria importante para la salud pública (22).

Lo anterior ha llevado a que la FDA, así como la Unión Europea, hayan establecido una cero tolerancia a *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo (5), aspecto a considerar en la exportación de pulpas costarricenses a los mercados descritos.

En los últimos años se ha visto, a nivel mundial, un gran aumento en la tendencia a preferir productos naturales, libres de preservantes químicos y procesamiento térmico. (19). Sin embargo, tal y como se demuestra en esta investigación, la falta de estos dos elementos puede significar la presencia de bacterias tan peligrosas como *Listeria monocytogenes* y la disminución en la vida útil del producto. Esta situación plantea la necesidad de que productos que no reciben

ningún tipo de tratamiento para eliminar patógenos y microorganismos de deterioro sean más estrictamente vigilados y controlados, con el fin de ofrecer un producto de buena calidad e inocuo al consumidor.

REFERENCIAS

- Ivett, D & Mesh T. Estudio de factibilidad para el establecimiento de una planta procesadora de pulpa de frutas tropicales en Costa Rica. Tesis de grado. Universidad EARTH, Guácimo: Costa Rica, 2004.
- Ray B & Bhunia A. Fundamental food microbiology. Florida: CRC Press. 2008.
- García Y, Osío I & Escalante M. Calidad microbiológica de pulpa de lechosa de las variedades Cartagena, Colombia y Maradol. Rev Fac Agron. 2004. 21 (1): 336-342.
- Penteado A & Leitao M. Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. Int J Food Microb, 2004. 92: 89-94.
- Leverentz B, Conway W, Janisiewicz W, Abadias M, Kurtzman C & Camp M. Biocontrol of the Food Borne Pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar *Poona* on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. App Environm Microb. 2006. 72: 1135-1140.
- Flessa S, Lusk D & Harris L. Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. Int J Food Microb. 2005. 101: 255-262.
- Abarzúa F & Solari V. *Listeria monocytogenes*: a propósito de un brote en particular. Rev Chil Obstet Ginecol. 2009. 74 (1): 1-3
- Vitas A Aguado V & García I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). Int J Food Microb. 2004. 90: 349-356.
- Rossi M, Paiva A, Tornese M, Chianelli S & Tronosco A. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: una revisión de las vías que llevan a su aparición. Rev Chil Infect. 2008. 25: 328-335.
- Cotter P. & Hill C. Surviving the acid test: responses of Gram positive bacteria to low pH. Microb Molec Biol Rev. 2003. 67: 429-453.
- Escobedo A. Sondeo rápido de mercados: pulpas de frutas. CATIE. Turrialba 2010.
- Pouch F & Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association. 2001.
- Hitchins A. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. FDA Bacteriological Analytical Manual. 2011.
- Doyle M & Erickson M. Closing the door on the fecal coliform assay. Microbe. 2006. 1: 162-163
- Crépet A, Albert I, Dervin C & Carlin F. Estimation of microbial contamination of food from prevalence and concentration data: application to *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. Appl Environm Microb. 2007. 73: 250-258.
- Silveira, A. Aguayo, E & Artés, F. (2012). Shelf-life and quality attributes infresh-cut Galia melón combined with fruit juices. Food Sci Technol.
- López A, Barreto J, Palou E & San Martín F. *Aspergillus flavus* growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. Food Control. 2007. 18: 1358-1362.
- Walker M & Phillips C. The effect of preservatives on *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Propionibacterium cyclohexanicum* in fruit juice. Food Control. 2008. 19, 974-981.
- Mosqueda J, Raybaudi R & Martín O. Microbiological shelf life and sensory evaluation of fruit juices treated by high-intensity pulsed electric fields and antimicrobials. Food and Bioproducts Processing. 2012. 90: 205-214.
- Nyanga L, Nout M, Gadaga T, Theelen B, Boekhout T & Zwietering M. Yeasts and lactic acid bacteria microbiota from masau (*Ziziphus mauritiana*) fruits and their fermented fruit pulp in Zimbabwe. Int J Food Microbiol. 2007. 120: 159-166.
- Aureli P, Carlo G, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L & Salmaso S. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. New Engl J Med. 2000. 342: 1236-1241.
- Comisión Codex Alimentarius: CAG/GL 61 2007. Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos Anexo I. 2009.
- Uchima C, De Castro M, Gallo C, Rezende A, Benato E & Penteado A. Incidence and growth of *Listeria monocytogenes* in persimmon (*Diospyros kaki*) fruit. Int J Food Microbiol. 2008. 126: 235-239.
- Rossi M, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, & Tronosco A. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: una revisión de las vías que llevan a su aparición. Rev Chil Infect. 2008. 25: 328-335.
- Caggia C, Ombretta G, Restuccia C & Randazzo C. Growth of acid adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. Food Control. 2009. 20: 59-66.
- Bayles D & Wilkinson B. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. The Society of Applied Microbiology. 2000. 30: 23-27.

Recibido: 02-01-2012

Aceptado: 28-02-2013

Viability of probiotic *Lactobacillus casei* in yoghurt: defining the best processing step to its addition

Nataly Simões Bandiera, Isadora Carneiro, Alisson Santana da Silva, Edson Renato Honjoia, Elsa Helena Walter de Santana, Lina Casale Aragon-Alegro, Cíntia Hoch Batista de Souza

Universidade Norte do Paraná, UNOPAR, Londrina, PR, Brasil.

SUMMARY. Probiotics are live microorganisms capable of producing beneficial effects on its host when consumed in adequate amounts. To exert these effects, foods must contain probiotic microorganisms in populations above 10^6 CFU / g or mL throughout its shelf life. One of the strategies to ensure high population of probiotics in fermented milk is to add them during or after the fermentation process separately from the starter cultures. The objective of this study was to investigate the behavior of the probiotic microorganism *Lactobacillus casei* added to yoghurt in different stages of production. Yoghurts with *L. casei* were produced at different stages: before addition of starter (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), added together with this culture and at the end of fermentation. Yoghurt without probiotic added was produced as a control. The products were stored at 4 °C and analyzed after 1, 7, 14 and 21 days of storage. In these periods, the populations of probiotic and starter cultures were enumerated and the parameters pH and acidity were analyzed. The results were evaluated using analysis of variance and Tukey's test, both at 5% significance level. *L. casei* remained viable in populations of more than 10^8 CFU / g during 21 days of storage, which is suitable to define the formulations as probiotics. When the different stages of the addition of probiotics in yoghurts were evaluated there was no statistical difference between the formulations ($p < 0.05$) for populations of *L. casei* except for the first day of storage.

Key words: Yoghurt, *Lactobacillus casei*, fermentation, viability.

RESUMO. Viabilidade de *Lactobacillus casei* probiótico em iogurte natural: definição da melhor etapa de processamento para sua adição. Probióticos são microrganismos capazes de produzir efeitos benéficos sobre seu hospedeiro, quando consumidos vivos e em quantidades adequadas. Para que exerçam esses efeitos, os alimentos probióticos devem conter tais microrganismos em populações acima de 10^6 UFC/g ou mL, durante toda sua validade. Uma das estratégias para garantir a alta população dos probióticos em leites fermentados é adicioná-los durante ou após o processo de fermentação separadamente das culturas starter. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o comportamento do microrganismo probiótico *Lactobacillus casei* adicionado em iogurte natural, em diferentes etapas do processo de produção. Foram produzidos iogurtes com adição de *L. casei* em diferentes etapas: antes da suplementação com o starter (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), juntamente com essa cultura e após o término da fermentação. Além disso, um iogurte controle (sem probiótico) foi produzido. Os produtos foram estocados a 4°C e analisados após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento. Nesses períodos, foram enumeradas as populações das culturas probiótica e starter e avaliados os parâmetros físico-químicos (pH e acidez). Os resultados obtidos foram avaliados através de análise de variância e teste de Tukey, ambos ao nível de 5% de significância. *L. casei* manteve-se viável e em populações superiores a 10^8 UFC/g durante os 21 dias de armazenamento, suficientes para que as formulações fossem definidas como probióticas. Quando as diferentes etapas de adição do probiótico aos iogurtes foram avaliadas, com exceção do 1º dia, não houve diferença estatística entre as formulações ($p < 0,05$) para as populações de *L. casei*.

Palavras chave: Iogurte, *Lactobacillus casei*, fermentação, viabilidade.

INTRODUCTION

Probiotics are live microorganisms which when consumed in adequate amounts confer beneficial health effects on the host (1). However, to exercise these function probiotic foods must contain viable probiotic cultures in populations

above 10^6 CFU / g during the shelf life of the product (2).

According to Fuller (3), there are three possible mechanisms of action of probiotics. The first refers to the elimination of pathogenic microorganisms through the formation of compounds with antimicrobial activity. The second mechanism refers to changes in the microbial metabolism by increasing or decreasing the enzymatic func-

tions. The third mechanism is based on stimulation of host immunity by increasing the levels of antibodies.

In addition to controlling the intestinal tract, there are other benefits of probiotic cultures to the health of the host, such as stabilizing the intestinal microbiota after the use of antibiotics; promoting gastrointestinal resistance against colonization of pathogens; decreasing the population of pathogens through the production of acetic and lactic acids, bacteriocins and other antimicrobial compounds; increasing the lactose digestion in lactose-intolerant individuals; stimulating the immune system; relieving constipation and increasing absorption of minerals and vitamins (4). Other beneficial effects are also attributed to probiotic cultures: reduced risk of colon cancer, cardiovascular disease prevention, reduction of plasma cholesterol, antihypertensive effect, reducing the activity of ulcerative *Helicobacter pylori*, control of ulcerative colitis caused by rotavirus and *Clostridium difficile*, preventing urogenital infections, as well as inhibitory effects on the mutagenicity (5). A number of genera of bacteria are used as probiotics, including *L. casei*, which has proven benefits to human (2). For the production of fermented milk the conventional yoghurt bacteria *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. salivarius* subsp. *thermophilus* also known as starter culture are added to promote the fermentation process (6, 7). The starter bacteria have a symbiotic relationship during its multiplication in the milk. The beginning of fermentation (acidity < 20 °D) favors the development of *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, which is stimulated by certain amino acids (especially valine) produced by *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, causing an increase in acidity. In this phase, occurs the release of formic acid by *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, which stimulates the growth of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Temperatures near 46 °C is unfavorable for the growth of *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, favoring the rapid development of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* trains with production of acetaldehyde, which is the main responsible for the characteristic aroma of yoghurt (8, 9).

Due to the metabolism of the strains of *S. salivarius* subsp. *thermophilus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* during yoghurt manufacture, the viability of probiotic strains added to these products may be impaired. The combination of probiotic strains with yoghurt cultures results in decreased viability of the probiotic during the shelf life of the product (10). The lactic acid

production by *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* during storage of yoghurt, which is so-called post-acidification, is one of the factors known to affect the viability of probiotic microorganisms in these products (7).

Thus, due to the production of inhibitory substances by yoghurt cultures (*starter*) during the fermentation, it is important to search for each probiotics the best moment to its addition during processing of yoghurt. It is known that the addition of probiotic microorganism concomitantly with the *starter* culture or after fermentation may interfere its viability (10), which demonstrates the importance of correct timing of addition of each strain.

The objective of this study was to investigate the behavior of the probiotic microorganism *Lactobacillus casei* added at different stages of the production of yoghurt, enabling the selection of the best stage of its addition in order to obtain a product with adequate population of this culture.

MATERIALS AND METHODS

Materials

For the production of yoghurt, UHT milk (Lider, Lobato, Brazil), skimmed milk powder (Molico, Nestle, Araçatuba, Brazil), *starter* culture *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (YO-MIX™ 496 LYO 100 DCU, Danisco, Dangé, France) and probiotic *Lactobacillus casei* (431®, Christian Hansen, Valinhos, Brazil) were used.

Preparation of probiotic and *starter* cultures

The inoculums of probiotic and *starter* cultures were prepared separately, one day before the production of yoghurt. To do so, the skimmed milk was reconstituted in water at 80 °C and cooled to 42°C. Subsequently, 2% of the lyophilized cultures were added to the reconstituted skimmed milk. The mixture was incubated at 42 °C until pH 4.8 was reached. All the inoculums were stored at 4 °C for 12-14 h until the production of yoghurt.

Production of yoghurt

Four yoghurt formulations were prepared: L1) without probiotic supplementation; L2) supplementation with the probiotic microorganism 1h before the addition of the starter culture; L3) supplementation with the probiotic microorganism added together with the *starter* culture; and L4) supplementation with the pro-

biotic microorganism after the fermentation of milk by starter culture, as soon as pH 4.8 was reached.

The UHT milk was heated to 40 °C and added of 4% skimmed milk powder to increase the dry matter and consequently improve the consistency of the yoghurt. The mixture was heat treated at 90 °C for 3.5 min to both destroy microorganisms which could compete with the cultures tested and promote the denaturation of whey proteins, which reduces the contraction of the coagulum and consequently reduces syneresis. After cooling to 42 °C, the cultures (probiotic and / or *starter*) were added to the different formulations, according to described above. The mixture was incubated at 42 °C until reaching pH 4.8. For this purpose, the pH was checked during the fermentation process every 30 min for two hours and every 15 min until pH 4.8. After this step, the product was manually homogenized, cooled and kept at 4 °C. All formulations were produced in triplicate.

Storage and sampling periods

The yoghurts were stored for 21 days at 4 °C until the time of analysis. Microbiological (probiotics and *starter* counts) and physicochemical parameters (pH and acidity) of the samples were performed in triplicate after 1, 7, 14 and 21 days of storage.

Microbiological analysis

To carry out the microbiological analyzes, 10 g sample was homogenized into sterile bags with 90 mL of sterilized saline solution (0.95% w/v) to obtain the initial dilution (10^{-1}). From this dilution, a number of decimal dilutions were prepared using the same diluent. For enumeration of *Lactobacillus casei*, the dilutions were plated in depth in MRS agar (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with 1.5 g / L of bile salts. The plates were incubated for 72 h at 37 °C under aerobic conditions. For enumeration of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, dilutions were plated in depth in MRS agar (Oxoid) containing 10% lactose (Oxoid) and the plates were incubated for 48 h at 37 °C under aerobic conditions. For the enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, the decimal dilutions were seeded in depth in MRS agar (Oxoid) acidified to pH 5.4 with glacial acetic acid. In samples containing *L. casei*, the population of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* was obtained by subtracting the population of *L. casei* from the total number of *Lactobacillus* counted in acidified MRS agar. All microbiological analyzes were performed according to Lima *et al.* (11) and the

results were expressed as colony forming units per gram of product (log CFU / g).

Physicochemical analysis

The pH of the samples was determined by direct measurement using digital potentiometer TEC-2 (Tecnal, Piracicaba, Brazil). The titratable acidity was determined by titrating the sample with 0.1 N NaOH solution (Merck, Darmstadt, Germany) in the presence of phenolphthalein indicator (12).

Statistical analysis

The results were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, both at 5% significance level, using the Statistica software (13).

RESULTS

During the fermentation time, pH values of all products decreased significantly ($p < 0.05$). Initially, the yoghurts L1 and L4 showed higher pH values ($p < 0.05$) than the other formulations. The formulation L2, in which the probiotic microorganism was added before the *starter* culture, presented the lowest initial pH ($p < 0.05$) and L3 showed an intermediate pH value ($p < 0.05$). From 90 min of fermentation, there was no statistical difference ($p > 0.05$) between the formulations.

Figure 1 shows the pH values of yoghurt during the fermentation time (255 minutes). From the 1st and the 21th day of refrigerated storage, the pH decreased for all the formulations ($p < 0.05$). This reduction was greater in L2 and L3, in which *L. casei* was added before and concomitantly with the addition of starter culture, respectively. The pH of yoghurt L1 was higher than L2 and L3 ($p < 0.05$), since this sample was not added of *L. casei*. In contrast, L4 presented pH values similar to those observed in L1 ($p > 0.05$), even containing *L. casei* in the formulation.

Figure 2 shows the pH and titratable acidity of yoghurt L1, L2, L3 and L4 stored at 4 °C for 21 days. There was no statistically significant difference between all the formulations after the 1st and 7th days of storage ($p > 0.05$). However, at 14 and 21 days of storage, statistically significant difference was observed when formulations L1 and L4 were compared to L2 and L3 ($p < 0.05$).

Figure 3 presents the microbiological results obtained for starter culture. For populations of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, the formulation L1 showed lower counts than the other formulations ($p < 0.05$), ranging

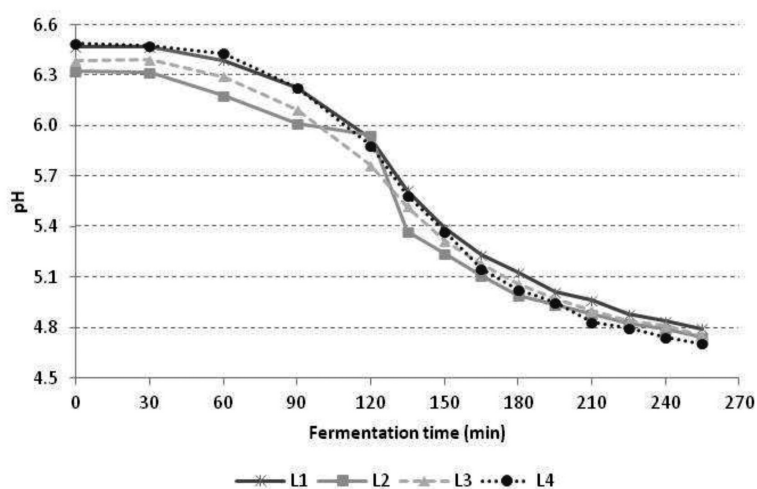


FIGURE 1. pH values of yoghurt L1 (without addition of *L. casei*), L2 (*L. casei* before addition of the *starter* culture), L3 (*L. casei* added together with the *starter* culture) and L4 (addition of *L. casei* after fermentation) during the fermentation time.

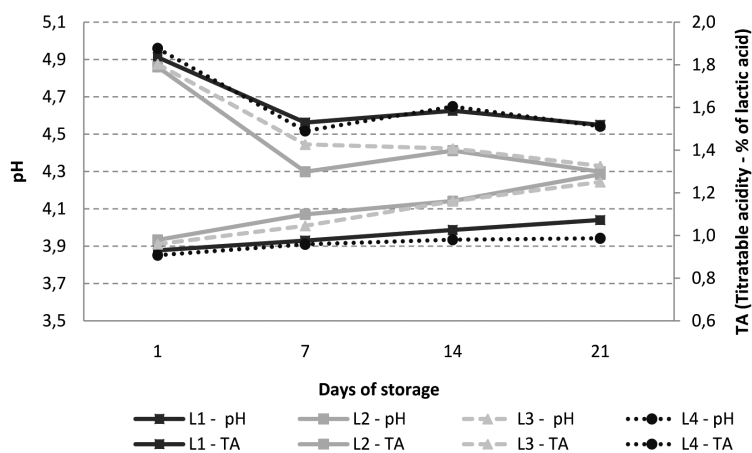


FIGURE 2. pH and titratable acidity values of yoghurt L1 (without addition of *L. casei*), L2 (*L. casei* before addition of the *starter* culture), L3 (*L. casei* added together with the *starter* culture) and L4 (addition of *L. casei* after fermentation) during 21 days of refrigerated storage (4 °C).

between 6.2 ± 0.5 and 5.6 ± 0.3 log CFU / g at the 1st and 21th day of storage, respectively. In contrast, the populations of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* found in formulations containing *L. casei* were significantly higher ($p < 0.05$), reaching counts of 9.3 ± 0.2 , 8.8 ± 0.1 and 8.1 ± 0.4 log CFU / g at 21th day for L2, L3 and L4, respectively (Figure 3a). Despite minor variations, there was no statistically significant difference in the populations of *S. thermophilus* for all the yoghurts studied ($p > 0.05$) (Figure 3b).

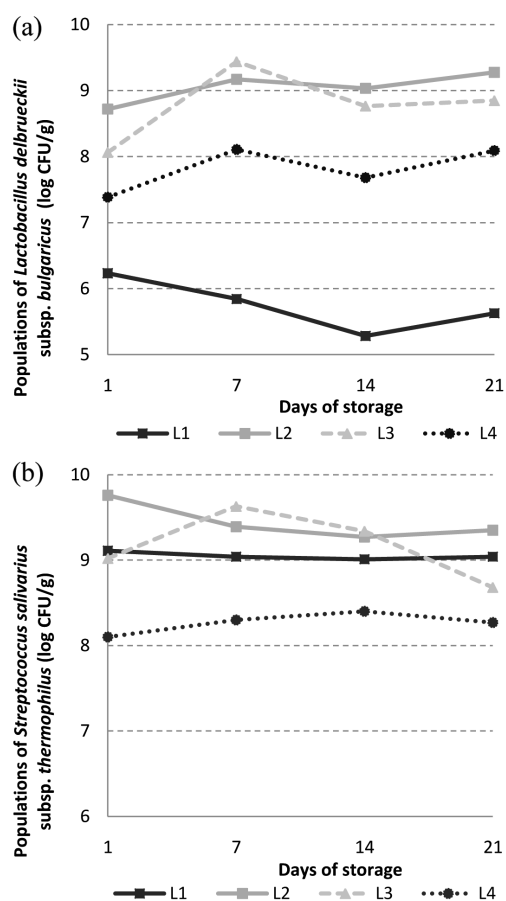


FIGURE 3. (a) Population of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and (b) *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* in yoghurt L1 (without addition of *L. casei*), L2 (*L. casei* before addition of the *starter* culture), L3 (*L. casei* added together with the *starter* culture) and L4 (addition of *L. casei* after fermentation) during 21 days of refrigerated storage (4 °C).

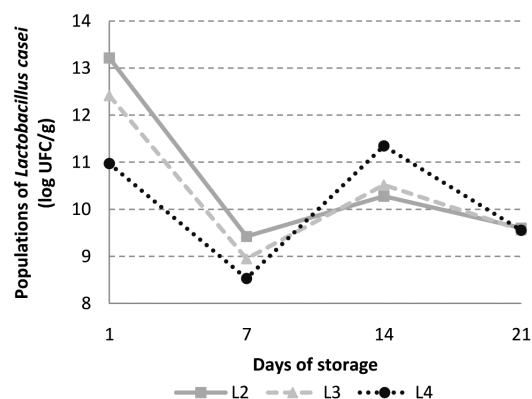


FIGURE 4. Population of *Lactobacillus casei* in yoghurt L2 (*L. casei* before addition of the *starter* culture), L3 (*L. casei* added together with the *starter* culture) and L4 (addition of *L. casei* after fermentation) during 21 days of refrigerated storage (4 °C).

The probiotic populations observed in L2, L3 and L4 are presented in Figure 4. A higher population of *L. casei* was observed in formulation L2, when compared to the formulation L3 ($p < 0.05$) at 1st and 7st days. When L2 and L3 were compared on days 14 and 21, no statistical difference was observed ($p > 0.05$). The formulation L4 presented the lowest populations of *L. casei*, differing from the others during 7 days of refrigerated storage ($p < 0.05$). At the end of refrigerated storage (day 21), no statistically significant difference was observed among L2, L3 and L4 ($p > 0.05$). Regarding the time of addition of the probiotic microorganism it was found that, except for the first day, there was no statistical difference in the populations of *L. casei* for all formulations during the whole storage period ($p > 0.05$).

DISCUSSION

The addition of *L. casei* at the end of the fermentation process in L4 resulted in pH values similar to L1 ($p > 0.05$) since the yoghurt was cooled promptly after addition of the culture. Thus, the low temperature contributed for decreasing the metabolism of *L. casei* in L4, which resulted in pH values higher than those observed for other probiotic formulations.

The reduction in pH and increase in titratable acidity values observed during the whole storage period is a natural process caused by the continuous production of lactic acid and other organic acids by *starter* culture added to yoghurt. Also, the presence of probiotic microorganism contributed to low pH values in L2 and L3, since *L. casei* are capable to produce lactic acid from hexoses (14, 15).

Thamer and Penna (16) produced 12 functional dairy beverages formulations containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* and a prebiotic ingredient. After completion of fermentation and cooling, the pH ranged between 4.72 and 4.83. The authors highlighted that by starting the cooling at pH 4.8, it prevented excessive lowering of pH, which when less than 4.0 may decrease the protein hydration and the clotting property, resulting in separation of the whey. Kempka *et al.* (17) developed a fermented milk drink peach flavor with the addition of a culture consisting of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium*. The authors found that the pH values decreased significantly during

storage at 4 °C, ranging from 4.93 (day 1) to 4.32 (day 19), similar to that observed in the present study for the formulations with *L. casei*, particularly in L2 and L3. In contrast, the results observed in formulation L4, revealed a manufacture process that may minimize the excessive post-acidification during the shelf life of the product. Although the metabolic activity of lactic acid bacteria be reduced under refrigeration, the final product may suffer a phenomenon called post-acidification, that is the decrease of pH during storage due to persistent metabolic activity of the *starter* culture added to the product (mainly *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) (18).

The presence of *L. casei* did not affect *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* populations, since populations above 8 log CFU / g were detected in yoghurt at 21th day of storage. Between the 1st and the 7th day of storage, there was a decrease in the populations of *L. casei* for all formulations probably due to stress caused by the process and / or low temperature. Between the 7th and 14th day there was an increase in the populations of *L. casei* probably due to adaptation of the microorganism to the matrix that constitutes the product. At the last week's storage of yoghurt, there was a reduction of these populations probably caused by adverse conditions, such as lack of nutrients and low pH. Although some variations and reductions were observed during the storage period, *L. casei* populations remained always above the minimum recommended for a probiotic food (10⁶ CFU / g). Therefore it was possible to consider the formulations L2, L3 and L4 as probiotic yoghurts established by the Brazilian regulation (19).

Similarly, Kristo *et al.* (20) produced probiotic fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* B117 in co-cultured with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* Y4.10 and Y6.15. The authors found that populations of *L. paracasei* remained with counts of 10⁶ CFU/mL during 21 days of storage at 4 °C.

Regarding the time of addition of the probiotic microorganism to the yoghurt, different results from those observed in this study were verified by Lankaputhra and Shah (6), which produced yoghurt by fermenting milk initially only with probiotic microorganisms *L. acidophilus* and *B. longum* for two hours. After this period, when such microorganisms were in the final adjustment phase or in early log phase, the cultures of yoghurt were added. After six weeks of storage, the authors observed that the pro-

biotics counts were approximately one log cycle greater than when these microorganisms were added before the yoghurt cultures as compared to the yoghurt with cultures added concurrently.

CONCLUSION

The probiotic microorganism *Lactobacillus casei* remained viable, in populations above 8 log CFU / g during the refrigerated storage of yoghurt. Regarding the best step of adding the probiotic microorganism during processing of yoghurt, there was no statistically significant difference between the populations for the formulations with the exception for the first day. Thus, all forms of probiotics addition studied were efficacious and revealed the possibility of obtaining probiotic yoghurt concerning the shelf life studied. Also, the results revealed that the excessive post-acidification can be minimized during the shelf life of the product, with probiotic supplementation after fermentation of milk by the *starter* culture.

REFERENCES

- Sanders ME. Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev.* 2003; 61: 91-9.
- Shah NP. Functional cultures and health benefits. *Int Dairy J.* 2007; 17: 1262-77.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989; 66: 365-78.
- Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2006; 42: 1-16.
- Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov Today.* 2003; 8: 692-700.
- Lankaputhra WEV, Shah NP. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and bifidobacteria in yoghurt using two step fermentation and neutralized mix. *Food Aust.* 1997; 49: 363-66.
- Dave RI, Shah NP. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yoghurt. *J Dairy Sci.* 1998; 81: 2804-16.
- Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, Van Boekel MAJS. *Dairy technology: principles of milk properties and processes.* New York: Marcel Dekker; 1999.
- Vedamuthu ER. *Starter* cultures for yoghurt and fermented milk. In: Chandan RC, editor. *Manufacturing yoghurt and fermented milks.* Oxford: Blackwell Publishing; 2006. p.89-115.
- Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol.* 2000; 84: 197-215.
- Lima KGC, Kruger MF, Behrens J, Destro MT, Landgraf M, Franco, BDGM. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Food Sci Technol.* 2009; 42: 491-95.
- Association of Official Agricultural Chemists. *Official Methods of Analysis.* 15 ed. Washington, 1995. 109.
- Statsoft, Inc. *Statistica for Windows [Computer program manual].* Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2000.
- Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Wright A, Ouwehand A, editors. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects.* New York: Marcel Dekker; 2004. p.1-66.
- Vásquez A, Molin G, Pettersson B, Antonsson M, Ahrne S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei / paracasei* and related species. *Syst Appl Microbiol.* 2005; 28 (5): 430-41.
- Thamer KG, Penna ALB. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acidificadas de prebióticos. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2006; 26: 589-95.
- Kempka AP, Krüger RL, Valduga E, Di Luccio M, Treichel H, Cansian R, et al. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos substratos alternativos e cultura probiótica. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2008; 28: 171-75.
- Beal C, Skokanova J, Latrille E, Martin N, Corrieu G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yoghurt. *J Dairy Sci.* 1999; 82(4): 673-81.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Alimentos. Recomendações da Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas.* [acesso 2012 jun 06]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecnolista_alega.htm>.
- Kristo E, Biliaderis CG, Tzanetakis N. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *Int Dairy J.* 2003; 13: 517-28.

Recibido: 11-10-2012
 Aceptado: 02-04-2013

Iron bioavailability in Wistar rats fed with fortified rice by Ultra Rice® technology with or without addition of yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*)

Ceres M. Della Lucia, Maria das Graças Vaz Tostes, Carlos Mário M. Silveira, Livia A. Bordalo, Fabiana C. Rodrigues, Helena Maria Pinheiro-Sant'Ana, Hércia S. D. Martino, Neuza Maria B. Costa

Department of Nutrition and Health, Federal University of Viçosa, Brazil. Department of Husbandry, Federal University of Espírito Santo, Center for Agricultural Sciences, Alegre, Brazil.

SUMMARY. This study aimed to evaluate iron (Fe) bioavailability in Wistar rats fed with rice fortified with micronized ferric pyrophosphate (FP) by Ultra Rice® (UR) technology with or without addition of yacon flour as a source of 7.5% of fructooligosaccharides (FOS). Diets were supplied with 12 mg iron/kg from the following sources: ferrous sulfate (FS - control diet), fortified rice with micronized ferric pyrophosphate (Ultra Rice®) (UR diet), ferrous sulfate + yacon flour (FS + Y diet) or Ultra Rice® + yacon flour (UR + Y diet). Blood samples were collected at the end of depletion and repletion stages for determination of hemoglobin concentration and calculation of the relative biological value (RBV). Also, the content of short chain fatty acids (SCFA) (acetic, propionic and butyric acids) from animals' stools and caecum weight were determined. The UR diet showed high iron bioavailability (RBV = 84.7%). However, the addition of yacon flour in the diet containing fortified rice (UR + Y diet) decreased RBV (63.1%) significantly below the other three groups ($p < 0.05$). Groups that received yacon flour showed higher acetic acid values compared to those who did not. In conclusion, fortified UR® with micronized ferric pyrophosphate showed high iron bioavailability but the addition of yacon flour at 7.5% FOS reduced iron bioavailability despite increased caecum weight and SCFA concentration.

Key words: Ultra Rice®, relative biological value; hemoglobin; iron deficiency; fructooligosaccharides.

RESUMEN. Biodisponibilidad de hierro en ratas Wistar alimentadas con arroz fortificado por medio de la tecnología Ultra Rice® con o sin adición de harina de yacon (*Smallanthus sonchifolius*). Este estudio tuvo como objetivo evaluar la biodisponibilidad de hierro (Fe) en ratas Wistar alimentadas con arroz fortificado con pirofosfato férrico micronizado por medio de la tecnología Ultra Rice® (UR®), con o sin adición de harina de yacon. Las dietas contenían 12 mg de hierro/kg a partir de las siguientes fuentes: sulfato ferroso (SF - dieta de control), Ultra Rice® (dieta UR®), sulfato ferroso + harina de yacon (dieta SF + Y) o Ultra Rice® + harina de yacon (dieta UR® + Y). Al final del estudio, se recogieron muestras de sangre para la determinación de la concentración de hemoglobina y el cálculo del valor biológico relativo (RBV). También se determinó el contenido de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (ácidos acético, propiónico y butírico) en las heces de los animales. La dieta UR® mostró alta biodisponibilidad de hierro (RBV = 84,7%). Sin embargo, la adición de harina de yacon en la dieta que contenía arroz fortificado (dieta UR® + Y) disminuyó el RBV (63,1%) ($p < 0,05$). Los grupos que recibieron harina de yacon mostraron los valores más altos de ácido acético en comparación con aquellos que no recibieron. En conclusión, el arroz fortificado con pirofosfato férrico micronizado por medio de la tecnología UR® mostró alta biodisponibilidad de hierro. La adición de harina de yacon, con el fin de proporcionar 7,5% de fructooligosacáridos (FOS) en la dieta, causó aumento del peso del ciego y de la concentración de AGCC, aunque disminuyó la biodisponibilidad de hierro.

Palabras clave: Ultra Rice®, valor biológico relativo, hemoglobina, deficiencia de hierro, fructooligosacáridos.

INTRODUCTION

Iron deficiency is the most common and widespread nutritional disorder in the world, and is a public health problem in both industrialized and non-industrialized countries. Interestingly, although a marked decline of stunting and an incre-

ase in the obesity epidemic characteristic of the nutritional transition process have been observed, a high prevalence of anemia continues, with a modal frequency of 40-50% in children under five years and 30-40% in pregnant women. Anemia is, in terms magnitude, the main problem of deficiency in the world, apparently without major geographic differentiations (1).

Food fortification is a well recognized approach to overcome hidden hunger in many parts of the world, particularly in developing countries. Additionally, fortification is a method of controlling micronutrient deficiency as an intervention alternative mainly recommended for locations where high prevalence rates are found (2).

Several condiments and foods, including sugar, soybeans, milk, oil, wheat flour and rice have been explored as potential vehicles for fortification in different country contexts. Among these, rice is a potential candidate for fortification in countries where it is a staple food and specific deficiencies reach high prevalence rates among people with consistent rice consumption (3).

Previous attempts involving the fortification of rice flour were unsuccessful, due to the habit of washing and cooking rice with excess water, which results in the leaching of micronutrient used for enrichment (4). However, recently a new technology was created (Ultra Rice® - UR®) that overcame this barrier. Broken and cracked grains, which typically comprise 20% to 30% of the production and are generally destined for animal feed, can be transformed into rice flour, combined with a binder and other nutrients, and refurbished by extrusion as reconstituted rice grains with the same size, shape and texture of conventional rice (5).

Studies evaluating the efficacy and effectiveness of UR® in the improvement of the nutritional status of iron are still scarce. A study conducted in Indonesia demonstrated the viability of UR® in small rural mills and excellent market acceptance of the fortified product (6). In India, after seven months of using iron fortified-UR® in the meals of anemic schoolchildren, positive effects were observed with regards to serum ferritin (SF), but not hemoglobin (Hb) (7). In Brazil, it was found that micronized ferric pyrophosphate-UR® increased iron levels and reduced the incidence of anemia in children between 6 and 24 months old who were mildly anemic at baseline (8).

Iron bioavailability may be enhanced by dietary components, such as dietary inulin-type fructans (ITF) (inulin and fructooligosaccharides - FOS), as a result of their fermentation in the large intestine (9). Fermentation favors the production of short-chain fatty acids (SCFA), which affect luminal pH, in turn affecting mineral solubility. These effects are also accompanied by modifications in the mucosal architecture of the intes-

tine as a result of increases in both the cellularity and number of crypts, mechanisms which may contribute to an increase in the mineral absorptive surface (9). However, in the study of Petry et al. (10) the authors found no effect of inulin on iron absorption. A possible explanation for this is that whereas it seems probable that iron is absorbed in the colon in human, colonic absorption is likely to be a minor component of total iron absorption compared with duodenal absorption

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) is an Andean tuberous root that accumulates large amounts of low degree of polymerization ITF (11). Its cultivation has expanded in various regions of the world (New Zealand, Japan, Czech Republic, South Korea, Thailand, Philippines, Russia, Estonia, Brazil etc..) because of its easy handling and processing and mainly because it is a source of bioactive components. Although it is considered a traditional food in South America, for the European Union yacon is a new food and therefore its safety must be evaluated. This has stimulated the interest of the scientific community in studies to characterize this root regarding to its chemical composition, technological and functional properties (12).

Yacon is regarded as a functional food given that it contains fructooligosaccharides (FOS), inulin and phenolic compounds. The consumption of FOS and inulin provides the growth of bifidobacteria in the colon, enhances mineral absorption and gastrointestinal metabolism (11). Therefore, the use of yacon, together with dietary sources of iron, may improve the mineral bioavailability and reduce the impact of dietary iron insufficiency.

In the study of Hunt JR (13), the bioavailability of some ferric pyrophosphate compounds in UR® was assessed. The authors found an relative biological value (RBV) varying from 75% to 94%. Therefore, although the ferric pyrophosphate bioavailability is good, the addition of yacon flour can improve it.

Thus, the present study aimed to determine whether the addition of yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*) is able to increase iron bioavailability in Wistar rats fed with fortified rice with ferric pyrophosphate by UR® technology.

MATERIALS AND METHODS

Raw material

Rice grains extruded from rice flour (Ultra Rice®

- UR®), produced by a pasta manufacturer (Adorella Foods Ltd.) located in Indaiatuba, Sao Paulo, Brazil, and kindly granted by *Program for Appropriate Technology in Health* (PATH) were used. The grains contained iron (in the form of micronized ferric pyrophosphate), zinc (as zinc oxide), thiamine (in the form of thiamine mononitrate) and folic acid.

Preparation of yacon flour

Yacon roots (115.5 kg) were purchased from the local market (Viçosa, MG, Brazil), selected, weighted and subjected to the flour preparation process according to the methodology of Rodrigues, Castro, Martino & Ferreira (12). After washing in running tap water and sanitization in chlorinated water at 5 ppm during 5 minutes, peeling was made using a potato peeler and then roots were treated with a sodium citrate solution at 0.5% during 15 minutes. After grinding in multiprocessor (Walita, modelo RI7625), yacon pieces of 2 cm, whole peeled, was immersed in a sodium bisulfite solution at 0.5% during 15 minutes. After that, liquid was eliminated and drying was performed in air-flow dryer (Polidryer-DP, Viçosa, Brazil) at 55°C during 48 hours. At the end of the drying process, yacon was ground and the flour was weighted and stored in plastic bags at 10°C. Chemical composition of yacon flour was determined as indicated by the AOAC method (14), resulting in the following values per 100 grams: 6.9 g of moisture, 2.7 g of proteins, 0.15 g of fat, 5.4 g of ash, 8.6 g of glucose, 21.1 g of fructose; 16.3 g of sucrose and 25.7 g of FOS.

Determination of iron in UR®, yacon flour and experimental diets

Iron content in UR®, yacon flour and experimental diets was determined according to AOAC (14). One gram of each sample, in triplicate, was weighted in tubes and digested using 10 mL of concentrated HNO₃ at a temperature of 160 °C. After the first 8 hours of digestion, another 5 mL of HNO₃ were added. After completing digestion, the contents of the tube were transferred to 50 mL volumetric flasks. The samples were then mixed in a vortex and the volume was made up with deionized water. Iron was determined by plasma emission spectrophotometry (Perkin-Elmer Optima 3300 DV, Norwalk, USA). The glassware and utensils used for both the mineral and biological assays were demineralized, using a 10% HNO₃ solution,

in which they remained for 24 h followed by rinsing in deionized water.

Evaluation of iron bioavailability in vivo

The study was conducted according to Brazilian Standards of Animal Experimentation and was approved by the Ethics Committee for Animal Research (Project Identification Code: 33; date of approval: June 09th 2011).

Thirty-two 21-day old male *Wistar* rats (*Rattus norvegicus*, albinus variety, Rodentia class), with initial body weight ranging from 60 - 90 g were used in the study. The animals were provided by the Central Biotechnology of the Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil and were individually housed in stainless steel cages under controlled temperature (21°C ± 1°C) and 12 hour photoperiod for 14 days.

The depletion-repletion hemoglobin method was applied to determine iron bioavailability, according to AOAC (13), with a modification to the depletion phase which lasted three weeks, instead of four. This time was sufficient to cause iron deficiency anemia in the rats (6 mg/dL), based on the results of previous studies in our laboratory (15).

1. Experimental diets

Diets were prepared based on the nutritional needs of animals using AIN93-G composition, according to Reeves, Nielsen & Fahey (16). The composition of the diets is presented in Table 1. Ingredients were individually weighed and mixed using demineralized plastic tools, followed by mixing in a semi-industrial mixer (Lieme®, São Paulo, Brazil) at low speed for 15 minutes. The diets were stored in polyethylene bags at 10°C. The amount of yacon flour was calculated to provide 7.5% of dietary fructo-oligosaccharides (FOS).

2. Depletion phase

The animals were fed a modified AIN-93G diet (16) recommended for rats in the growing phase, utilizing an iron-free mineral mix and deionized water *ad libitum*, during 21 days to induce anemia. At the end of the depletion period, blood samples were collected by tail incision to determine hemoglobin (Hb) concentration. After making an incision at the terminal portion of the tail of each animal, blood was dripped on glass slide and immediately collected with a micropipette. A 10 µL blood aliquot was mixed with 2.5 mL of cyanide and potassium ferricyanide (Drabdkin so-

TABLE 1. Composition of experimental diets (g/100 g mixture)

Components/	Depletion Period			Repletion Period	
	AIN-93G	FS	UR®	FS + Y	UR + Y
Concentration					
FeSO ₄ (mg)	-	0.0059	-	0.0041	-
Albumin*	20.00	20.00	20.00	20.00	18.93
Maltodextrin*	13.20	13.20	13.20	9.77	9.77
Sucrose*	10.00	10.00	10.00	-	-
Soybean Oil *	7.00	7.00	7.00	6.95	6.95
Fiber (microfine cellulose)*	5.00	5.00	5.00	1.13	1.13
Iron-free mineral mix *	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
Vitamin mix *	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
L-cystine*	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline bitartrate *	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Corn starch*	39.75	39.75	39.75	29.06	28.97
Yacon flour ^a	-	-	-	29.2	29.2
Ultra Rice® ^b	0.00	-	0.13	-	0.09

FS: Ferrous sulfate diet UR®: Ultra Rice diet FS + Y: Ferrous sulfate + Yacon flour diet UR®+ Y : Ultra Rice + Yacon flour diet

* Rhoister, Industry and Commerce Ltd. ^a 25.7% oligofrutans, 16.3% saccharose, 21.1% fructose, 0.0013% iron, soluble dietary fiber: 2,72 % insoluble dietary fiber: 10,53 % non-digestible carbohydrates: 38,95 % (Source: Rodrigues, Castro, Martino, Ferreira, 2011).

^b 0.94% of iron

lution) and absorbance was measured at 540 nm in a spectrophotometer (Shimadzu UV-1601).

3. Repletion phase

Anemic rats were systematically assigned to four groups (n=8) according to their hemoglobin level to obtain groups with similar means. The groups were fed with diets containing 12 mg of iron/kg supplied from the following iron sources: ferrous sulfate (FS - control diet), fortified rice (Ultra Rice® - UR®) (UR® diet), ferrous sulfate + yacon flour (FS + Y diet) or Ultra Rice + yacon flour (UR® + Y diet). In diets FS + Y and UR® + Y, corn starch, sucrose and dietary fiber were quantitatively adjusted, taking into account the offer of 7.5% of FOS and the carbohydrate content of yacon flour (Table 1).

The rats were fed 17 to 18 g rations/day of repletion diet during 14 days and deionized water was provided *ad libitum*.

At the end of the repletion period, blood samples were collected by tail incision for further determination of Hb concentration.

For calculating Hb concentrations, absorbance for a standard Hb solution at a concentration corresponding to 11.4 g/dL was used as reference (Química Básica, Belo Horizonte, MG, Brazil).

Iron (Fe) consumption was calculated considering the total amount of diet consumed and the iron content of the specific diet, which was calculated for each animal according to the formula below:

$$(1) \text{Fe consumption} = \frac{[\text{total diet consumption during repletion period (g)} \times \text{Iron in the diet (mg/1000 g)}] / 1000$$

The results of the Hb concentrations and iron consumption were used to estimate the following indexes:

$$(2) \text{Hb-Fe pool (mg), assuming the total blood volume was 6.7\% the body weight and Fe content in}$$

$$(3) \text{Hb was 0.335\%:}$$

$$\text{Hb-Fe pool (mg)} = [\text{Fe Hb (final)} - \text{Fe Hb (initial)} \times 100] / \text{Fe intake (mg)}$$

Where:

$$\text{Hb Fe (initial)} = [\text{weight (g) (initial)} \times \text{Hb (g / dL) (initial)} \times 6.7 \times 0.335] / 1000$$

$$\text{Fe Hb (final)} = [\text{weight (g) (final)} \times \text{Hb (g / dL) (final)} \times 6.7 \times 0.335] / 1000$$

Hb Repletion Efficiency (HRE)

$$\% \text{HRE} = (\text{Hb Fe pool (final)} - \text{Hb Fe pool (initial)}) \times 100 / \text{Fe intake (mg)}$$

$$(4) \text{Relative Biological Value (RBV):}$$

$$\text{RBV} = 100 \times (\% \text{HRE test group} /$$

% HRE SF group)

(5) Biological Value Relative to Hb Gain (GHb RBV):

RBV GHb = gain of Hb by each animal Hb /
Average gain of Hb in ferrous sulfate group

During the experimental period, body weight and food intake were monitored to determine the feed efficiency ratio (FER), calculated as the ratio between the body weight gain (g) and food intake (g).

Reticulocyte count

After the animals were sacrificed, a reticulocyte count was also obtained as an indicator of recent bone marrow activity. A 5 mL blood aliquot was collected in a tube containing EDTA, and then 0.5 mL of this solution was added to 0.5 mL of brilliant cresyl blue in a hemolysis tube, which was maintained in a water bath at 37 °C for 15 minutes. The smear was obtained from the homogenate which was focused using an objective lens. Counting was performed with at least 1.000 red blood cells, and the number of reticulocytes found in these fields was noted. Values were expressed in %.

Determination of short chain fatty acids (SCFA) in animals stools

For determination of SCFA (acetic, propionic and butyric acids) the method proposed by Smiricky-Tjarda, Grieshop, Flickinger, Bauer & Fahey (17) was used. SCFA concentrations were determined using high performance liquid chromatography system (HPLC) (Shimadzu, model SPD-10A VP), coupled to an Ultra Violet (UV) detector using a wavelength of 210 nm. After animals' euthanasia, stools from the caecum were mixed with 25% metaphosphoric acid in eppendorf tubes and then maintained at rest for 30 minutes at room temperature. After that, samples were centrifuged in a refrigerated microcentrifuge (Hitachi, CT15RE) at 16.100 g for 30 minutes. The supernatant was transferred to another eppendorf and was centrifuged again for 20 minutes under the same conditions. This supernatant was then used for determining the SCFA concentrations. The chromatographic conditions were: reversed phase column (C18), 30 cm x 4.5 mm, flow rate: 0.8 mL/min, column pressure: 181 kgf, mobile phase: 1% orthophosphoric acid in water, injection volume: 20 µl.

Statistical Analysis

Descriptive statistics were used and results are shown in terms of mean and standard deviation. Groups were compared using analysis of variance (ANOVA) and the Dunnett's post hoc test was applied to identify where significant differences occurred, considering ferrous sulfate as the control group and a significance level of 5% ($p < 0.05$). Data was analyzed using the software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 17.0.

RESULTS

Iron status of rats

After 21 days of iron restriction (depletion period), it was observed that hemoglobin levels in the animals were low (Table 2), indicating the efficacy of iron depletion. No significant difference was observed in hemoglobin levels and hemoglobin iron among the experimental groups ($p > 0.05$). Also, there were no significant differences among groups regarding weight gain and food consumption during the depletion period ($p > 0.05$).

Food intake and body weight in iron repletion period

After analysis of diets, it was observed that the average \pm SD iron content was 1.76 ± 0.23 mg iron/100 g in FS control diet, 2.11 ± 0.31 mg iron/100 g in FS + Y diet, 2.07 ± 0.29 mg iron/100 g in UR® diet and 2.53 ± 0.19 mg iron/100 g in UR® + Y diet.

There were no significant differences ($p > 0.05$) in food intake and FER among groups during the repletion period. However there was a difference in total iron intake ($p < 0.001$), where the FS group presented the lowest intake (4.58 ± 0.39 mg) and the UR® + Y group showed the highest (6.71 ± 0.51 mg). Body weight and weight gain at the end of repletion period were not different among groups (Table 3).

Hematological indexes and iron bioavailability

The hematological levels of animals consuming diets containing yacon flour and ferrous sulfate or UR® with ferric pyrophosphate as sources of iron at the beginning and end of the repletion period are described in Table 4 and Figure 1.

Iron intake was different among the groups since the iron concentration in diets were also different, al-

TABLE 2. Body weight, weight gain, feed intake, feed efficiency ratio and hematological indexes of animals after 21 days of iron-deficient diet (depletion period)

Indexes	FS	FS + Y	UR®	UR® + Y
Weight gain (g)	96.7 ± 7.4	97.0 ± 15.0	94.9 ± 14.8	92.5 ± 11.1
Feed intake (g)	295.7 ± 19.6	287.5 ± 37.2	302.4 ± 22.5	285.8 ± 22.6
Feed efficiency ratio	0.3 ± 0.03	0.3 ± 0.07	0.3 ± 0.05	0.3 ± 0.05
Hemoglobin (g/dL)	7.5 ± 1.2	7.5 ± 1.1	7.5 ± 1.1	7.4 ± 1.1
Hemoglobin iron (mg)	3.0 ± 0.6	3.1 ± 0.7	3.0 ± 0.5	2.9 ± 0.4

FS: Ferrous sulfate, FS + Y: Ferrous sulfate + Yacon flour, UR®: Ultra Rice, UR® + Y: Ultra Rice + Yacon flour. Results expressed as mean ± SD from iron-deficient rats (n=8/group) after 21 day period fed with iron repletion diet. SD = Standard deviation. Means do not differ from each other according to ANOVA ($p > 0.05$)

TABLE 3. Data from food consumption, body weight and hematological parameters after 14 days of repletion diet

Indexes	FS	FS + Y	UR®	UR® + Y
Total food intake (g)	259.9 ± 22.3	255.9 ± 24.7	262.5 ± 25.8	264.9 ± 19.9
Fe intake (mg)	4.6 ± 0.4 ^a	5.4 ± 0.5 ^b	5.4 ± 0.5 ^b	6.7 ± 0.5 ^c
Feed efficiency ratio	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.04	0.1 ± 0.04
Weight gain (g)	31.1 ± 13.9	31.5 ± 10.9	31.5 ± 8.9	25.7 ± 10.1

FS: Ferrous sulfate, FS + Y: Ferrous sulfate + Yacon flour, UR®: Ultra Rice, UR® + Y: Ultra Rice + Yacon flour. Results expressed as mean ± SD. Means followed by the same capital letters in columns do not differ from each other according to the Dunnett's test ($p > 0.05$), to compare each test group with ferrous sulfate group (control). SD = Standard deviation.

though they were prepared to reach 12 ppm Fe/ kg of diet. These differences can occur due to possible contamination in ingredients used during the preparation of diets, which is common. Since significant differences were detected in iron intake among the groups, specific ratios were calculated in an attempt to avoid misinterpretation of the results since groups with higher iron intake have proportionally higher hemoglobin concentration and higher hemoglobin gain. Thus, the ratios hemoglobin iron/iron intake and Hb gain/iron intake were calculated.

Hemoglobin levels at the end of the repletion period were higher than in the beginning (end of depletion), however Hb gains did not differ among groups ($p > 0.05$), even when this index was corrected by iron consumption.

Despite a tendency to increase in the groups that received yacon flour, the biological value relative to Hb gain did not differ among the groups receiving yacon compared with those that did not receive yacon ($p > 0.05$).

Reticulocyte values at the end of the repletion period were normal in all groups. It was observed that at the end of the experiment the animals had recovered from iron depletion, with reticulocyte values within normal limits (0.5 to 2.3%).

There was no significant difference ($p > 0.05$) in the levels of hemoglobin iron at the end of the repletion period; however, considering the iron intake, levels of hemoglobin iron were lower in the UR® + Y group compared to other groups.

Significant differences ($p < 0.05$) were observed among groups with respect to hemoglobin repletion efficiency (HRE) and the biological value relative to HRE (RBV), as shown in Figure 1.

Intestinal analysis

Yacon flour was associated with a significant increase in the absolute caecum weight of animals ($p < 0.001$), more pronounced in the diet containing ferrous sulphate and yacon flour. The relative caecum weight (caecal weight/body weight) was higher in ani-

TABLE 4. Hematological values of animals receiving diets containing yacon flour and ferrous sulfate or UR® with ferric pyrophosphate as sources of iron at the beginning and end of repletion

Parameters	FS	FS + Yacon	UR®	UR® + Yacon
Initial hemoglobin	7.5 ± 1.2	7.5 ± 1.1	7.5 ± 1.1	7.4 ± 1.1
Final hemoglobin	12.4 ± 1.5	12.7 ± 1.2	12.3 ± 2.7	12.4 ± 2.6
Hemoglobin gain (g/dL)	4.9 ± 1.4	5.2 ± 1.1	4.7 ± 1.9	5.0 ± 2.7
Hemoglobin gain /Iron intake	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.4
Relative biological value	100.0 ± 27.9	106.8 ± 23.1	97.6 ± 39.0	102.6 ± 56.1
Initial hemoglobin iron (mg)	3.0 ± 0.6	3.1 ± 0.7	3.0 ± 0.5	2.9 ± 0.4
Final hemoglobin iron (mg)	5.8 ± 0.8	6.2 ± 0.8	5.8 ± 1.2	5.5 ± 0.9
Final hemoglobin iron /Iron intake	1.3 ± 0.3 ^a	1.2 ± 0.2 ^a	1.1 ± 0.2 ^a	0.8 ± 0.1 ^b
Reticulocytes (%)	1.0 ± 0.5	1.3 ± 0.8	1.1 ± 0.4	1.4 ± 0.6

FS: Ferrous sulfate, FS + Y: Ferrous sulfate + Yacon flour, UR®: Ultra Rice, UR® + Y: Ultra Rice + Yacon flour. Results expressed as mean ± SD. Means followed by the same capital letters in columns do not differ from each other according to the Dunnett's test ($p > 0.05$), to compare each test group with ferrous sulfate group (control). SD = Standard deviation.

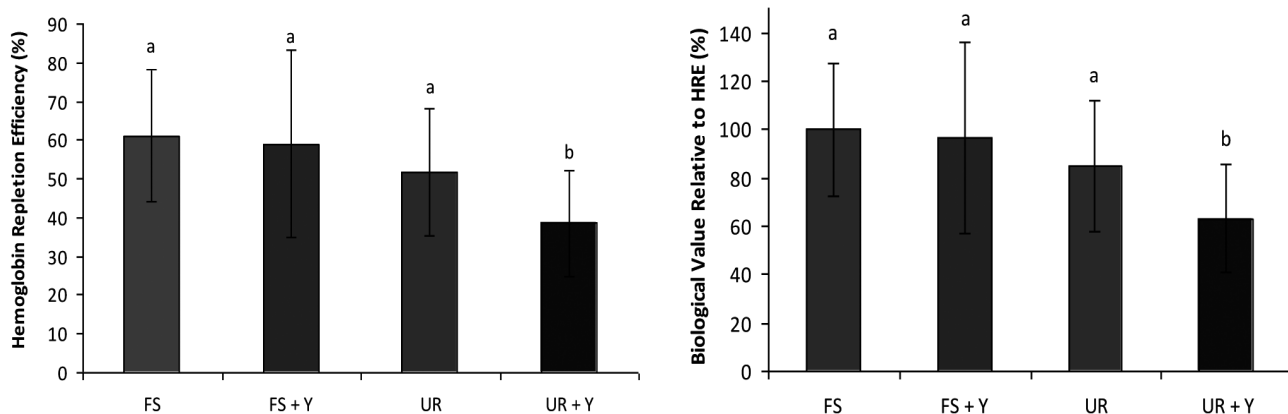


FIGURE 1. Hemoglobin Repletion Efficiency (HRE) and biological value relative to HRE in experimental diets. Mean values followed by the same superscript letter are not significantly different according to the Dunnett's test ($p > 0.05$) to compare each test group with ferrous sulfate (control).

TABLE 5. Caecum absolute and relative weights and production of short chain fatty acids

Parameters	FS	FS + Yacon	UR®	UR® + Yacon
Caecum absolute weight (g)	4.9 ± 1.53 ^a	13.2 ± 3.1 ^b	4.6 ± 1.2 ^a	8.5 ± 1.8 ^c
Caecum relative weight (g)	0.0 ± 0.008 ^a	0.1 ± 0.02 ^b	0.02 ± 0.006 ^a	0.04 ± 0.01 ^c
SCFA (µmol/caecum)				
Acid acetic	88.0 ± 21.81 ^a	184.8 ± 46.0 ^b	72.5 ± 20.3 ^a	152.9 ± 54.6 ^b
Acid propionic	243.8 ± 48.41 ^a	513.5 ± 154.7 ^b	203.5 ± 62.5 ^a	283.0 ± 105.2 ^a
Acid butyric	7.1 ± 2.90 ^a	17.6 ± 11.7 ^b	7.3 ± 5.9 ^a	10.5 ± 2.7 ^a

FS: Ferrous sulfate, FS + Y: Ferrous sulfate + Yacon flour, UR®: Ultra Rice, UR® + Y: Ultra Rice + Yacon flour. Results expressed as mean ± SD. Means followed by the same capital letters in columns do not differ from each other according to the Dunnett's test ($p > 0.05$), to compare each test group with ferrous sulfate group (control). SD = Standard deviation. SCFA: short chain fatty acids.

mals fed with yacon flour and more prominent in the group that received ferrous sulfate with yacon flour ($p < 0.001$) (Table 5).

There was significant difference ($p < 0.001$) in the concentration of SCFA, and with respect to acid acetic groups that received yacon flour showed higher values than those that did not. The FS + Y group produced higher butyrate and propionate concentrations, and no differences were observed in the other groups.

DISCUSSION

Iron bioavailability can be affected by sources of FOS. Lobo et al. (18) found that iron bioavailability from ferric pyrophosphate was higher when offering yacon flour to animals with iron deficiency anemia, with an RBV of 97%. It is important to consider that ferric pyrophosphate is an insoluble salt of low iron bioavailability. In the rat model, the high FOS content could improve bioavailability of this mineral by acidification of the medium resulting from the activity of fermentative local microbiota or increased iron uptake due to hypertrophy of the caecum walls (18). However, in the present study, rice fortified with ferric pyrophosphate showed a high RBV (84.7%) unlike that found by Lobo et al. (40%) (17). However, when offered in association with yacon flour, the iron in the fortified rice showed a reduction in bioavailability. This indicates that in the present study pyrophosphate in fortified rice had the highest bioavailability and the addition of yacon flour reduced the bioavailability of this mineral.

One of the feasible reasons for the high iron bioavailability obtained in the present study may be that the iron pyrophosphate in UR was in the micronized form, unlike that used by Lobo et al. (18). According to PATH (19) and Wegmüller et al (20), the micronization process produces very small salt particles (micrometers), thus increasing the surface area and improving iron bioavailability when compared to larger particle-size ferric FP and other insoluble salts. Whereas the prebiotic effect at the hind gut level did not seem to increase iron absorption, the flour may have decrease iron absorption where it matters most – the upper small intestinal mucosa.

HRE values for the FS control group (61%) and for the FP UR® group (51.8%) were higher than those found in the study by Lobo et al. (18), in which FS

showed an HRE around 25% and the FP group showed a HRE of approximately 10%. In the present study, despite having displayed the highest iron consumption among the groups ($p < 0.01$), the group that received ferric pyrophosphate and yacon showed the lowest HRE and RBV ($p < 0.05$).

One factor that may partially explain this result was the presence of a mild diarrhea observed in the group that received ferric pyrophosphate and yacon flour, which may have caused increased excretion of iron in the stool. However, the dose of FOS included in the diet was similar to that used in other studies, which did not report diarrhea in animals (9, 17).

Although negative effects of yacon flour on iron bioavailability in the present study were observed, there was a marked increase in caecal weight of the animals, being more pronounced in the group receiving yacon flour with ferrous sulfate. There was also an increased concentration of SCFA in these animals. Yacon flour contains a high proportion of carbohydrates in the form of oligofrutans such as inulin and FOS (21).

The effects of SCFA on both normal and neoplastic epithelial cells are known. While butyrate and, to a lesser extent, propionate, act by reducing the proliferation of tumor cells *in vitro*, all three major SCFA stimulate the proliferation of normal epithelial cells (22). It has also been reported that fermentation of FOS in the caecum of animals was accompanied by a hypertrophy in this portion of intestine or increase of the number and depth of caecal crypts (10), suggesting the cause/effect relationship between hyperplasia and hypertrophy and development of cell wall in the caecum.

Genta, Cabrera, Grau & Sanchez (23) presented results corroborating with those of the present study when feeding rats with diets containing yacon for a period of 4 months. Various levels of FOS (from 340 to 6800 mg/kg/day) were offered and the authors found significant increases in caecal weight only in the group supplemented with the highest level of FOS. These authors also found lack of toxicity and a certain beneficial metabolic activity in normal rats. In another study, Boyle et al. (24) fed rats with different oligofrutose levels (0%, 0.55%, 1.65%, 4.96% and 9.91%), observing a significant increase in caecal weight for the supplemented diets. In these studies the increased caecum weight was dose dependent and was associated with the trophic effect of SCFA on colo-

nocytes. In the present study 7.5% of FOS added to the diet increased caecal weight, especially when yacon was combined with ferrous sulfate. Significant gut effects of yacon flour were therefore observed, but not reflected in increased iron absorption.

CONCLUSION

Fortified rice with micronized ferric pyrophosphate by UR® technology showed high iron bioavailability. The addition of yacon flour, to provide 7.5% of fructooligosaccharides (FOS) in the diet, increased caecum weight and SCFA concentration, but reduced iron bioavailability, so its addition should not be encouraged.

Further studies are necessary regarding the effects of FOS, especially in diets with low bioavailability, aiming to reach further conclusions about its effects on iron absorption and contribution in the control of iron deficiency anemia.

REFERENCES

- Batista Filho M. Alimentação, nutrição & saúde. In: Rouquayrol ZM, Almeida Filho N, editors. Epidemiologia & Saúde, 5th ed., Rio de Janeiro: Medsi; 1999. p. 353-374.
- Chakravarty I. Food-based strategies to control vitamin A deficiency. Food Nutr Bull. 2000; 21: 135-143.
- Hurrell RF. Preventing iron deficiency through food fortification. Nutr Review. 1997; 55: 210-222.
- Hoffpauer DW. Rice enrichment for today. Cereal Foods World. 1992; 37: 757-759.
- Lee J, Hamer ML, Eitenmiller RR. Stability of retinyl palmitate during cooking and storage in rice fortified with ultra rice fortification technology. J Food Sci. 2000; 65: 915-919.
- PATH. Program for Appropriate Technology in Health. Seattle, Wa., Personal communication. 1999.
- Moretti D, Zimmermann MB, Muthayya S, Thankachan P, Lee TC, Kurpad AV, Hurrell RF. Extruded rice fortified with micronized ground ferric pyrophosphate reduces iron deficiency in India schoolchildren: a double-blind randomized controlled trial. Am J Clin Nutr. 2006; 84: 822-829.
- Pessoa MC. Eficácia do consumo de arroz fortificado com ferro no tratamento de crianças com anemia carencial [dissertation]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2009.
- Lobo AR, Colli C, Alvares EP, Filisetti TMCC. Effects of fructans-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) flour on caecum mucosal morphometry, calcium and magnesium balance, and bone calcium retention in growing rats. Brit J Nutr. 2007; 97: 776-785.
- Petry N, Egli I, Chassard, Lacroix C, Hurrell R. Inulin modifies the bifidobacteria population, fecal lactate concentration, and fecal pH but does not influence iron absorption in women with low iron status. Am J Clin Nutr. 2012; 96: 325-331.
- Delgado GTC, Tamashiro, WMSC, Maróstica Júnior MR, Pastore GM. Yacon (*Smallanthus sonchifoli*): A functional food. Plan Foods Hum Nutr. 2013. Available in: <<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11130-013-0362-0.pdf>>. (accessed 10 Jun 2013).
- Rodrigues FC, Castro ASB, Martino HSD, Ferreira CLLF. Farinha de yacon (*Smallanthus sonchifoli*): produção e caracterização química. Rev Inst Adolfo Lutz. 2011; 70: 290-295.
- Hunt JR. Assessment of the bioavailability of ferric pyrophosphate in Ultra Rice using the AOAC rat hemoglobin repletion method. In: The research behind the Ultra Rice technology. Available in: <www.path.org>. (accessed 20 May 2013).
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16.ed. Maryland. 1998.
- Martino HSD, Carvalho AW, Silva CO, Dantas MIS, Natal DIG, Ribeiro SMR, Costa NMB. Heat-treated hull flour does not affect iron bioavailability in rats. Arch Latinoamer Nutr. 2012; 61: 135-142.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GCJr. AIN-93G purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. 1993; 123: 1939-1951.
- Smiricky-Tjardes MR, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Fahey GC. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. J Animal Sci. 2003; 81: 2535-2545.
- Lobo AR, Cocato ML, Borelli P, Gaievski EHS, Crisma AR, Nakajima K, Nakano EY, Colli C. Iron bioavailability from ferric pyrophosphate in rats fed with eructan-containing yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour. Food Chem. 2011; 126: 885-891.
- PATH. Introdução do Arroz Fortalecido Usando a Tecnologia Ultra Rice®. Available online: <www.path.org/files/MCHN_ultrarice_faq_port.pdf> (accessed 26 Jun 2011).
- Wegmüller R, Zimmermann MB, Moretti D, Arnold M, Langhans W, Hurrell RF. Particle size reduction and encapsulation affect the bioavailability of ferric

- pyrophosphate in rats. *J Nutr.* 2004; 134(12):3301-4
21. Cazetta ML, Martins PMM, Monti R, Contiero J. Yacon (*Polymnia sonchifolia*) extract as a substrate to produce inulinase by *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. *J Food Eng.* 2005; 66: 301–305.
 22. Scheppach W, Bastram HP, Richter, F. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 1995; 31A: 1077-1080.
 23. Genta SB, Cabrera WM, Grau A, Sanchez S.S. Subchronic 4-month oral toxicity study of dried *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots as a diet supplement in rats. *Food Chem Toxicol.* 2005; 43: 1657-1665.
 24. Boyle FG, Wrenn JM, Marsh BB, Anderson WI, Angelosanto FA, Mccartney AL, Lien EL. Safety evaluation of oligofructose: 13 Week rat study and in vitro mutagenicity. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46: 3132-3139.

Recibido: 13-12-2012

Aceptado: 13-06-2013

Variación del contenido de lípidos y perfil de ácidos grasos en atún, trucha marina y pámpano sometidos a seis técnicas de cocción

María Isabel Castro-González, Ana Gabriela Maafs-Rodríguez, Fernando Pérez-Gil Romo.

Departamento de Nutrición Animal. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México, D.F., México.

RESUMEN. El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de seis técnicas de cocción (al vapor, empapelado en aluminio, empapelado en hoja de plátano, horno de gas, horno de microondas y sofrito) en el contenido de ácidos grasos de *Thunnusalbacare* (atún aleta amarilla), *Cynoscionnebulosus* (trucha marina) y *Trachinotuscarolinus* (pámpano). Después de someter los filetes de pescado a las técnicas de cocción se determinó el perfil de ácidos grasos por cromatografía de gases. Los lípidos totales se concentraron en todas las técnicas de cocción en atún y trucha. Los ácidos grasos saturados de atún y trucha aumentaron en tres técnicas, mientras que en pámpano sólo aumentaron en horno de gas. Sofrito fue la técnica que mayor contenido de n-3 presentó en atún y trucha, en tanto que el pámpano mostró el contenido más bajo; esta especie mostró menor variación con respecto a las restantes. Las técnicas de cocción recomendadas son, para el atún: empapelado con aluminio y horno de microondas; para la trucha: empapelado con hoja de plátano; y para el pámpano todas las técnicas descritas excepto horno de gas. Esta información puede enriquecer los datos de las tablas de composición nutricional de los alimentos, los cuales normalmente indican las concentraciones de nutrientes en crudo.

Palabras clave: Ácidos grasos, técnicas de cocción, pescado, atún aleta amarilla, trucha marina, pámpano.

SUMMARY. **Fatty acid variation in yellowfin tuna, spotted weakfish and Florida pompano when submitted to six cooking techniques.** The aim of the present study was to analyze the effect of six cooking techniques (steamed, foiled, foiled with banana leaf, baked, microwave-cooked and light frying) in the fatty acid content of *Thunnus albacore* (yellowfin tuna), *Cynoscionnebulosus* (spotted weakfish) and *Trachinotuscarolinus* (Florida pompano). After cooking the fish fillets, fatty acid analyses were performed using gas chromatography. Total lipids increased in all cooking techniques in tuna and spotted weakfish. Saturated fatty acids of tuna and spotted weakfish increased in three cooking techniques, while in Florida pompano only gas oven raised their content. Lightly frying generated the highest content of n-3 in tuna and spotted weakfish, and the lowest in Florida pompano, specie that presented less variation. In tuna fish, the most recommended cooking techniques are foiled with aluminum and microwave oven; for spotted weakfish, foiled with banana leaf; while Florida pompano can be prepared using all cooking methods except gas oven. This information is useful to enrich data from chemical composition tables, in which concentrations are usually presented in raw food.

Key words: Fatty acids, cooking techniques, fish, yellowfin tuna, spotted weakfish, Florida pompano.

INTRODUCCIÓN

El consumo cotidiano de pescado, principal fuente de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-3 eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), aporta numerosos beneficios a la salud (1, 2); y está inversamente asociado a enfermedad isquémica del corazón y a muerte por arritmia (2, 3). El pescado

previene el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, desórdenes inflamatorios, algunos tipos de cáncer y otras enfermedades degenerativas (3-5). Para obtener dichos beneficios, la Sociedad Americana del Corazón (American Heart Association) recomienda el consumo de pescados grasos por lo menos dos veces por semana, de preferencia preparado mediante las técnicas de cocción a la parrilla o asado (6).

Sin embargo, el contenido de ácidos grasos varía notablemente entre especies según diversos factores como época del año, zona de captura, clima, profundidad de ocurrencia de las especies, salinidad de su ambiente, madurez, género, entre otros (1, 7, 8). Por otro lado, las formas de cocción pueden alterar significativamente la composición del pescado (2), ya que ocurren reacciones químicas y físicas, tales como oxidación, pérdida o concentración de nutrientes por modificaciones en la humedad, intercambio de ácidos grasos (especialmente cuando se utiliza aceite), entre otros (1, 5). Existen varios estudios que han demostrado que el contenido nutricional de distintas especies de pescado varía según las técnicas de cocción utilizadas (2, 4-5, 9-11). Al cocinar los alimentos en el horno de microondas, se propagan ondas electromagnéticas que provocan elevación térmica y cambios en el contenido nutricional (12). El pescado cocinado en horno de gas sufre de una gran pérdida en el contenido de humedad y en la concentración de los distintos nutrientes del alimento, principalmente los lípidos totales (LT) y los ácidos grasos (10, 12, 13). Durante la fritura, los filetes de pescado absorben parte de los ácidos grasos del medio y generalmente se eleva su contenido lipídico (14); además, se produce una variación en la concentración de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y AGPI, así como una disminución de la concentración de ácidos grasos saturados (AGS) (12, 15).

En las tablas de composición química de los alimentos la información se presenta, de manera general, en productos crudos (16) por lo que los consumidores y los profesionales de la salud desconocen las propiedades nutricionales del pescado cocinado (4, 10), especialmente cuando se somete a técnicas locales, como el empapelado en hoja de plátano, utilizado por la población mexicana en el platillo conocido como tamal). Considerando lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto que seis técnicas de cocción, utilizadas comúnmente por la población mexicana, tienen en el contenido de ácidos grasos de tres especies de pescado de consumo cotidiano. Ello contribuirá a enriquecer las recomendaciones actuales sobre el consumo de pescado con sugerencias prácticas sobre aquellas técnicas de preparación que conserven o concentren los componentes saludables y disminuyan aquellos potencialmente limitantes o adversos para ciertas poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Las especies de pescado atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*), trucha marina (*Cynoscion nebulosus*) y pámpano (*Trachinotus carolinus*) fueron adquiridas en La Nueva Viga, el centro de distribución de recursos pesqueros más grande de América Latina, ubicado en el sureste de la ciudad de México (17). Se recolectaron 15 ejemplares de cada especie, durante los meses de enero a junio 2009 y de cada especie se muestreó el ejemplar de mayor tamaño, del cual se obtuvieron siete filetes de 100g cada uno.

Técnicas de cocción

Las tres especies fueron sometidas a seis técnicas de cocción estandarizadas, por separado. Para medir las temperaturas internas alcanzadas por los filetes, se utilizó un termómetro digital infrarrojo con mira láser:

- 1) Al vapor (VA): Se calentó agua en un recipiente hondo, y una vez que alcanzó su temperatura de ebullición, cada filete de pescado se colocó dentro de dicho recipiente sobre una vaporera, de manera que el pescado no estuviera en contacto con el agua, y la cocción se llevara a cabo mediante el vapor emitido por ésta. El tiempo de dicha técnica fue de 5-9 minutos y la temperatura interna que alcanzaron los filetes fue de 76-80°C.
- 2) Empapelado con aluminio (EA): Cada filete se envolvió en cuadrados de papel aluminio de 25 x 25 cm. El pescado envuelto se colocó sobre un comal (especie de sartén plano de metal, utilizado en México para cocinas) en una estufa y se sometió a calor a fuego bajo. Dicha técnica tuvo una duración de 6-10 minutos, y los filetes alcanzaron una temperatura interna de 82-93°C.
- 3) Empapelado con hoja de plátano (EP): El filete de pescado se envolvió en hoja de plátano y se colocó sobre un comal de metal en una estufa para someterlo a calor. La duración de dicha técnica fue de 5-8 minutos, y los filetes alcanzaron una temperatura interna de 78-92°C.
- 4) Horno de gas (HG): Los filetes se colocaron dentro de un recipiente que se introdujo al horno de gas para la cocción, durante 7-10 minutos. El horno había sido precalentado a 200°C. La temperatura interna alcanzada por

los filetes fue de 73-78°C.

- 5) Horno de microondas (HM): Cada filete se colocó en un recipiente dentro del horno de microondas y se cocinó durante 2-3 minutos a potencia regular. Alcanzó una temperatura interna de 75-82°C.
- 6) Sofrito (SO): Cada filete se colocó sobre un sartén con 5 mL de aceite de cártamo marca Oleico®, a fuego medio en una estufa. Después de 3 minutos se dio vuelta al filete para llevar a cabo la cocción por ambos lados del pescado. La duración de la técnica fue de 4-7 minutos y los filetes alcanzaron una temperatura interna de 82-93°C.

Análisis químicos

Después de someter los filetes de pescado a las diferentes técnicas de cocción, las muestras crudas (CR) y cocinadas se molieron en un homogeneizador para llevar a cabo los análisis químicos. El contenido de lípidos totales se llevó a cabo mediante extracción con solventes orgánicos (mezcla etanol:cloroformo) y cálculo gravimétrico, de acuerdo al método de Folch, Lees y Stanley (18). Posteriormente se procedió a una saponificación con potasa metanólica saturada para la obtención de los ácidos grasos libres, los cuales se esterificaron y metilaron con una solución de trifluoruro de boro-metanol al 14%. Se evaporaron a sequedad en atmósfera de N₂. La detección de ácidos grasos se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases Varian 3400 CX, equipado con una columna Supelco SP 2560 de 100m x 0.25mm x 20µm y con detector de ionización de llama. La temperatura del inyector fue 250°C y la del detector 300°C. La temperatura inicial de 140°C se incrementó 10°C/min hasta los 200°C. Esta temperatura se mantuvo por 1min, para luego incrementar 5°C/min hasta alcanzar los 270°C, temperatura que se mantuvo por 7 min. El volumen de inyección fue de 1µL para cada muestra. El estándar interno utilizado fue ácido miristoleico. Para identificar cada ácido graso se compararon los tiempos de retención de cada ácido graso con aquellos de la mezcla Supelco 37 FAME (19).

Se presenta la media de los análisis por triplicado, y los resultados se agruparon en tablas descriptivas.

Análisis estadístico

Los resultados de los ácidos grasos se agruparon

como sigue: AGS (ácidos grasos saturados), AGMI (ácidos grasos monoinsaturados), AGPI (ácidos grasos poliinsaturados), AGPI_{n-3} (ácidos grasos poliinsaturados n-3), AGPI_{n-6} (ácidos grasos poliinsaturados n-6) y EPA+DHA (ácidos grasos n-3: eicosapentaenoico y docosahexaenoico).

Los resultados de los LT y los grupos de ácidos grasos se sometieron a un análisis de estadística descriptiva, a un análisis de varianza de una vía por rangos (método de Kruskal-Wallis) y a un procedimiento de comparaciones pareadas múltiples (método de Student-Newman-Keuls, para atún y pámpano, y método de Dunn's para trucha marina). Se determinaron las diferencias significativas entre los grupos de ácidos grasos y lípidos totales según las técnicas de cocción ($p < 0.05$) para cada especie. Se utilizó el software SigmaPlot 2008 para Windows (20).

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en los componentes analizados en los filetes de pescado después de haber sido sometidos a las técnicas de cocción, así como las diferencias significativas en cada una de las tres especies, al comparar sus valores en crudo con las técnicas de cocción. En las Tablas 2 a 4 se presenta parte del perfil de AG de atún, trucha y pámpano.

Lípidos totales

Por su contenido de LT en crudo (Tabla 1), la trucha marina se considera una especie magra (< 2% de grasa); el atún aleta amarilla es un pescado con bajo contenido de grasa (2 - 4% de grasa); y el pámpano es una especie grasa (> 8% de grasa) (21).

En el atún y trucha, se observó un aumento de la concentración de LT en todas las técnicas de cocción en comparación con el pescado crudo, siendo el pescado sofrito el de mayor contenido lipídico en ambas especies. En pámpano los LT aumentaron en tres técnicas. El máximo valor se encontró en empapelado con papel aluminio, con un aumento de 108,8%, seguido de horno de gas con 107,0%; mientras que hubo una reducción de LT significativa en la muestra sofrita, con 68,6% con respecto al crudo.

En la Figura 1 se muestra el efecto de las técnicas de cocción en los LT de las tres especies de pescado. Se observa en general un comportamiento similar entre el atún y la trucha marina, mientras que en el

TABLA 1. Contenido de lípidos totales y ácidos grasos en tres especies de pescado en crudo y sometidas a seis técnicas de cocción

	CR	VA	EA	EP	HG	HM	SO
Atún aleta amarilla							
Lípidos totales	2,40 ^c	2,49 ^c	3,29 ^b	3,07 ^{bc}	3,07 ^{bc}	2,49 ^c	4,22 ^a
AGS	109,76 ^a	114,17 ^b	72,10 ^c	57,91 ^d	375,80 ^e	47,95 ^f	522,34 ^g
AGMI	54,74 ^a	35,31 ^d	39,98 ^{de}	21,33 ^d	147,96 ^c	32,68 ^d	658,00 ^b
AGPI	123,64 ^c	99,89 ^e	114,98 ^e	75,60 ^d	581,57 ^c	144,43 ^b	799,56 ^a
AGPIIn-3	108,38 ^a	87,86 ^a	101,03 ^a	63,30 ^e	533,09 ^d	115,86 ^c	655,46 ^b
AGPIIn-6	13,93 ^{bc}	11,64 ^c	13,21 ^c	11,91 ^c	48,49 ^b	13,85 ^{bc}	144,10 ^a
EPA+DHA	106,70 ^a	87,37 ^a	99,78 ^a	63,04 ^b	533,09 ^c	113,74 ^d	651,14 ^c
Trucha marina							
Lípidos totales	1,40 ^c	2,96 ^{ab}	3,04 ^{ab}	2,68 ^b	1,84 ^d	2,09 ^e	3,83 ^a
AGS	372,73 ^{ab}	434,74 ^{ab}	354,43 ^{ab}	353,95 ^{ab}	233,65 ^a	426,67 ^{ab}	604,55 ^b
AGMI	253,01 ^{ab}	246,17 ^{ab}	170,66 ^{ab}	140,16 ^a	147,48 ^{ab}	183,02 ^{ab}	996,33 ^b
AGPI	497,14 ^{ab}	479,27 ^{ab}	299,96 ^{ab}	547,32 ^a	263,18 ^{ab}	287,10 ^{ab}	762,34 ^a
AGPIIn-3	426,34 ^a	404,70 ^a	250,33 ^a	486,52 ^a	232,00 ^a	250,19 ^a	536,63 ^a
AGPIIn-6	74,22 ^{ab}	73,33 ^{ab}	49,97 ^{ab}	52,09 ^{ab}	31,18 ^{ab}	27,63 ^a	222,84 ^{ab}
EPA+DHA	422,19 ^a	399,86 ^a	243,46 ^a	486,03 ^a	220,20 ^a	247,35 ^a	527,43 ^a
Pámpano							
Lípidos totales	12,56 ^{dc}	13,14 ^d	13,67 ^b	12,47 ^{dc}	13,45 ^c	11,11 ^c	3,94 ^a
AGS	1492,96 ^a	1338,69 ^a	1092,38 ^{bc}	1196,48 ^c	1519,78 ^a	1114,82 ^{bc}	256,47 ^b
AGMI	1063,21 ^a	911,04 ^a	760,08 ^{bc}	804,54 ^c	1083,33 ^a	750,91 ^{bc}	332,20 ^b
AGPI	361,07 ^a	365,63 ^a	266,83 ^b	339,39 ^b	357,54 ^a	321,53 ^b	275,55 ^b
AGPIIn-3	241,17 ^a	236,60 ^b	159,92 ^c	207,00 ^c	224,60 ^d	199,41 ^c	117,61 ^c
AGPIIn-6	117,51 ^a	108,89 ^{bd}	90,97 ^c	114,00 ^b	110,12 ^{bd}	100,65 ^d	80,99 ^c
EPA+DHA	230,91 ^a	226,76 ^b	151,00 ^d	196,80 ^d	214,91 ^c	190,01 ^d	110,84 ^c

CR: crudo, VA: al vapor, EA: empapelado con aluminio, EP: empapelado con hoja de plátano HG: horno de gas HM: horno de microondas SO: sofrito AGS: Ácidos grasos saturados AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados EPA: Ácido eicosapentaenoico DHA: Ácido docosahexaenoico. Los valores de ácidos grasos se muestran en mg/100g y de lípidos totales en g/100g. Se presenta la media de tres repeticiones. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

pámpano los LT se comportan de manera diferente, especialmente luego del sofrito.

Ácidos grasos saturados

La Tabla 1 muestra la concentración de AGS. El menor contenido se encontró en atún cocido en horno de microondas, con un 56,3% con respecto al crudo. El contenido de AGS en trucha aumentó en tres técnicas de cocción y el menor valor se encontró en horno de gas, con una disminución de 37,3%. Tanto en atún como en trucha, la mayor concentración se encontró en la muestra sofrita. En cuanto al pámpano, los AGS disminuyeron en todas las técnicas de cocción, ex-

cepto horno de gas. El valor mínimo lo presentó la muestra sofrita, con una pérdida de 82,8% con respecto al valor crudo.

El AGS más abundante en las tres especies fue el C16:0 (ácido palmítico) (Tablas 2, 3 y 4), excepto con la cocción en horno de microondas de la trucha marina, en donde el C6:0 (ácido caproico) fue el AGS más abundante.

Ácidos grasos monoinsaturados

Los AGMI del atún aumentaron en las muestras cocinadas en horno de gas y sofrito (Tabla 1); el menor contenido de AGMI se presentó en la trucha empapelada

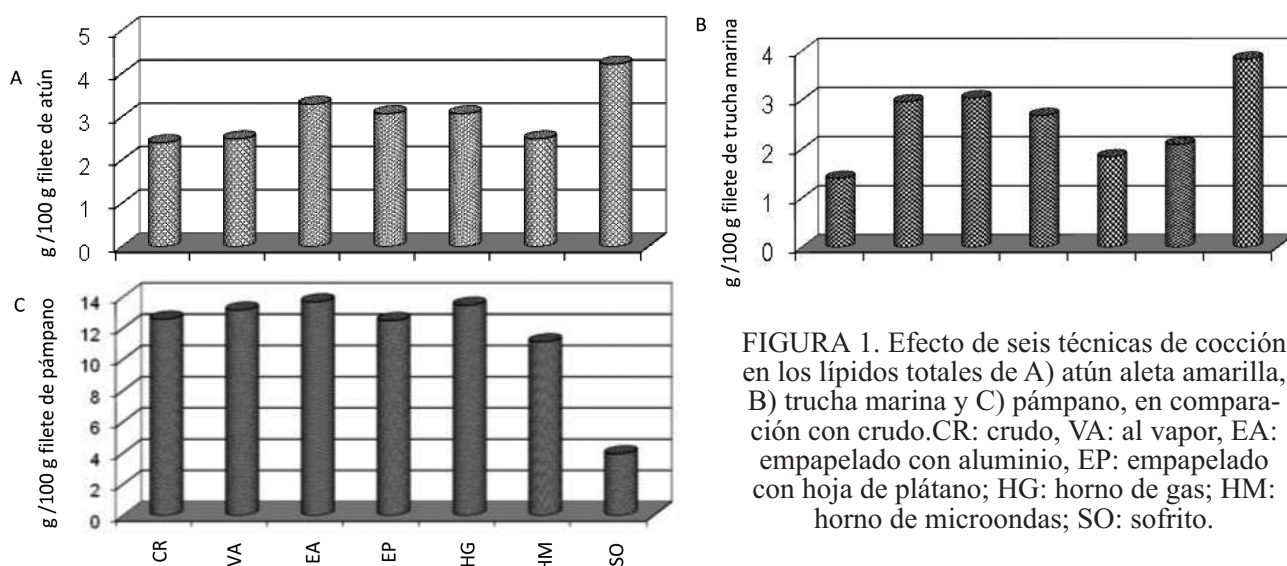


FIGURA 1. Efecto de seis técnicas de cocción en los lípidos totales de A) atún aleta amarilla, B) trucha marina y C) pámpano, en comparación con crudo. CR: crudo, VA: al vapor, EA: empapelado con aluminio, EP: empapelado con hoja de plátano; HG: horno de gas; HM: horno de microondas; SO: sofrito.

TABLA 2. Perfil de ácidos grasos de atún aleta amarilla en crudo y sometido a seis técnicas de cocción, y perfil del aceite Oleico®.

	CR	VA	EA	EP	HG	HM	SO	Aceite Oleico®
C6:0	0,9	3,5	ND	4,9	18,4	10,2	35,5	1
C12:0	0,1	ND	0,4	0,2	ND	ND	2,2	0,1
C14:0	3	3,6	2,2	0,8	7	1,5	16,9	0,4
C15:0	1,1	1,3	0,9	0,4	ND	0,9	1,6	0,1
C15:1	0	ND	0,1	ND	ND	2,1	ND	ND
C16:0	61,3	57,6	39,6	31	212,7	41,8	292,2	25,9
C16:1	12,6	5,4	6,4	2,6	18,8	7,7	31,8	0,7
C17:0	3,5	3	2,6	1,6	10,9	4,3	17,8	0,1
C17:1	1,2	ND	1	1	ND	1	4,5	0,1
C18:0	35,4	44,3	23,6	18,9	116	34,3	151,1	12,1
C18:1n-9 trans	1,7	0,4	0,1	ND	ND	0,2	5,7	ND
C18:1n-9 cis	35,4	31,3	30,2	17,8	129,1	24,2	609,5	419,2
C18:2n-6 trans	0,1	0,1	0	ND	ND	0,1	ND	0,8
C18:2n-6cis	2,3	3,1	2,4	1,6	2,9	1,9	82,2	80,5
C18:3n-6	1,3	0,4	0,1	1	ND	0,1	ND	0,1
C18:3n-3	0,9	0,9	1,1	0,5	ND	1,8	5,9	0,2
C20:0	1,9	0,6	0,7	ND	39,5	1,2	ND	2,2
C20:1	2,9	1,9	2	0,5	ND	2,1	15,9	1,3
C20:2	1,2	0,6	0,6	0,7	ND	0,8	ND	0
C20:3n-3	0,7	ND	0,1	ND	ND	0,2	2,7	0
C20:3n-6	0,6	0,2	0,3	0,6	ND	0,3	ND	0
C20:4n-6	9,4	8,1	10,2	8,8	47	12,2	61,8	ND
C20:5n-3	10,9	13,6	13,9	7,5	56,1	0	88,4	2,3
C21:0	0,7	0,2	0,4	ND	ND	0,5	ND	0
C22:0	0	ND	0,5	ND	ND	0	ND	0
C22:1n-9	0,5	ND	ND	ND	ND	0,4	6,9	0
C22:2	0	ND	0,1	ND	ND	13,8	ND	0,1
C22:6n-3	95,7	73,7	92,7	55,5	476,9	113,7	562,6	0,4
C23:0	0,1	ND	0,1	ND	ND	0	ND	0,4

CR: crudo, VA: al vapor, EA: empapelado con aluminio, EP: empapelado con hoja de plátano HG: horno de gas HM: horno de microondas SO: sofrito ND: no detectado. Los valores se muestran en mg/100g. Se presenta la media de tres repeticiones

TABLA 3. Perfil de ácidos grasos de trucha marina en crudo y sometida a seis técnicas de cocción

	CR	VA	EA	EP	HG	HM	SO
C6:0	8,6	7,2	53,9	76,9	8,8	157,2	41,2
C12:0	9,7	1,2	0,6	3,4	4,8	0,6	1,4
C14:0	13,5	23	22,6	8,8	11,9	4,9	27,6
C15:0	1,7	3,9	2,7	1,3	4,4	10,3	5,8
C15:1	14,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C16:0	196,8	219,9	186,8	176,3	130,2	142,2	346,1
C16:1	63,1	76,5	64	44,2	36,2	32	81,1
C17:0	7,1	8,8	7,5	8,5	6,2	15,1	10,6
C17:1	36,7	2,9	1,7	ND	0,7	9,6	4,5
C18:0	115,3	149,5	102,7	63,7	61,7	94,1	158,9
C18:1n-9 trans	3,6	1,6	ND	ND	13,1	7,8	2,7
C18:1n-9 cis	134,8	146,7	100,3	84,6	89,9	111,8	878,9
C18:2n-6 trans	ND	ND	ND	ND	ND	3,2	ND
C18:2n-6cis	1,8	15,8	11,1	10,5	6,8	9,9	134,7
C18:3n-6	ND	1,1	0,2	2,1	0	1,5	1,2
C18:3n-3	1,3	4,1	6,6	0,9	1,4	2,3	4,3
C20:0	20	6,1	2,5	ND	1,9	2,9	8,7
C20:1	23,5	14,4	3,8	5,5	9,9	8,6	26,3
C20:2	ND	1,2	ND	3,5	ND	3,3	2,6
C20:3n-3	3,4	1,4	0,4	ND	0,8	2,9	4,8
C20:3n-6	16,5	3,6	2,6	0,6	ND	5,1	4,1
C20:4n-6	60,6	52,6	35,7	46,7	27,7	29,1	82,7
C20:5n-3	57,6	112	75,2	110,9	16,1	29,9	85,4
C21:0	ND	0,3	ND	ND	ND	2,2	ND
C22:0	ND	6	ND	17,6	7,3	0,4	ND
C22:1n-9	4,1	3,8	1,2	5,7	8,7	15,9	2,5
C22:2	ND	ND	ND	ND	ND	0,4	0,2
C22:6n-3	364,5	287,8	168,2	375,1	214,7	217,4	441,9
C23:0	3,8	10,1	2,2	ND	ND	4,5	ND

CR: crudo, VA: al vapor, EA: empapelado con aluminio, EP: empapelado con hoja de plátano HG: horno de gas HM: horno de microondas SO: sofrito ND: no detectado. Los valores se muestran en mg/100g. Se presenta la media de tres repeticiones.

con hoja de plátano, cuya concentración también fue la menor en trucha. El contenido de AGMI de trucha disminuyó con todas las técnicas de cocción, excepto en sofrito que presentó un aumento de 281,8% con respecto al crudo. En pámpano, todas las técnicas excepto horno de gas presentaron una disminución en los AGMI; observándose la menor concentración en el sofrito.

El AGMI más abundante en todas las muestras analizadas fue el C18:1n-9cis (ácido oleico)(Tablas 2, 3 y 4).

Ácidos grasos poliinsaturados

En comparación con el atún crudo, se encontró un

aumento de AGPI luego de la cocción en horno de gas, microondas y sofrito, siendo esta última la que presentó mayor concentración. La misma situación se observó en la trucha (Tabla 1); la menor concentración en atún se observó en empapelado con hoja de plátano. El contenido de AGPI en trucha aumentó en empapelado con hoja de plátano y sofrito. La menor concentración se observó en horno de gas, con una disminución de 47,0% con respecto al crudo. El contenido de AGPI en pámpano disminuyó en todas las técnicas de cocción, excepto al vapor. La menor concentración se encontró en empapelado con papel aluminio.

TABLA 4. Perfil de ácidos grasos de pámpano en crudo y sometido a seis técnicas de cocción

	CR	VA	EA	EP	HG	HM	SO
C6:0	0,1	4,1	3,1	0,8	8,4	2,1	0
C12:0	1,1	1,5	1,3	1,6	1	0,7	0,1
C14:0	119,6	108	89,3	92,5	114,2	86,8	15
C15:0	22	23,3	18,1	22,5	21,6	22,7	8,5
C15:1	14,4	11,6	9,5	12,3	12,7	12,3	7,4
C16:0	938,5	836,6	690,6	747,7	952,4	691,4	149,7
C16:1	182,1	184,5	149,2	155	176,2	138,7	51,9
C17:0	36,7	35,4	31,9	34,5	35,9	35,8	8,6
C17:1	13,7	14,6	11,6	13,2	14,2	12,8	7,3
C18:0	352,9	310,6	258,6	278	365,9	255,7	67,5
C18:1n-9 trans	8	6,5	5,3	5,2	8	5,4	1,5
C18:1n-9 cis	767,2	629,5	528,7	560	815,1	518,5	256,1
C18:2n-6 trans	0,6	2,1	3,4	4,7	4,5	2,9	0,3
C18:2n-6cis	18	17,3	17,4	24,1	18,2	12,8	39,9
C18:3n-6	2,3	2,6	2,2	2,4	2,5	1,9	1
C18:3n-3	6,3	5,9	4,9	6,5	6,2	5,3	6,1
C20:0	14,1	13,4	10,5	11,1	14	11	3,1
C20:1	57,3	48,7	39,9	42,8	36	45,6	7,2
C20:2	21,4	17,9	15	16,6	20,6	18,4	2,5
C20:3n-3	9,5	3,8	6,5	7,6	8,6	8,3	2,7
C20:3n-6	3,9	8,2	2,9	3,6	3,5	4	0,6
C20:4n-6	86,7	78,4	63,5	74,9	76	74,5	37
C20:5n-3	64,5	71,5	59,4	58,6	57,5	52,7	42,2
C21:0	1,5	1,5	0,9	1,1	1,4	1,3	0,6
C22:0	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,2	0,6
C22:1n-9	21,1	18,6	15,6	15,7	20,8	17,2	1,5
C22:2	2,6	2,1	1,4	1,7	2,1	3	0,1
C22:6n-3	168	155,2	121,3	138,1	157,4	137,3	68,6
C23:0	2,6	2,4	2,2	1,9	1,3	1,5	0,4

CR: crudo, VA: al vapor, EA: empapelado con aluminio, EP: empapelado con hoja de plátano HG: horno de gas HM: horno de microondas SO: sofrito ND: no detectado. Los valores se muestran en mg/100g. Se presenta la media de tres repeticiones

El AGPI más abundante en las tres especies fue el C22:6n-3 (DHA) (Tablas 2, 3 y 4).

Ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6

El contenido de AGPI n-3 del atún disminuyó en las técnicas al vapor, empapelado con aluminio y con hoja de plátano; sofrito reportó el mayor valor, lo que también se observó en trucha (Tabla 1). El contenido de AGPI n-6 en atún aumentó en horno de gas y en sofrito en 248,1 y 934, 4%, respectivamente; mientras que en las demás técnicas se mantuvo semejante al crudo. En trucha, el contenido de AGPI n-3 aumentó en las técnicas de empapelado con hoja de plátano y

sofrito, y la menor concentración se observó en horno de gas. La concentración de AGPI n-6 en trucha disminuyó en todas las técnicas de cocción excepto en sofrito. El menor valor se encontró en el horno de microondas, mientras que la mayor concentración se observó en la muestra sofrita, con un aumento de 200,2% con respecto al crudo. Las concentraciones de AGPI n-3 y AGPI n-6 de pámpano disminuyeron con todas las técnicas de cocción. El menor contenido de AGPI n-3 y n-6 lo presentó la muestra sofrita.

EPA+DHA

En el atún se redujo la concentración de

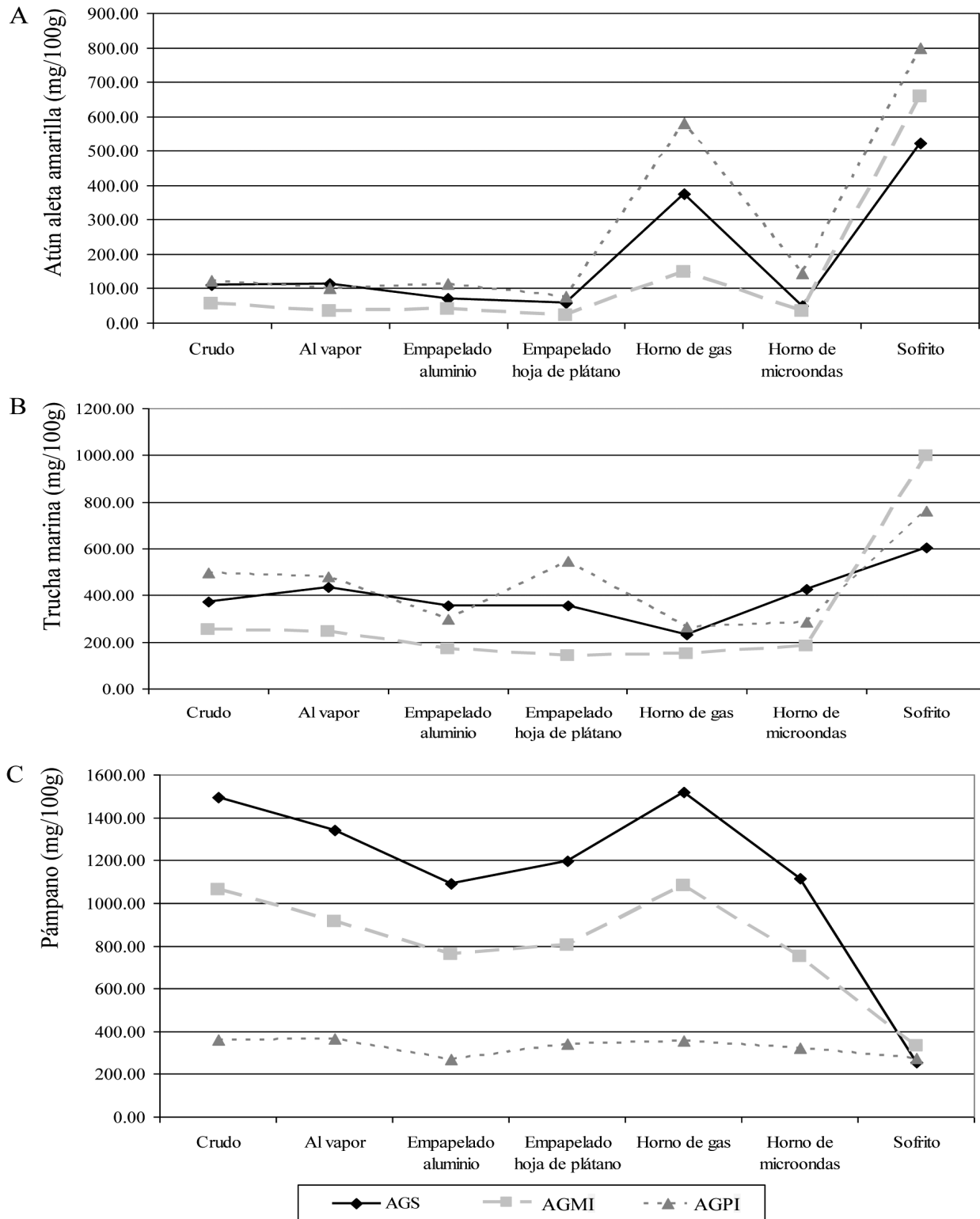


FIGURA 2. Efecto de seis técnicas de cocción en los ácidos grasos de A) Atún aleta amarilla, B) Trucha marina y C) Pámpano, en comparación con los valores en crudo. AGS: Ácidos grasos saturados; AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

EPA+DHA al cocinar las muestras al vapor y empapeladas en aluminio y hoja de plátano, comparadas con el crudo (Tabla 1). Atún y trucha sofritas presentaron los mayores valores. En trucha, la mayor pérdida se observó en horno de gas. La concentración de EPA+DHA en pámpano disminuyó con todas las técnicas de cocción. Sofrito presentó la mayor pérdida, con una disminución del 52,0% con respecto al crudo.

En la Figura 2 se observa el efecto que las técnicas de cocción tuvieron en los AG del atún, trucha y pámpano en comparación con el pescado crudo. Se observa una variación similar del perfil de ácidos grasos en atún y trucha, principalmente en las técnicas de vapor, empapelado con aluminio y sofrito; mientras que el pámpano se comporta de manera diferente en todas las técnicas de cocción.

Perfil de ácidos grasos

El perfil de AG del atún se presenta en la Tabla 2. El AG más abundante en el atún crudo y sometido a las técnicas de cocción, excepto sofrito, fue el DHA. En la muestra sofrita, el ácido graso más abundante fue el oleico (C18:1n-9cis), lo que también ocurrió en trucha y pámpano. En la Tabla 3 se muestra el perfil de AG de la trucha marina, el AG más abundante de esta muestra en crudo fue el DHA, así como en las técnicas al vapor, empapelado con hoja de plátano, horno de gas y microondas, mientras que con la técnica de empapelado con aluminio, el ácido graso más abundante fue el palmítico. En la Tabla 4 se muestra el perfil de AG del pámpano. El ácido más abundante en la muestra cruda y en todas las técnicas de cocción a excepción de sofrito, fue el ácido palmítico (C16:0). Las Tablas 2 y 3 muestran que en el pescado crudo se observó una mayor diversidad de ácidos grasos, mientras que en las técnicas de cocción aplicadas algunos no lograron ser detectados. La técnica que ocasionó la mayor pérdida de ácidos grasos fue horno de gas en el atún y el sofrito en la trucha, lo que no se observó en el pámpano.

DISCUSIÓN

En México, el consumo anual de pescado se encuentra por debajo del mundial y la mayoría de la población no cubre la recomendación de la American Heart Association de ingerirlo 2 veces por semana (6, 22). Las técnicas de cocción a las que se somete el pescado son un factor determinante para su consumo,

pero es necesario conocer el efecto que tienen sobre los nutrientes, ya sea favoreciendo su concentración o pérdida. Se deben recomendar aquellas técnicas que concentren los nutrientes benéficos, tales como los AGP n-3.

Al vapor

Esta técnica aumentó la concentración de LT en las tres especies en comparación con el valor en crudo, pero únicamente aumentó los AGS en atún y en trucha. Disminuyó el resto de los AG en las tres especies, excepto los AGPI del pámpano. Con esta técnica se encontró la menor concentración de AGPI n-6 en el atún y la mayor concentración de AGPI en pámpano (Tabla 1, Figuras 1 y 2). Tanto el atún como la trucha tienen un contenido lipídico similar en crudo, lo cual podría explicar que su comportamiento sea distinto al de pámpano al someterlos a cocción al vapor.

Izquierdo y cols (23) estudiaron el efecto que las técnicas de al vapor y frito tenían sobre *Cynoscion maracaiboensis*, pescado del mismo género que la trucha del presente estudio. El contenido de LT en la muestra cruda fue más elevado que el del presente estudio. Dicho filete crudo presentó 25,53% de AGS y 74,65% de AG insaturados (23), mientras que en el presente trabajo la trucha cruda presentó 33,19% de AGS y 66,81% de AG insaturados; en la trucha al vapor los AGS aumentaron hasta 116,6%, y el resto de los AG presentó una disminución en su concentración, desde 1,19% (AGPI n-6) hasta 5,28% (EPA+DHA). Izquierdo y colaboradores (23) determinaron que esta técnica no produjo cambios significativos en los AG de *C. maracaiboensis*. Lo anterior es similar a lo encontrado en el presente estudio, pues los AG de la trucha al vapor tampoco presentaron diferencias significativas con respecto a los valores en crudo, y únicamente los LT aumentaron significativamente, a pesar de que los valores son distintos a los reportados por Izquierdo y cols.

Empapelado con aluminio y hoja de plátano

Los LT y AG del atún, trucha y pámpano se comportaron de manera similar en la técnica de empapelado con aluminio, la cual concentró ligeramente la cantidad de LT pero disminuyó la de AG en las tres especies, en comparación con los valores en crudo. Mediante esta técnica no hay una pérdida de líquido que resulte en la concentración de nutrientes del alimento. Se encontró

la mayor concentración de LT y el menor contenido de AGPI en pámpano (Tabla 1, Figuras 1 y 2).

El empapelado con hoja de plátano concentró los LT de atún y trucha, mientras que los de pámpano disminuyeron. Todos los AG de atún y pámpano disminuyeron, sin embargo, los AGPI, AGPI_{n-3} y EPA+DHA de la trucha aumentaron su concentración. Dicha técnica presentó la menor concentración de AGMI, AGPI, *n-3* y EPA+DHA en el atún y de AGMI en trucha marina. Existe una pérdida de los ácidos grasos de interés con ambas técnicas de empapelado, lo cual es probable que ocurra debido a una adherencia de éstos tanto al papel aluminio como a la hoja de plátano, mismos que no son raspados para consumirse, y lo cual puede resultar ventajoso para aquellos consumidores que busquen limitar su consumo de AGS, sin embargo, en aquellas personas que deseen aumentar su consumo de AGPI *n-3*, esta técnica no sería la más recomendada pues hay una pérdida de dichos nutrientes.

Horno de gas

Comparados con los valores en crudo, los LT de todas las especies aumentaron. Se concentraron los AGS y AGMI de pámpano, y todos los AG de atún. En la trucha disminuyó la concentración de todos los AG. Con esta técnica se encontraron los niveles más elevados de AGS y AGMI en pámpano, y la concentración más baja de todos los AG (excepto AGMI) en trucha (Tabla 1, Figuras 1 y 2). Este método implica pérdida de humedad para el alimento (10), lo que explica la concentración de algunos de los nutrientes estudiados. Por otro lado, la disminución de ciertos AG puede deberse al efecto que el calor ejerce sobre ellos.

Estudios anteriores (10, 13, 14) han analizado el efecto de distintas técnicas de cocción en especies de pescado como la tilapia *Oncorhynchus mykiss* y la sardina *Sardinops sagax*, de contenido lipídico similar al atún del presente estudio (3,4 y 4% de grasa, respectivamente) (10, 15). Al someter al atún a la cocción en horno de gas, todos los componentes nutricionales analizados se concentraron, desde 127,9% (LT) hasta 499,6% (EPA+DHA). Los presentes resultados concuerdan con el estudio de Gokoglu y cols (10), en el cual el contenido lipídico de *O. mykiss* aumentó en un 180,0%.

En el pámpano cocinado en horno de gas aumentó el contenido de LT, AGS y AGMI, en comparación

con los valores en crudo, desde 101,8% hasta 107,0%. El resto de los AG analizados disminuyó desde 0,9% hasta 6,93%. Gall y cols (14) analizaron el efecto de cuatro técnicas de cocción en *Trachinotus carolinus*. En dicho estudio (14) se encontró que al hornear filetes de *T. carolinus* no hubo alteraciones significativas en sus AG, mientras que en el presente se encontraron diferencias entre esta técnica y crudo para AGS, AGMI, AGPI, AGPI_{n-3} y EPA+DHA, lo cual puede deberse a diferencias entre la técnica de cocción de los estudios, así como factores relacionados con la especie, tales como época de captura, género, edad, entre otros. Por ello, es importante continuar evaluado el efecto que diferentes técnicas de cocción ejercen en distintas especies de pescado, para generar conocimiento más específico que pueda ser aplicado por la población que consume dicho alimento.

Horno de microondas

Con la técnica de horno de microondas aumentaron los LT del atún y la trucha, pero disminuyeron los del pámpano en comparación con los valores crudos. Dicha técnica disminuyó la concentración de todos los AG en pámpano, de los AGS, AGMI y AGPI_{n-6} en atún; y de todos los AG, excepto los AGS, de trucha marina. Dicha técnica presentó la menor concentración de AGS del atún (Tabla 1, Figuras 1 y 2). Dichos resultados demuestran que a pesar de que se aplique una misma técnica de cocción, la concentración o pérdida de los nutrientes varía de acuerdo a cada especie.

Izquierdo et al. (12) analizaron el efecto que tuvieron tres técnicas de cocción sobre la composición proximal y los AG del atún (*Thunnus thynnus*), especie del mismo género que la del presente trabajo. Estos autores recomiendan esta técnica ya que mantiene elevadas concentraciones de AGPI_{n-3}, lo cual también se observó en el presente estudio, en el cual también se encontró una disminución de los AGS, lo que convierte al horno de microondas en una adecuada técnica de cocción para el atún.

En el atún cocinado en horno de microondas se concentraron los AGPI, AGPI_{n-3} y EPA+DHA (desde 3,7 hasta 16,8%), mientras que el contenido de AGS, AGMI y AGPI_{n-6} disminuyó desde 0,5 hasta 56,3%. En el estudio de Gokoglu y cols se encontró un aumento de 131,0% en los LT de *O.*

mykiss, porcentaje mayor al encontrado en el presente trabajo (10). Izquierdo y cols (12) encontraron que el microondas produjo un aumento de 265,1% en los LT, porcentaje mayor al encontrado en el presente. Los AGS de la especie analizada por Izquierdo et al. (12) aumentaron en un 102,9%, los AGMI en un 108,5%, y los AGPI y AGPIIn-3 disminuyeron en un 18,8%; resultados distintos a los de este estudio, debido posiblemente a diferencias en la técnica de cocción y a la diferencia de especie del pescado.

El horno de microondas aumentó la concentración de AGS de trucha y el resto de los AG presentó una disminución desde 27,6% hasta 42,2%. Estudios llevados a cabo en *O. mykiss* (13, 24), encontraron que el microondas no produce cambios significativos en los AG en comparación con otras técnicas de cocción, aunque sí se encontró un aumento de éstos en comparación con la muestra cruda (13). Sahin y cols (24) encontraron que la mayor parte de los AG de la trucha no se pierde durante la cocción en el horno de microondas y recomiendan esta técnica para la trucha, cocinada por 20 segundos y a 60% de potencia del horno de microondas. Según los resultados del presente estudio, cocinar el pescado a potencia regular por 2 minutos implica pérdida de algunos AG, por lo cual no sería la técnica de cocción más recomendada para dicha especie.

En el pámpano se encontró una pérdida en todos los componentes estudiados desde 11,54% (LT) hasta 25,33% (AGS). Gally cols (14) concluyeron que los AG de pámpano no se modifican significativamente al cocinarlo con dicha técnica. En el presente estudio el comportamiento de los nutrientes analizados sí tuvo modificaciones significativas, aunque en menor medida que las otras técnicas de cocción en pámpano.

Sofrito

En el presente trabajo se utilizó el aceite marca Oleico® cuyo perfil de ácidos grasos se presenta en la Tabla 2. El AG más abundante en dicho aceite fue el oleico, con un valor de 419,29 mg/100 g. Con el sofrito aumentaron los LT y todos los AG del atún y trucha, mientras que lo contrario se observó en pámpano (Tabla 1, Figuras 1 y 2), única especie grasa del presente estudio.

Cuando el atún fue sofrito todos sus componentes aumentaron, desde 175,8% (LT) hasta más de 1200,0% (AGM). En el trabajo de Gokoglu et al. (10),

al freír *O. mykiss* su contenido de LT aumentó en un 369,1%; similar a lo encontrado en el estudio de Candela y cols (15), donde al freír *S. pilchardus* su contenido de LT se concentró en un 332,5% con respecto al valor en crudo. En el mismo estudio (15) se encontró una disminución en el contenido de AGS (de 272,0 hasta 143,3 mg/100g) después de freír el pescado; mientras que el contenido de AGMI y AGPI aumentó en un 118,8% y 185,3%, respectivamente; porcentajes menores a los encontrados en el presente estudio, los cuales pueden deberse a la diferencia de las especies analizadas. En el estudio de Izquierdo y cols (12) con dicha técnica, el contenido lipídico aumentó en un 347,7%, los AGS disminuyeron en un 26,2%, los AGMI disminuyeron un 18,4%, los AGPI aumentaron en un 154,8% y los AGPIIn-3 disminuyeron en un 27,4%, contrario a lo que sucedió en el presente, pues aumentaron todos los componentes. Es importante mencionar que debido a la adición de aceite al sofreír, las concentraciones de AG del pescado dependerán en gran medida del tipo, marca y cantidad de aceite utilizado, lo que puede explicar las diferencias con otros estudios.

Con el sofrito aumentaron todos los componentes de la trucha en comparación con el valor crudo. En el estudio de Izquierdo y cols (23), la trucha *C. maracai-boensis* frita presentó una mayor concentración de AGS que de insaturados (68,18 y 31,82%, respectivamente). En el presente estudio la muestra sofrita presentó un 25,58% de AGS y 74,41% de AG insaturados. Según MnariBhoury y cols (4), el aumento en los componentes nutricionales (tanto lípidos totales como AG) al freír, se debe a la adición del aceite que se utiliza en esta técnica. Estos cambios se deben a la absorción de grasa del medio, pérdida de humedad, cambios químicos en moléculas liposolubles del pescado y generación de radicales libres en el aceite caliente.

Cuando el pámpano fue sofrito, todos los componentes analizados disminuyeron, desde 23,6% (AGPI) hasta 82,8% (AGS). De acuerdo con Gall y cols, a mayor contenido lipídico de la especie, menor será su absorción de AG al freírla (14). Lo anterior explica los resultados obtenidos en el pámpano sofrito, pues es la especie con mayor contenido lipídico en crudo y al sofreírla no se presentó el mismo comportamiento que en los otros dos pescados (Figura 2). En la Figura 2A y 2B se observa un claro aumento de los componentes nutricionales analizados con la técnica de sofreído,

mientras que en la Figura 2C se observa una disminución de los mismos.

CONCLUSIÓN

Las especies de pescado se comportaron de manera distinta cuando se sometieron a las diversas técnicas de cocción, variando en su tipo y cantidad de ácidos grasos, dependiendo en gran medida del contenido graso del pescado. Considerando los ácidos grasos, el sofrito fue la técnica que mayor impacto tuvo en ellos al concentrarlos de manera considerable en atún y trucha (magras) y disminuyéndolos en el pámpano (graso).

Para la cocción del atún aleta amarilla se recomiendan las técnicas de empapelado con aluminio y horno de microondas, ya que disminuye los AGS de la especie y su contenido de AGPI ω -3 es de alrededor de 100mg/100g de filete, considerado como buen aporte de dicho nutriente. Para la trucha marina la técnica recomendada es empapelado con hoja de plátano, pues disminuye los AGS y proporciona una concentración de AGPI ω -3 >485mg/100g, lo que la convierte en una excelente fuente de dichos ácidos grasos. En cuanto al pámpano, todas las técnicas son recomendadas excepto horno de gas, pues aumenta el contenido de LT y AGS.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Jorge Toral, de La Nueva Vega, por el apoyo con las especies de pescado.

REFERENCIAS

- Pirini M, Testi S, Ventrella V, Pagliarani A, Badiani A. Blue-black fish: Fatty acid profile in selected seasons and retention upon baking. *Food Chem.* 2010; 123:306-314.
- Mozaffarian D, Lemaitre RN, Kuller LH, Burke GL, Tracy RP, Siscovick DS. Cardiac benefits of fish consumption may depend on the type of fish meal consumed. The Cardiovascular Health Study. *Circulation.* 2003; 107:1372-1377.
- Kris-Etherton, P.M., Harris, W. S., Lawrence, J. Nutrition Committee. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.* 2002; 106:2747-2757.
- MnariBhouri A, Fekih S, HarzallahHanene J, Madiha D, Imen B, ElCafsi M, Hammami M, Chaouch A. Antioxidant property of wild and farmed sea bream (*Spaurusaurata*) cooked in different ways. *Afr J Biotechnol.* 2011; 10:19623-19630.
- Kocatepe D, Turan H, Taskaya G, Kaya Y, Erden R, Erdogu F. Effects of cooking methods on the proximate composition of black sea anchovy (*Engraulisencrasicolus*, Linnaeus 1758). *GIDA.* 2011; 36:71-75.
- Lichtenstain AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, et al. Diet and lifestyle recommendations Revision 2006: A scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation.* 2006; 114: 82 – 96.
- Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S, Hutg P, Moriarty K, Fishell V, Hargrove RL, Zhao G, Etherton TD. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71:179S-188S.
- Passi S, Cataudella S, Di Marco P, De Simone F, Rastrelli L. Fatty acid composition and antioxidant levels in muscle tissue of different Mediterranean marine species of fish and shellfish. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 7314-7322.
- Al-Saghir A, Thurner K, Wagner KH, Frisch G, Luf W, Razzazi-Fazeli E, et al. Effects of different cooking procedures on lipid quality and cholesterol oxidation of farmed salmon fish (*Salmosalar*). *J Agric Food Chem.* 2004; 52:5290-5296.
- Gokoglu N, Yerlikaya P, Cengiz E. Effects of cooking methods on the proximate composition and mineral contents of rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*). *Food Chem.* 2004; 84:19-22.
- Kaya Y, Turan H, Erdem ME. Fatty acid and amino acid composition of raw and hot smoked sturgeon (*Husohuso*, L. 1758). *Int J Food Sc Nutr.* 2008; 59:635-642.
- Izquierdo P, Torres G, Allara M, Barros J, Delgado P, Añez J. Efecto de tres métodos de cocción en la composición proximal y el perfil de ácidos grasos del atún (*Thunnusthynnus*). *Rev Cient.* 2001; 11:367-372.
- Unusan N. Change in proximate, amino acid and fatty acid contents in muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) after cooking. *Int J Food Sci Tech.* 2007; 42:1087-1093.
- Gall KL, Otwell WS, Koburgier JA, Appledorf H. Effects of four cooking methods on the proximate, mineral and fatty acid composition of fish fillets. *J Food Sc.* 1983; 48:1068-1074.
- Candela M, Astiasarán I, Bello J. Deep-fat frying modifies high-fat fish lipid fraction. *J Agric Food Chem.* 1998; 46:2793-2796.
- Chávez VA, Pérez-Gil RF, eds. Composición de alimentos. Valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo. 2nd. ed. Mexico: McGraw Hill; 2010.
- Castro-González MI, Miranda-Becerra D. El pescado en la dieta del paciente renal: relación fósforo:ácidos

- grasos n-3. *RevInvestClin*. 2010; 62: 44-53.
18. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
 19. Castro-González MI, Maafs-Rodríguez AG, Pérez-Gil Romo F. Evaluación de diez especies de pescado para su inclusión como parte de la dieta renal, por su contenido de proteína, fósforo y ácidos grasos. *Arch Latinoamer Nutr*. 2012; 62:127-136.
 20. Systat Software. SigmaPlot 11.0. [CD-ROM] San Jose, California, EUA. Programa computacional.
 21. Nurnadia AA, Azrina A, Amin I. Proximate composition and energetic value of selected marine fish and shellfish from the West coast of Peninsular Malaysia. *Int Food Res J*. 2011; 18: 137-48.
 22. Departamento de Pesca y Acuicultura. FAO Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Perfiles sobre la pesca y acuicultura por países. 2001. Internet. Recuperado el 8 de mayo de 2012 en el sitio web: http://www.fao.org/fishery/countrysector/FI-CP_MX/es
 23. Izquierdo P, Ferrari G, González E, Barboza Y, Márquez Salas EJ, Allara M. Efecto de dos tipos de cocción sobre la composición química y perfil de ácidos grasos de filetes de corvina (*Cynoscion maracaibensis*). *Rev Cient*. 1999; 9:367-371.
 24. Sahin S, Sumnu G. Effects of microwave cooking on fish quality. *Int J Food Prop*. 2001; 4:501-512.

Recibido: 08-02-2013

Aceptado: 06-06-2013

Antioxidant capacity, phenolic acids and caffeine contents of some commercial coffees available on the Romanian market

Ion Trandafir, Violeta Nour, Mira Elena Ionica

Department of Chemistry, Sciences Faculty, University of Craiova, Craiova, Romania;
Department of Horticulture & Food Science, Agriculture & Horticulture Faculty,
University of Craiova, Craiova, Dolj, Romania

SUMMARY. In the present study a simple and highly sensitive RP-HPLC method has been established for simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid and caffeine in coffee samples. The method has been applied to eight different coffees available on the Romanian market which were previously analysed concerning the total polyphenols content and antioxidant capacity. Reduction of the DPPH radical was used to determine the antioxidant capacity of the coffee extracts while the total polyphenols content was determined by spectrophotometry (Folin Ciocalteu's method). The total polyphenols content ranged from 1.98 g GAE/100 g to 4.19 g GAE/100 g while the caffeine content ranged from 1.89 g/100 g to 3.05 g/100 g. A large variability was observed in chlorogenic acid content of the investigated coffee samples which ranged between 0.6 and 2.32 g/100 g.

Key words: Phenolic acids, caffeine, HPLC, antioxidant capacity, coffee

RESUMEN. Capacidad antioxidante, contenido de ácidos fenólicos y cafeína de algunos tipos de café disponibles en el mercado de Rumania. En este trabajo, un método sensible RP-HPLC fue desarrollado para la determinación simultánea del ácido clorogénico, del ácido cafeico, del ácido vanílico y de la cafeína en las pruebas de café. El método fue aplicado para analizar ocho tipos de café disponibles en el mercado de Rumania, que fueron analizados también en cuanto al contenido total de polifenoles y la capacidad antioxidante. La reducción del radical DPPH fue utilizada para determinar la capacidad antioxidante de los extractos de café mientras que el contenido total de polifenoles fue determinado por la espectrofotometría (método Folin Ciocalteu). El contenido total de polifenoles se situó entre 1,98 g GAE/100 g y 4.19 g GAE/100 g mientras que el contenido de cafeína se situó entre 1.89 g/100 g y 3.05 g/100 g. Una gran variabilidad se observó con respecto al contenido de ácido clorogénico en las pruebas de café analizadas, contenido que se situó entre 0.6 y 2.32 g/100 g.

Palabras clave: Ácidos fenólicos, cafeína, HPLC, capacidad antioxidante, café

INTRODUCTION

Coffee has been one of the most popular beverages all over the world, and its consumption continues to increase (1). An interesting characteristic of coffee brews is that they have been consumed mainly for pleasure, without concern about the nutritional value (2).

Coffee is a well-known and extensively utilized psychotropic agent with effects on mood, cognitive performance, and motor activity. In fact, many investigators have shown that caffeine, one

of the main constituents of coffee, has a variety of pharmacological and cellular responses in a wide spectrum of biological systems. These include stimulation of the central nervous system and cardiac muscle, increased urinary output, and relaxation of smooth muscle (3). Research has suggested that caffeine can be a potential contributor to reducing risk factors involved in the metabolic syndrome, including type 2 diabetes mellitus and obesity, and symptoms associated with Parkinson's disease (4). However, its stimulatory effects may also adversely affect sensitive individuals by causing tachycardia, increase of blood pressure, anxiety, and insomnia (5).

Besides its stimulant effect, coffee has properties to prevent the deleterious actions of free radicals and viral infections (6). In various biological tests, the water extract of coffee showed superoxide anion-scavenging effects, inhibitory activity of lipid peroxidation, and suppression of hepatitis B virus surface antigen. These biological activities are closely related to the presence of caffeic acid derivatives, especially chlorogenic acids (7). Coffee is the major source of chlorogenic acid in the human diet. On the basis of 10 g of coffee per cup of brew, a cup contains 15–325 mg of chlorogenic acids; daily intake of coffee drinkers is 0.5–1.0 g, whereas coffee abstainers typically ingest < 100 mg/day (8, 9). Few free phenolic acids are present in coffee, although small quantities of caffeic, ferulic, and vanillic acids have been detected (10), the amount of the latter compound increasing in the medium- and dark-roasted samples (9). Data have been published regarding the ability of chlorogenic acids metabolites, such as ferulic, isoferulic, or vanillic acids, to exert radical scavenging activity (10, 11).

The concentration of highly active polyphenols in green coffee beans is influenced by the species and its origin while in coffee beverages it depends on the brewing procedure. During roasting phenolic compounds are partially degraded and/or bound to polymer structures depending on roasting conditions while other antioxidant compounds, such as Maillard and Strecker reaction products, are developed enhancing overall antioxidant properties (12 - 14). A positive but nonlinear relationship was found for the amount of chlorogenic acids that remained after roasting and antioxidant activity of beans. Multiple studies suggest that melanoidins are responsible for the strong antioxidant properties exhibited by roasted coffee beverages (15).

Various analytical methods have been used for the determination of phenolic compounds (chlorogenic acid and its derivatives) and caffeine in coffee beans and other plants. The most widely used methods are HPLC (2, 5, 8, 15, 16) but UV-VIS spectroscopy (17), gas chromatography after derivatization (18), capillary electrophoresis (19) and micellar electrokinetic chromatography (20) were also used.

In this contribution a simple RP-HPLC method was developed and validated for the simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid and caffeine in commercial coffee samples. The method was applied to quantify these compounds in va-

rious commercial coffees. Also, we report the antioxidant activity and total polyphenols content of these coffee samples. The purpose was to provide simple methods in order to evaluate some important characteristics which define the quality of the commercial coffees entering the Romanian market and to establish the dietary intake of bioactive compounds in these products.

MATERIALS AND METHODS

Samples

A total of eight different brands of coffee were considered for inclusion in our study: five roasted ground coffee samples, vacuum packaged, and three roasted coffee beans samples. Three batches of each brand were purchased in commercially available size from local supermarkets and composite samples were prepared for analysis.

Chemicals and reagents

For the determination of the total phenolic content, the Folin-Ciocalteu reagent (2 N, Merck), gallic acid (99% purity, Sigma), anhydrous sodium carbonate (99% purity, Sigma) were used. For the determination of the antioxidant activity, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich), ascorbic acid and methanol (Merck) were employed.

For the HPLC analysis, chlorogenic acid (>95%), caffeic acid (>98%), vanillic acid (>97%), and caffeine (>99%) standards were purchased from Sigma-Aldrich. HPLC-grade methanol, orthophosphoric acid and acetonitrile were from Merck. The water used was ultrapure, SG-Water system.

Preparation of coffee extracts

Coffee beans were ground to a powder. Five grams coffee powder were mixed with 50 mL of water at 100°C and left for 15 min. The resulting coffee brews were filtered. Filtrates were tightly closed and stored at 4°C prior to analysis. For all the analysis samples were run in triplicate.

Determination of total polyphenols

The total polyphenols content was determined by spectrophotometry (UV-VIS Evolution 600) according to the Folin-Ciocalteu's method. Briefly, 1 mL of diluted extract (1:20) was transferred in duplicate to se-

parate tubes containing 1 mL ultrapure water and then 5 mL of Folin-Ciocalteu' reagent (diluted 1:10) were added. After 2 min, 4 mL of sodium carbonate solution (7.5% w/v) were added. The tubes were then allowed to stand at room temperature for 120 min before absorbance at 765 nm was measured against ultrapure water. The total polyphenols content was expressed as g of gallic acid equivalents (GAE)/100 g material. The concentrations of polyphenols in samples were derived from a standard curve of gallic acid ranging from 50 to 250 mg/mL.

Determination of antioxidant activity

The antioxidant activity of coffee extracts was measured in terms of hydrogen-donating or radical scavenging ability, using the stable radical DPPH. 2.95 mL of methanolic solution of DPPH (0.004%, w/v) were added to 50 μ L of extract and shaken vigorously. The tubes were allowed to stand in darkness at 20°C for 30 min. The decrease in absorbance at 517 nm was determined after 30 min in an Evolution UV-VIS 600 spectrophotometer (zeroed on pure methanol). Radical scavenging activity was expressed as the inhibition percentage and was calculated using the following formula:

Radical scavenging activity (%) = $[1 - A_s/A_0] \times 100$, where A_s is the absorbance of the sample (i.e., extracts) and A_0 is the absorbance of the DPPH solution.

Determination of chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid and caffeine by HPLC

HPLC was performed by using a Surveyor Thermo Electron system including vacuum degasser, Surveyor Plus LCPMP pump, Surveyor Plus ASP autosampler, PDA5P diode array detector with 5 cm flow cell and Chrom Quest 4.2 system manager as data processor. Separation was achieved by a reversed-phase DS Hypersil C18 column (5 μ m particle size, 250 mm \times 4.6 mm). A mobile phase composed of 0.2% orthophosphoric acid/acetonitrile (90:10) in isocratic conditions was used throughout the analysis. The samples were eluted for 16 min at a constant flow rate of 1.0 mL/min and the injection volume was 5 μ L. The column temperature was 20°C and UV detection was carried out at 254 nm for vanillic acid, 275 nm for caffeine and 323 nm for chlorogenic and caffeic acids. Identification was based on the comparison of the spectra obtained between 200-500 nm and the retention time of the un-

known substances in relation to that of pure standards.

The mobile phase was filtered through a polyamide membrane (0.2 μ m) and degassed with an ultrasonic bath DK 102p Bandelin before use. Quantification was achieved by external calibration, using a five-point curve of different dilutions of a standard solution. Calibration curves were constructed for the compounds evaluated at five concentrations ranging from 20 to 120 mg/L for chlorogenic acid and caffeine and from 1.5 to 7.5 mg/L for caffeic and vanillic acids. Each calibration point was the mean of three independent measurements. The coffee extracts were filtered through nylon syringe filter (0.45 μ m) before injection and were analyzed with no other modification than the appropriate dilution to fit the standard curves.

Statistical analysis

Data were expressed as means \pm SD of three independent experiments carried out in triplicate. Data were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) using Statgraphics Centurion XVI software (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, USA). Differences in content levels among the coffee samples were estimated with a multiple range test using the least significant difference (LSD) at $P < 0.05$.

RESULTS

Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid and caffeine in coffee samples

The analytical curves for chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid and caffeine were established from the HPLC output for standard solutions. Each standard solution was injected in triplicate into the HPLC system and the calibration curves were established by plotting peak areas against the corresponding concentrations for each compound. The retention times, regression equations and linear determination coefficients are shown in Table 1. The linearity of calibration curves for all compounds was very good ($r^2 > 0.999$).

Peak areas were checked for repeatability at two concentration levels by injecting the mixed standards solutions into the HPLC system and calculating the relative standard deviation (RSD) for 10 replicate determinations. The repeatabilities of the retention times were below 0.5% while the repeatabilities of peak areas were all below 2%.

TABLE 1 Calibration results for determining chlorogenic, caffeic, vanillic acids and caffeine in coffee brews

Name	λ (nm)	Retention time (min)	Equation	Determination coefficient (r^2)	Limit of detection (mg/L)
Chlorogenic acid	323	10.07	$y = 2.964E-5x + 2.327$	0.9998	0.023
Caffeic acid	323	14.76	$y = 8.47493E-5x + 0.091909$	0.9998	0.028
Vanillic acid	254	13.61	$y = 1.431E-5x + 0.095$	0.9999	0.045
Caffeine	275	9.10	$y = 2.979E-5x + 0.090$	0.9996	0.037

The use of a diode array detector allowed us to confirm the identity of the peak not only by its retention time, but also by the overlay of the UV-VIS spectra with a standard. Figure 1 illustrates the UV-VIS absorption spectra of caffeine, chlorogenic acid, caffeic acid and vanillic acid respectively, measured in methanol in the wavelength range of 200 - 500 nm.

The limits of detection (LODs) of the individual compounds were calculated at their absorbance maxima on the basis of a signal-to-noise ratio of 3 (table 1).

Recovery and repeatability experiments were conducted to evaluate the precision and accuracy of the method. The precision of the method was confirmed by repetitive analyses, calculating the average relative standard deviation (RSD) for 8 replicate determina-

tions. This analysis was repeated over three days. For retention time, RSD values were between 0.065% and 0.233% while for peak areas RSD values ranged between 0.165% and 0.423%.

The recovery was evaluated by adding known amount of a standard solution to a coffee brew sample and by performing six replicates of the sample before and after fortification. The recovery values were $98.2 \pm 0.32\%$ for chlorogenic acid, $100.4 \pm 0.16\%$ for caffeic acid, $96.6 \pm 0.38\%$ for vanillic acid and $99.8 \pm 0.23\%$ for caffeine. RSD of the results for coffee samples were within acceptable limit ($RSD < 2\%$), proving a good precision of the method while the recoveries ranged from 98.2% to 100.4%, proving a good accuracy.

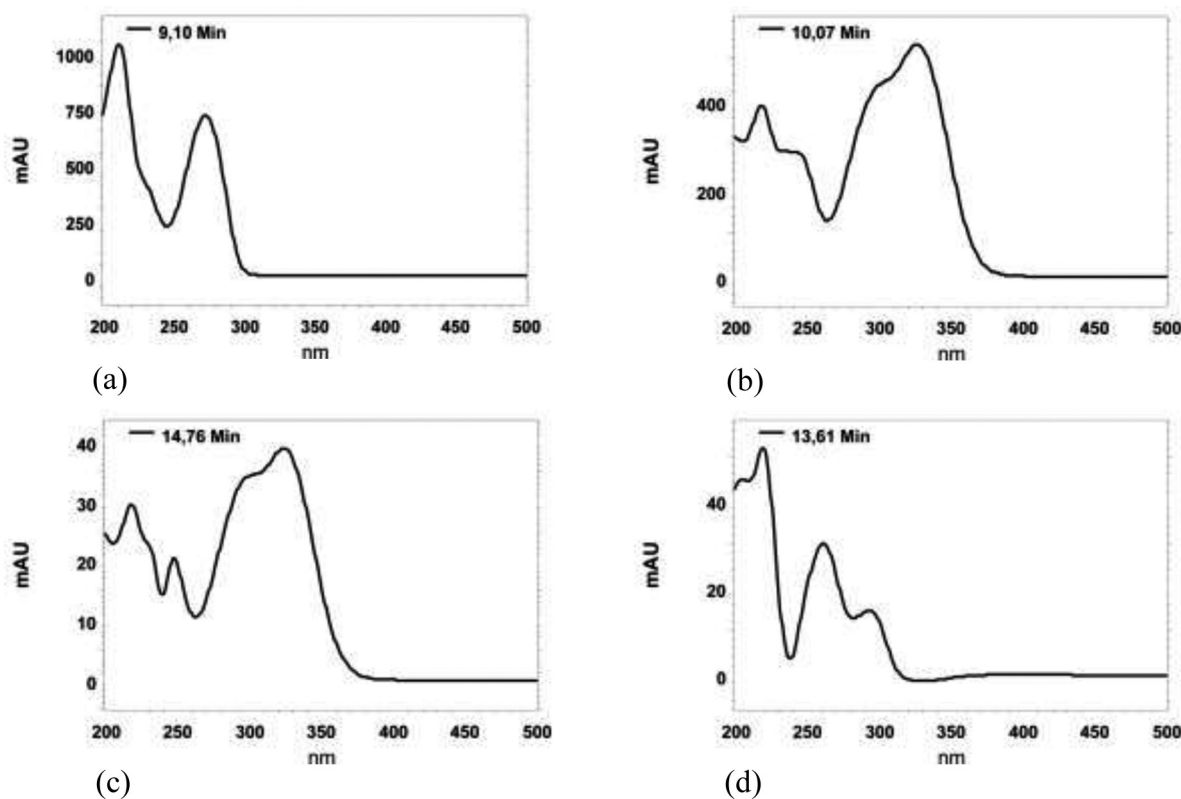


FIGURE 1. Absorption spectra of caffeine (a), chlorogenic acid (b), caffeic acid (c) and vanillic acid (d).

Total polyphenols content

The total polyphenols content of coffee samples investigated in this study varied from 1.98 g/100 g to 4.19 g/100 g (Table 2). Nebesny and Budryn (1) found total polyphenols contents between 2.06 and 3.03 g/100 g in green coffee beans roasted under different conditions. Also, in a study about Indian monsooned coffee (21), the total phenolic content was found to be 3.6 g/100 g in Monsooned Malabar coffee and 4.0 g/100 g in Monsooned Robusta coffee in terms of gallic acid equivalents.

Antioxidant activity of coffee samples

Reduction of the DPPH radical, which is an acceptor of hydrogen atoms from antioxidants, and is thus

converted to DPPH-H, results in a decline in molar absorbency coefficient at 517 nm and a simultaneous change in the color of the solution from purple to yellow. The DPPH radical scavenger activities of the aqueous extracts of coffee samples are presented in table 9.

Content of chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid and caffeine in the aqueous extracts of coffee samples

From the equations in Table 1 and chromatogram peak areas, the concentrations of chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid and caffeine of coffee samples were established (Table 3). Typical chromatograms at $\lambda=254$ nm, $\lambda=275$ nm and $\lambda=323$ nm are shown in Figure 2.

TABLE 2 Total polyphenols content and free radical scavenger activity of various commercial brewed coffees

Coffee	Total polyphenols content (g GAE/100 g)	Radical scavenging activity (%)
Coffee A	3.62 ± 0.21 ^c	85.57 ± 1.73 ^{de}
Coffee B	3.38 ± 0.25 ^c	84.09 ± 1.44 ^{bcd}
Coffee C	4.19 ± 0.34 ^d	89.39 ± 1.62 ^f
Coffee D	3.44 ± 0.20 ^c	87.88 ± 1.28 ^{ef}
Coffee E	3.26 ± 0.18 ^c	84.84 ± 0.92 ^{cd}
Coffee F	1.98 ± 0.21 ^a	79.54 ± 2.13 ^a
Coffee G	2.45 ± 0.17 ^b	81.82 ± 1.69 ^{ab}
Coffee H	2.18 ± 0.14 ^{ab}	82.36 ± 1.26 ^{bc}

Results are presented as mean ± SD (n = 3).

Values in the same column followed by different upper-case letters are significantly different at P < 0.05

DISCUSSION

Roasting is one of the most important factors influencing the phenolic content. Roasted beans appeared to contain less polyphenols than the green ones, since more than 60% of chlorogenic acid present in green coffee is degraded upon roasting (1). Sacchetti *et al.* (14) found that the concentration of total phenolics in brews from different types of coffee decreased linearly with increasing intensity of roasting thermal process. Also, the initial humidity of green beans had a stronger impact on final polyphenol concentration in roasted beans, than the roasting method (1).

A good correlation ($r^2 = 0.85$) was found between total phenolics content of coffee extracts and their an-

TABLE 3 Phenolic compounds and caffeine in various commercial coffees

Coffee	Chlorogenic acid (g/100 g)	Caffeic acid (mg/100 g)	Vanillic acid (mg/100 g)	Caffeine (g/100 g)
Coffee A	2.26 ± 0.20 ^e	9.01 ± 0.80 ^{bc}	1.39 ± 0.07 ^b	2.13 ± 0.15 ^a
Coffee B	1.83 ± 0.09 ^d	11.75 ± 0.56 ^d	1.42 ± 0.10 ^b	1.89 ± 0.20 ^a
Coffee C	2.32 ± 0.17 ^e	14.04 ± 0.63 ^e	1.49 ± 0.08 ^b	2.82 ± 0.12 ^c
Coffee D	2.21 ± 0.15 ^e	11.38 ± 0.88 ^d	nd	2.55 ± 0.08 ^b
Coffee E	0.60 ± 0.08 ^a	7.57 ± 0.42 ^a	2.04 ± 0.16 ^c	3.05 ± 0.17 ^c
Coffee F	0.71 ± 0.12 ^a	8.24 ± 0.71 ^{ab}	nd	2.15 ± 0.12 ^a
Coffee G	1.15 ± 0.12 ^b	11.10 ± 0.91 ^d	1.49 ± 0.09 ^b	1.93 ± 0.16 ^a
Coffee H	1.59 ± 0.11 ^c	9.83 ± 0.62 ^c	1.14 ± 0.04 ^a	1.92 ± 0.19 ^a

Results are presented as mean ± SD (n = 3).

Values in the same column followed by different upper-case letters are significantly different at P < 0.05

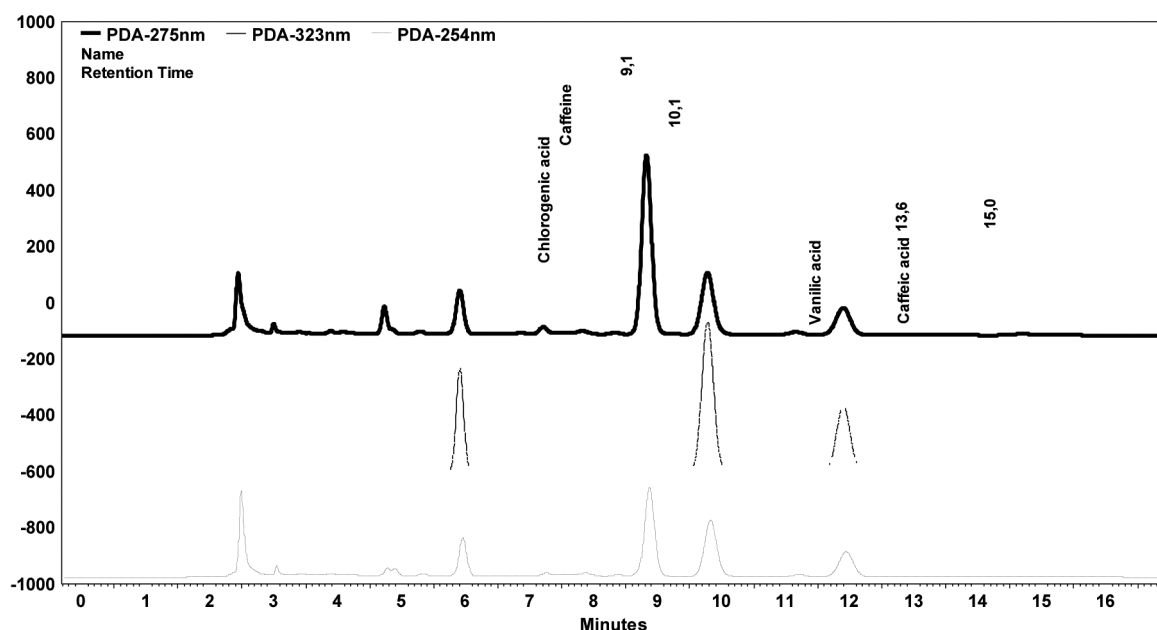


FIGURE 2. Chromatograms of coffee C sample at 254 nm, 275 nm and 323 nm.

tioxidant activity. Previous studies also showed that the antioxidative effectiveness is, to the highest extent, correlated with polyphenols concentration (1). The antioxidant activity changes in brews from medium and dark roasted coffee are negatively influenced by the intensity of thermal process and seem to be much more dependent on roasting severity than on the type of coffee (14). Other factors which influence the free radical scavenging are the roasting method and the humidity of the beans before roasting (1).

Antioxidant activity of coffee samples was not correlated with chlorogenic or caffeic acid content, so other coffee compounds in addition to these phenolic acids are also responsible for the antioxidant activity associated with coffee consumption.

The caffeine content ranged from 1.89 g/100 g to 3.35 g/100 g. These values were consistent with published values. Thus, Nebesny and Budryn (1) found caffeine contents between 1.82 and 2.08 g/100 g in green coffee beans roasted under different conditions. Similar results were obtained by Daglia et al. (22), that detected 1.8–3.0% caffeine in green beans, 1.7–2.1% in medium roasted beans, and 1.6–1.9% in strongly roasted ones and by Farah et al. (5) that reported caffeine content in regular coffees around 2.54–3.33%.

Chlorogenic acids have an important role in determining coffee beans quality and beverage taste and are

a key contributor to the antiperoxy radical activity of coffee brews. Previous studies demonstrated that there is a loss of chlorogenic acids during roasting. The higher the roasting degree the lower is the content of chlorogenic acids (12). Budryn et al. (16) found that concentration of chlorogenic acids in dark roasted Robusta was 14-fold lesser than in green beans whereas in Arabica it was about fivefold lesser. Abebe Belay and Gholap (17) found 4.09–5.34%, 3.83–4.77% and 3.01–3.63% chlorogenic acids in coffee roasted at light, medium and dark temperature respectively, and they concluded that there is a significant decline in chlorogenic acids content as the roasting temperature increases. In our study, a large variability was observed in chlorogenic acid content of the coffee samples which ranged between 0.6 and 2.32 g/100 g, suggesting that these coffee beans were roasted under dark or very dark conditions. The richest coffees were those that registered also the highest total polyphenols content. The results were in good agreement with the previous reports about the antioxidants of coffee. Thus, Votavová et al. (8) found concentrations of chlorogenic acid between 0.4 and 2.8 g/100 g, while Farah et al. (13) found levels of 1.0–3.4 g/100 g in coffee samples with different roasting degree. Fujioka and Shibamoto (23) also found chlorogenic acids contents between 0.53 and 1.71 g/100 g in various commercial

brewed coffees.

Caffeic acid is a bitter taste compound, which is usually found in small quantities in the processed arabic coffee. Caffeic acid elicits several interesting and various biological responses, such as antibacterial, anti-fungal, anti-inflammatory, antiviral, anticancer, antioxidant, antimutagenic, and anti-diabetic activities (24). Coffee samples evaluated in our study recorded caffeic acid content between 7.57 and 14.04 mg/100 g. These results are in agreement with those obtained by Chu et al. (19) who found 11.48 mg/100 g in a coffee sample using capillary electrophoresis with amperometric detection. Murthy and Manonmani (21) found higher levels of caffeic acid, specifically 20 mg/100 g in Monsooned Malabar coffee and 40 mg/100 g in Monsooned Robusta coffee. The increased levels of free caffeic acid was attributed to the hydrolysis of chlorogenic acid during the curing of this type of speciality coffee by exposing them to moist monsoon winds prevailing in the coastal regions of Mangalore and Tellichery.

Considering the results of vanillic acid content, the highest level was registered in coffee E (2.04 mg/100 g) which was significantly higher in comparison with the values determined in the other coffees. Vanillic acid was not detected in two coffee samples.

CONCLUSIONS

Coffee supplies a health-promoting mixture of phytochemicals such as natural antioxidants, which may contribute to the numerous health benefits associated with its consumption. The data presented in this work show the presence of phenolic compounds and caffeine in substantial quantities in coffee samples and provide evidence for the antioxidant potential of commercial coffees and their extracts. However, our results have shown the great variability in the bioactive components content of commercially available coffee brands. The concentration of these substances seems to vary considerably, since it depends on diverse factors, such as species and variety, the degree of maturation, and to some extent environmental conditions and agricultural practices. Processing, especially roasting, modifies dramatically the phenolic composition of coffee, producing aroma, flavor and color compounds characteristics of coffee beverage. The reversed-phase HPLC method developed and validated

in this work for the simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid, vanillic acid and caffeine in coffee samples will contribute to the quality control of commercial coffees.

REFERENCES

1. Nebesny E, Budryn G. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. *Eur Food Res Technol* 2003; 217: 157–163.
2. Moreira RF, Trugo LC, De Maria CA, Matos AG, Santos SM, Leite JM. Discrimination of Brazilian arabica green coffee samples by chlorogenic acid composition. *Arch Latinoam Nutr* 2001; 51: 95–99.
3. Yukawa GS, Mune M, Otani H, Tone Y, Liang X-M, Iwahashi H, Sakamoto W. Effects of coffee consumption on oxidative susceptibility of low-density lipoproteins and serum lipid levels in humans. *Biochem (Moscow)* 2004; 69: 70–74.
4. Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine): A comprehensive review on consumption, functionality, safety and regulatory matters. *J Food Sci* 2010; 75: R77–R87.
5. Farah A, Monteiro MC, Calado V, Franca AS, Trugo LC. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chem* 2006; 98: 373–380.
6. Namba T, Matsuse T. A historical study of coffee in Japanese and Asian countries. Focusing the medicinal uses in Asian traditional medicines. *Jap J Hist Pharm* 2002; 37: 65–75.
7. Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006; 46: 101–123.
8. Votavová L, Voldřich M, Ševčík R, Čížková H, Mlejnecká J, Stolař M, Fleišman T. Changes of antioxidant capacity of Robusta coffee during roasting. *Czech J Food Sci* 2009; 27: S49–S52.
9. Castillo MD, Ames JM, Gordon MH. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3698–3703.
10. Gómez-Ruiz JÁ, Leake DS, Ames JM. In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 6962–6969.
11. Nenadis N, Wang L-F, Tsimidou M, Zhang H-Y. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS^{•+} assay. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 4469–4674.
12. Cämmerer B, Kroh LW. Antioxidant activity of coffee brews. *Eur Food Res Technol* 2006; 223: 469–474.

13. Farah A, De Paulis T, Moreira DP, Trugo LC, Martin PR. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated Arabica coffees. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 374–381.
14. Sacchetti G, Di Mattia C, Pittia P, Mastrocola D. Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *J Food Eng* 2009; 90: 74–80.
15. López-Galilea I, Paz De Peña M, Cid C. Application of multivariate analysis to investigate potential antioxidants in conventional and torrefacto roasted coffee. *Eur Food Res Technol* 2008; 227: 141–149.
16. Budryn G, Nebesny E, Podsedek A, Żyżelewicz D, Materska M, Jankowski S, Janda B. Effect of different extraction methods on the recovery of chlorogenic acids, caffeine and Maillard reaction products in coffee beans. *Eur Food Res Technol* 2009; 228: 913–922.
17. Abebe Belay A, Gholap AV. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. *Afr J Pure Appl Chem* 2009; 3: 234–240.
18. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 2866–2887.
19. Chu Q, Lin M, Yu X, Ye J. Study on extraction efficiency of natural antioxidant in coffee by capillary electrophoresis with amperometric detection. *Eur Food Res Technol* 2008; 226: 1373–1378.
20. Risso EM, Peres RG, Amaya-Farfan J. Determination of phenolic acids in coffee by micellar electrokinetic chromatography. *Food Chem* 2007; 105: 1578–1582.
21. Murthy PS, Manonmani HK. Physico-chemical, antioxidant and antimicrobial properties of Indian monsooned coffee. *Eur Food Res Technol* 2009; 229: 645–650.
22. Daglia M, Cuzzoni MT, Dacarro C. Antibacterial activity of coffee: Relationship between biological activity and chemical markers. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 2273–2277.
23. Fujioka K, Shibamoto T. Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees. *Food Chem* 2008; 106: 217–221.
24. Wang L-H, Hsu K-Y, Hsu F-L, Lin S-J. Simultaneous determination of caffeic acid, ferulic acid and isoferulic acid in rabbit plasma by high performance liquid chromatography. *J Food Drug Anal* 2008; 16: 34–40.

Recibido: 03-10-2012

Aceptado: 13-02-2013

NOTAS NECROLÓGICAS

El rey ha muerto. Vive el legado del rey

Nevin S. Scrimshaw (1918 – 2013)

Las ciencias básicas del metabolismo y los nutrientes emergieron durante las primeras décadas del Siglo XX. Luego, surgió una interrupción con la Gran Guerra en Europa y El Pacífico. Después de la guerra surgió la conciencia de que la malnutrición era un problema generalizado en todos los lugares del mundo en desarrollo, incluyendo Centro y Sur América. La era inmediata a la post-guerra condujo a un enfoque en nutrición humana y científicos nutrólogos, usualmente médicos, trajeron el cúmulo de la ciencia nutricional a la nutrición humana aplicada. Latinoamérica produjo una serie de eminencias en este campo en los años siguientes a la guerra. Para mencionar a los más destacados: Miguel Layrisse y José María Bengoa en Venezuela, Federico Gómez y Joaquín Cravioto en México, George Graham en Perú, Roberto Rueda-Williamson en Colombia, Fernando Monkeberg en Chile. Todos los notables anteriormente mencionados eran médicos, usualmente pediatras, y con algunas excepciones, su enfoque era la malnutrición proteico-energética. Con la excepción de José María Bengoa, quien migró de la zona Vasca de España para nacionalizarse venezolano, todos son nativos de los países donde ellos laboraban.

La fundación de Las Nacional Unidas en 1945 sería un momento decisivo en la historia de los países en vías de desarrollo. Cuando la Organización Mundial de la Salud fue establecida, en 1948, se incluyó dentro de ella a la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Un año después, el 14 de septiembre de 1949, la OPS estableció en la Ciudad de Guatemala, un centro regional para manejar los problemas de alimentación y nutrición del Istmo Centroamericano: el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP). Su director-fundador fue un norteamericano de 31 de años llamado Nevin Steward Scrimshaw. Nacido en Wisconsin, para su grado doctoral se educó en bioquímica en Boston, Massachusetts, y se entrenó como médico en Rochester, Nueva York. Así

mismo, se especializó en obstetricia en Rochester, y practicó su profesión con las fuerzas armadas estadounidenses en la zona del Canal de Panamá, cuando fue reclutado. A través de los 12 años siguientes, tomaría el escenario junto con el reparto anteriormente mencionado y creó los cambios en la forma que se trataba y prevenía la malnutrición, así como en la forma en que se entendían las causas del estado nutricional deteriorado. De hecho, hasta que se mudó al Instituto de Tecnología de Massachusetts en 1962, dejaría la huella más grande y proyectaría la mayor iluminación en el escenario de la nutrición humana en la Región Latinoamericana.

Sus intereses clínicos fueron anemia, el bocio endémico y más especialmente la malnutrición proteico-energética. Trabajando con sus colegas médicos Moisés Behar y Fernando Viteri, caracterizó los cuadros de Kwashiorkor y Marasmo en Centroamérica; además, fue pionero en el tratamiento y regímenes de realimentación para lograr una recuperación segura. También hizo notables contribuciones en tecnología de alimentos. Trabajando con el Dr. Moisés Behar y el bioquímico, Guillermo Arroyave, pudo demostrar que el yodato de potasio era mucho más satisfactorio que el yoduro de potasio para la yodización de la sal gruesa y húmeda de la región. Trabajando con el Dr. Ricardo Bressani, un científico de alimentos, participó en el desarrollo del suplemento proteico de base vegetal más famoso (Incaparina), para el tratamiento y prevención de la malnutrición severa.

Como médico (MD) y bioquímico (PhD) arribó a la dirección del INCAP, se convirtió en sanitarista y allí realizó su contribución conceptual más eminente a la nutrición y salud de la región y del mundo. Se tomó un año sabático del INCAP en 1957-58 y regresó a Boston y a Harvard para obtener el grado de Maestría en Salud Pública (MPH). Su asesor fue el distinguido epidemiólogo Prof. John Gordon y su trabajo de Tesis para la maestría fue sobre la interacción de nu-

trición e infección. Esto llegó a una publicación en el *American Journal of Medical Sciences*, con un título (en Inglés) “Interactions of Nutrition and Infection” (1959), más tarde se extendió y se publicó en 1968 como monografía con el mismo título por la Organización Mundial de la Salud. Con este paradigma, el Dr. Scrimshaw creó un sistema para entender los orígenes de la desnutrición más allá de la falta de alimentos. Esto es relevante, como ejemplo, a las manifestaciones del SIDA.

Se cuenta dentro de sus muchos logros, haber alcanzado el pináculo de “Institute Professor” en MIT. El doctor Scrimshaw ejerció como Presidente de la International Union of Nutritional Sciences, y como Vice-rector de la United Nations University (UNU) para el Programa de Alimentación y Nutrición. En 1991, recibió el World Food Prize (“Premio Nóbel de la Nutrición”) y utilizó el componente monetario del premio para fortalecer a la International Nutrition Foundation (INF), que fue fundada en 1982. Ésta pasó a ser la Nevin Scrimshaw International Nutrition Foundation (NSINF) en una ceremonia en el 19° Congreso Mundial de Nutrición celebrado en Bangkok, Tailandia en 2009. La fundación es la sede de publicación del Food and Nutrition Bulletin (FNB), del cual fue Editor en Jefe y más tarde, Editor Emeritus.

También es notable su legado educacional en el área de lo que hoy llamamos formación de capital humano. Esto se inició en Guatemala con la promoción de la formación profesional de Behar, Viteri, Arroyave, Bressani y un sinnúmero de otros profesionales en Centro América. Con la UNU el doctor Scrimshaw pudo implementar el programa de becarios UNU. De la región, Alejandro O’Donell, Benjamín Caballero de Argentina y Hugo Amigo y Héctor Araya de Chile, fueron beneficiarios notables. De su experiencia de vida personal, Scrimshaw creía que los médicos podrían convertirse en buenos científicos es decir, -con apropiado entrenamiento en el método científico-. En

el MIT, estableció un programa único para doctorados al nivel de PhD para aquellos que ya eran médicos. Beneficiarios destacados de este programa de la región fueron: Ricardo Uauy de Chile, Benjamín Torún de Guatemala y Benjamín Caballero de Argentina; todos ellos se convirtieron en líderes en el mundo de la nutrición humana. La INF fue el soporte financiero de los Talleres de Liderazgo en Nutrición en América Latina, y Nevin asistió al V taller en Santiago de Chile en el 2009. Más recientemente en el nuevo milenio, Nevin Scrimshaw y Ricardo Uauy crearon el programa de becas con una donación de la Ellison Medical Foundation. Esto permitió al chileno José Galgani hacer su entrenamiento post-doctoral en Louisiana, Estados Unidos; a Camila Corvalán de Chile conseguir su PhD en la Emory University en Georgia, Estados Unidos; y a Mónica Orozco de Guatemala obtener su doctorado en la Universidad de Manitoba en Winnipeg, Canadá, entre otros.

Su salud empezó a deteriorarse en años recientes, pero le permitió completar su proyecto épico final, la publicación como un suplemento del FNB en marzo del 2011 sobre la historia del INCAP; contribuyó con 5 artículos. Al tiempo de su deceso tenía 19 días de haber cumplido 95 años y estaba escribiendo sus memorias.

En lo personal, Nevin Scrimshaw fue mi amigo y mi mentor. Fue mi jefe en mi tiempo como Profesor Asociado en el Departamento en MIT. La NSINF ha permitido el funcionamiento del CESSIAM en Guatemala. Su fallecimiento es una pérdida personal para muchos en la Región y una pérdida del hombre legendario de la nutrición humana de todos los tiempos.

Noel W. Solomons MD
 Director Científico de CESSIAM
 Director para Centro América de la NSINF

El arte y la ciencia despiden a don Cecilio

Cecilio Morón Jiménez (1945-2013)

Cecilio Morón Jiménez, de reconocida trayectoria en los campos de la ciencia médica y el arte, falleció en la madrugada del 11 de enero de 2013 en su ciudad natal, Salta, Argentina, a los 68 años, luego de una corta enfermedad.

El Dr. Morón Jiménez cursó sus estudios primarios y secundarios en Salta, en la Escuela Urquiza y en el Colegio Nacional. Se graduó de médico por la Universidad Nacional de Córdoba y obtuvo el máster en Nutrición Humana por el INCAP de Guatemala. Se desempeñó como médico en el Hospital Oñativia y fue decano y profesor de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta, casa en la que diseñó la Licenciatura en Nutrición. Durante largos años, fue Oficial Regional de la FAO, en el área de nutrición y alimentación, lo que lo llevó a residir en el exterior. Desde su posición en la Oficina Regional de la FAO contribuyó notablemente a lo que es en la actualidad la Red Latinoamericana de Composición de Alimentos, LATINFOODS. Aún ya retirado de la FAO, seguía en forma muy cercana el desempeño de la Red de la cual formaba parte del Consejo Asesor.

Una vez retirado, regresó a Salta, donde se dedicó de lleno a su otro gran interés: el arte. Había estudiado pintura en Chile y se perfeccionó en Salta, en el Taller de las Artes. Su obra mereció el primer premio en la exposición 2011 del Círculo Médico de esta capital. Al mismo tiempo, volvió a participar de los conciertos

del Mozarteum Argentino-Filial Salta, institución a la que se había asociado cuando esta comenzara su actividad. A su regreso, tuvo una importante participación como socio colaborador de la Comisión Directiva, como integrante de esta y, finalmente, fue elegido presidente del Mozarteum Salta para el periodo 2010-2012. En él cumplió una destacadísima labor, en especial durante la Temporada 2011, correspondiente al 30 aniversario de la fundación de la Filial. Fue un motor incansable de las actividades del Mozarteum Salta. Fueron para destacar su inagotable capacidad de trabajo y su energía, así como la hospitalidad y la cordialidad que marcaron su relación con los artistas que visitaron esta ciudad. Especial mención reclama su gran capacidad de gestión, que permitió llevar adelante a la institución, a veces, en circunstancias de tránsito difícil. Su rectitud, su compromiso y su gran amor por la ciencia, el arte y la naturaleza quedarán en el recuerdo de cuantos tuvieron el privilegio de compartir su camino.

Lo extrañaremos y recordaremos siempre

Dra. Norma Sammán
Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia,
UNT-CONICET.
Tucumán, Argentina

Fe de erratas

En el manuscrito publicado en el Volumen 62, Número 4, paginas 389-392, la información sobre los autores debe leer:

Volatile composition of peppermint (*Mentha piperita L.*) commercial teas through solid phase extraction.

L.G. Riachi¹, I.E. Abi-Zaid¹, R.F.A. Moreira² and C.A.B. De Maria^{2*}

- 1 Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Urca, Rio de Janeiro, Brazil.
- 2 Departamento de Saúde Coletiva, Instituto Biomédico, UNIRIO, Rua Frei Caneca 94, terceiro andar, CEP 20211-040, Rio de Janeiro, Brazil.

* Address for correspondence
Tel/fax: + 55 212531-9678
E-mail: carreb@uol.com.br

INFORMACION PARA LOS AUTORES

En 1950 el Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela edita su revista Archivos Venezolanos de Nutrición la cual en 1966 es donada a la recién creada Sociedad Latinoamericana de Nutrición, SLAN, para convertirse en su órgano oficial de divulgación Archivos Latinoamericanos de Nutrición, ALAN.

ALAN acoge en sus páginas trabajos de investigación originales sobre temas relacionados con alimentación y nutrición, entre ellos, nutrición humana y animal, bioquímica nutricional aplicada, nutrición clínica y comunitaria, educación en nutrición, ciencia y tecnología de alimentos, microbiología de alimentos, revisiones científicas críticas, Editoriales y Cartas al Editor.

Todos los artículos que se publican pasan por un proceso de arbitraje externo. El Comité Editorial no se hace responsable de los conceptos emitidos en los artículos aceptados No se mantendrá correspondencia sobre aquellos que no sean publicados.

REQUISITOS PARA LA PRESENTACIÓN DE MANUSCRITOS VÍA ELECTRÓNICA

Resumen de requisitos:

- Todas las partes del manuscrito estarán presentadas en versión Word a doble espacio, con letra Times New Roman (tamaño 12) en páginas tamaño carta. El trabajo debe tener una extensión no mayor de 23 páginas, incluyendo las Tablas, Figuras e ilustraciones si la hubiere, las cuales deben estar incorporadas al final del texto. Todas las páginas deben estar numeradas.
- Revise la secuencia general: Título del manuscrito y autores, Resumen y palabras clave, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, Tablas y Figuras.
- Adjunte carta de presentación y aceptación de autoría firmada por los investigadores involucrados. Los autores podrán sugerir los nombres de tres posibles árbitros con sus respectivas direcciones electrónicas.
- Envíe el manuscrito junto con la carta de presentación, a la siguiente dirección electrónica: info@alanrevista.org

PORTADA

Debe contener: Título del manuscrito. Nombres, apellidos y la afiliación institucional de los autores. Nombre, dirección postal, número de teléfono y dirección de correo electrónico del autor encargado de la correspondencia.

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Escrito en forma corrida y no en secciones, que no sobrepasará las 250 palabras de extensión. Agréguese de 3 a 6 palabras clave que ayuden a los indizadores a clasificar el artículo. ALAN exige que si el trabajo original es en español o en inglés, deberá acompañarse de un resumen en inglés o en español o alternativamente en portugués con sus palabras clave.

INTRODUCCIÓN

Enuncie la finalidad o el objetivo de investigación específico del estudio u observaciones, o bien la hipótesis que se ha puesto a prueba. Cite las referencias estrictamente pertinentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identifique los métodos, los aparatos y equipos (nombre y dirección del fabricante) y los procedimientos realizados. Identifique los reactivos y productos químicos utilizados.

Describa los métodos estadísticos con detalles e indique el método y modelo estadístico.

RESULTADOS

Limite las Tablas y las Figuras al número necesario para explicar el argumento y resultados de la investigación y evaluar los datos en que se apoya. Se sugiere un máximo de 5 Tablas y 3 Figuras.

DISCUSIÓN

Breve y concisa, contrastada con observaciones realizadas en otros estudios. Proponga nuevas hipótesis cuando

haya justificación para ello, pero identificándolas claramente como tales.

CONCLUSIONES

Refiérase a las más relevantes y oriente sobre posibles vías para continuar la investigación o el estudio emprendido. No cite referencias bibliográficas en esta sección.

AGRADECIMIENTOS

Mencione la procedencia del apoyo recibido en forma de subvenciones (equipos, reactivos, medicamentos) y a las instituciones financiadoras del estudio, dependencia e instituciones que apoyaron su ejecución, así como a personas y colaboradores.

TABLAS Y FIGURAS

Numérelas consecutivamente en arábigos siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto. Cerciórese de que cada Tabla y Figura aparezca citada en el manuscrito.

REFERENCIAS

En el texto numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden en que se mencionan por primera vez y se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis.

Las Referencias serán listadas al final del manuscrito en orden numérico, no en orden alfabético. La veracidad de la información contenida en ésta sección es responsabilidad del autor (de los autores).

COSTO POR PÁGINA

Debido a los altos costos de impresión y publicación, ALAN ha estipulado dentro de su política editorial el costo de US \$ 20 por concepto de página publicada, suma que deberá ser agenciada por los autores a través de sus subvenciones de investigación o ante las instituciones donde prestan sus servicios. Se hace notar sin embargo, que este costo por página no condicionará de manera alguna la aceptación y publicación del trabajo, lo cual estará dado por los méritos del mismo.

Debido a que no existe al presente una traducción oficial al español, se transcribe por razones de espacio, solo el título **del documento que sigue: UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SUBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS: WRITING AND EDITING FOR BIOMEDICAL PUBLICATION**. Updated October 2008. Para una lectura completa de esta versión, los autores deben acudir al siguiente sitio: <http://www.icmje.org>