Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Maestría

Evaluación de la capacidad prebiótica de fibras para la utilización como ingredientes funcionales en modelo experimental en rata

Pardo González, Ruth Margarita

2017-11-23

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Pardo González, Ruth Margarita. (2017-11-23). Evaluación de la capacidad prebiótica de fibras para la utilización como ingredientes funcionales en modelo experimental en rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Pardo González, Ruth Margarita. "Evaluación de la capacidad prebiótica de fibras para la utilización como ingredientes funcionales en modelo experimental en rata". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-11-23.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Industrias

Evaluación de la capacidad prebiótica de fibras para la utilización como ingredientes funcionales en modelo experimental en rata.

Tesis presentada para optar al título de
Magíster en Bromatología y Tecnología de la Industrialización de los Alimentos

Autor: ***RUTH MARGARITA PARDO GONZÁLEZ***
Químico de Alimentos

Directora de tesis:
M. Sc. ÁNGELA ZULETA

Codirectora:
Dra. ADRIANA RUTH WEISSTAUB

Lugar de trabajo: Laboratorio de Nutrición
Departamento de Bromatología y Toxicología
Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2017

Fecha de Defensa: 23 Nov, 2017

Evaluación de la capacidad prebiótica de fibras para la utilización como ingredientes funcionales en modelo experimental en rata.

El calcio es uno de los nutrientes prioritarios en la poblacion infantil, cuya deficiencia puede conducir a la osteopenia y osteoporosis. Una estrategia para paliar esta deficiencia, es la utilizacion de alimentos con una buena biodisponibilidad de calcio. Con este objetivo se desarrolló una galletita fortificada con carbonato de calcio y adicionada con fibras prebióticas (inulina y oligofructosa 70:30), para aumentar la biodisponibilidad de este mineral. Para comprobar los beneficios propuestos se llevó a cabo un modelo experimental en ratas Wistar en crecimiento, alimentadas con tres diferentes dietas: Dieta Galletita, Dieta Control y Dieta Control de Fructanos. Los resultados obtenidos demostraron que la ingesta de la galletita elaborada aumentó el porcentaje de absorción aparente y la retencion de calcio con respecto a la dieta control. Asi mismo se observó un aumento del peso del ciego y disminución del pH cecal ambos indicadores de fermentación colónica. Se puede concluir que la galletita desarrollada podría mejorar el estado nutricional con respecto al calcio en la población infantil, debido a que se trata de un alimento saludable y de amplio consumo.

Palabras claves: Inulina, oligofructosa, calcio, absorción aparente, peso del ciego, pH cecal, población infantil.

Evaluation of the prebiotic capacity of fibers for use as functional ingredients in experimental rat model.

Calcium is one of the priority nutrients in the child population, whose deficiency can lead to osteopenia and osteoporosis. One strategy to alleviate this deficiency is the use of foods with a good bioavailability of calcium. With this objective, a cookie fortified with calcium carbonate and added with prebiotic fibers (inulin and oligofructose 70:30) was developed to increase the bioavailability of this mineral. To test the proposed benefits, an experimental model was carried out on growing Wistar rats, fed on three different diets: the Biscuit Diet, the Control Diet and the Fructan Control Diet. The results obtained showed that the ingestion of the elaborated cookie increased the percentage of apparent absorption and the retention of calcium with respect to the control diet. Likewise, an increase in the weight of the cecal and decrease in the cecal pH were observed both indicators of colonic fermentation. It can be concluded that the developed cookie could improve the nutritional status with respect to the calcium in the children population, because it is a healthy and widely consumed food.

Keywords: Inulin, oligofructose, calcium, apparent absorption, weight of the cecum, cecal pH, infant population.

AGRADECIMIENTOS

A M.Sc. Ángela Zuleta, mi directora, por la confianza brindada y darme la oportunidad de haber podido realizar este trabajo de investigación y así obtener mi titulo de Maestría.

A Dr. Adriana Weisstaub por la paciencia y apoyo.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, a la catedra de Bromatología y Nutrición por haberme permitido desarrollar este trabajo de investigación.

A la empresa BENEO por la donacion del Orafti® Synergy 1 usado en el presente estudio.

A Fernando Duarte, **Paola Alzate** y Ana Colonia, compañeros de maestría gracias por los aportes en las materias cursadas y los buenos momentos que compartimos.

A **Camilo Andres Rojas Pardo** por hacerme ver las cosas desde otra perspectiva.

A todos los que no nombré pero que han contribuido a que llegue hasta acá.

*A mi familia Argentina **Alberto**, **Marina**, **Santi** y **Manu**, por abrirme las puertas de tan maravilloso hogar, por los consejos y amistad sincera que me brindaron.*

Muchas Gracias!

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico muy especialmente a mi ***Mamacita Nun*** *Q.E.P.D., por enseñarme el valor de la educación.*

A mi padre ***Luis Alejandro*** *por sus palabras de aliento y fortaleza a seguir adelante, a mi madre* ***Edith Elvira*** *por su sabiduría además de la paciencia y a ambos por el apoyo incondicional, los consejos, el sacrificio, el esfuerzo que hicieron para darme la oportunidad de poder viajar a otro país y sobre todo por creer en mi.*

A mis hermanos ***Luis Alejandro****, por darme el ejemplo de seguir sin rendirme, a* ***Ángela Patricia*** *quien me decía "esta es una prueba de resistencia" y* ***Mario Alejandro*** *por ser mi compinche y demás familiares que aunque no estuvieron conmigo físicamente siempre me alentaron a seguir.*

Indice

I. INTRODUCCIÓN 1

I.1. Fibra dietaría 3

I.2. Fructanos 4

I.2.1. Propiedades de los fructanos 4
I.2.2. Inulina- definición 5

I.3. Aplicaciones en alimentos 6

I.4. Calcio 7

I.4.1. Metabolismo y absorción del Ca 7
I.4.2. Factores que afectan la absorción de Ca 9
I.4.3. Requerimientos de Ca 9

I.5. Diseño de alimentos para incrementar la biodisponibilidad de Ca 10

I.6. Galletitas 11

II. OBJETIVOS 12

II.1. Objetivo general 12

II.2. Objetivos específicos 12

III. MATERIALES Y MÉTODOS 13

III.1. Materia prima 13

III.1.1. Galletita: 13
III.1.2. Elaboración de la galletita: 14
III.1.2.1. Método de preparación. 14

III.2. Determinación de la composición nutricional. 14

III.2.1. Determinación de proteínas 14
III.2.2. Determinación de lípidos 15
III.2.3. Determinación de fibra dietaría. AOAC 991.43 15
III.2.4. Determinación de humedad 15
III.2.5. Determinación de cenizas 16
III.2.6. Determinación de minerales 16
III.2.7. Determinación de fructanos 16

III.3. Modelo experimental *in vivo* para la evaluación de la biodisponibilidad de Ca en la galletita 17

III.3.1. Animales 17

Dietas experimentales 17

III.3.2. Dieta control 17
III.3.3. Dieta control de fructanos 18
III.3.4. Dieta galletita 18

III.4. Determinación de la composición centesimal de las dietas 19

III.4.1. Determinación de calcio (Ca) 19
III.4.1.1. Determinación de fósforo (P) 19

III.5. Determinaciones en el modelo experimental *in vivo* 19

III.5.1. Determinación del consumo de dieta e ingesta de Ca. 19
III.5.2. Absorción aparente de Ca (%ABS) 19
III.5.3. Determinación de la densidad mineral ósea (DMO) 20
III.5.4. Peso y pH del ciego 20
III.5.5. Medidas y composición ósea 20

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 21

IV.1. Composición nutricional de la galletita 21

IV.2. Cálculo de la ingesta de dieta y de la ingesta Ca durante la experiencia. .22

IV.3. Determinaciones de peso del ciego, pH cecal, excreción fecal de Ca y % de absorción aparente de Ca 23

IV.4. Determinación del contenido mineral óseo y densidad mineral ósea de fémur, columna y tibia 24

IV.5. Determinaciones de Ca y P en los fémures derechos de los animales. 26

IV.6. Estudios en humanos 28

V. CONCLUSIONES 31

VI. REFERENCIAS 33

Lista de figuras

I. INTRODUCCIÓN

Figura I. 1: Estructura química de los fructoligosacáridos (Inulina). Con una molécula terminal de glucosa (β-D-glucopiranosil) (A) y con una molécula terminal de fructosa (β-D-fructopiranosil) (B) Fuente: Extraido de (Madrigal & Sangronis, 2007) 6

Lista de tablas

I. INTRODUCCIÓN

Tabla I. 1: Mecanismos de absorción de Ca afectados por los prebióticos: 8

Tabla I. 2: Ingesta de Ca en mg/día (DRIs): Estimulate Average Requirements Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies). 10

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla III. 1: Composición de la galletita / 100 g. 14

Tabla III. 2: Diseño de las dietas experimentales (g/100 g de dieta). 18

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla IV. 1: Porcentaje de nutrientes en la galletita (%) en base seca. 21

Tabla IV. 2: Ingesta de dieta total (g/60 días), ingesta de dieta diaria (g/día), e ingesta diaria de Ca (mg/día) en los tres grupos experimentales. 22

Tabla IV. 3: Peso del ciego (g), pH cecal, excreción fecal de Ca diaria (mg/día) y porcentaje de absorción aparente de Ca (% ABS) de los tres grupos experimentales. 23

Tabla IV. 4: Contenido mineral óseo total (CMO) (expresado en g), densidad mineral ósea del fémur derecho, (DMO f), densidad mineral ósea de columna (DMO c) y densidad mineral ósea de tibia proximal (DMO t), a los 60 días en los tres grupos experimentales. 25

Tabla IV. 5: Peso, longitud, contenido de Ca y P y relación de Ca/ P en fémur derecho de las ratas de los tres grupos experimentales. 27

Tabla IV. 6 Relación carbohidrato ingerido, dosis administrada (g/día), duracion (días), grupo etáreo y número de pacientes…….29

Lista de abreviaturas

% ABS:	Porcentaje de Absorción Aparente
ADA:	Asociación Dietética Americana
AGCC:	Ácidos Grasos de Cadena Corta
AI:	Adequate Intake
AIN:	American Institute of Nutrition
b.h.	Base humeda
b.s.:	Base seca
˚C:	Grados Centígrados
Ca:	Calcio
CAA:	Código Alimentario Argentino
CaBP	Calcium-Binding Protein
cm:	Centímetro
CMO:	Contenido Mineral Óseo
DC:	Dieta Control
DF:	Dieta Fructanos
DG:	Dieta Galletita
DMO:	Densidad Mineral Óseo
DRIs:	Dietary Reference Intakes
ECNT:	Enfermedades Crónicas No Transmisibles
ENNyS:	Encuesta Nacional de Nutrición y Salud
FD:	Fibra Dietaría
Fe:	Hierro
FOS:	Fructooligosacáridos
g:	Gramos
GOS:	Galactooligosacáridos
GP:	Grado de Polimerización
Kg:	Kilogramo
mg:	Miligramo
mm:	Milímetro
N:	Nitrógeno
nm:	Nanómetro
P:	Fósforo

pH: Indicador del potencial de hidrógenos

ppm: Partes por millón

SCFA: Short-chain fatty acid (Ácidos Grasos de Cadena Corta)

Zn: Zinc

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha puesto énfasis en los alimentos que promueven la salud, para mejorar el bienestar físico y reducir el riesgo de contraer enfermedades, considerando los efectos de la nutrición sobre el desarrollo cognitivo y psicomotor, inmunidad, crecimiento y composición corporal, entre otros (Olagnero et al., 2007).

En el mundo occidental la mala nutrición ha sido considerada un problema propio de los países en desarrollo o de sectores de bajos ingresos de los países desarrollados, aunque la causa fundamental es el consumo de dietas poco saludables (OMS/FAO, 2003), que son las principales causas de las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT), como accidentes cardiovasculares, la diabetes tipo II, determinados tipos de cáncer, caries dental, osteoporosis y enfermedades relacionadas con la deficiencia de calcio.

En la Argentina, de acuerdo a datos obtenidos de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS, 2007), se observó una marcada deficiencia en la ingesta de calcio en la población infantil la cual aumentaba con la edad. (Porcentaje de inadecuación: Niños de 6-23 meses: 9%, de 2-5 años: 46%, adultos 10-49 años: 94% y embarazadas: 88%).

La falta de calcio durante la infancia puede conducir a la osteopenia y osteoporosis, en la edad adulta mientras que en el embarazo puede devenir en hipertensión inducida por el embarazo, preeclampsia y nacimientos prematuros con bajo peso al nacer (ENNyS, 2007).

La ingesta de alimentos aportadores de calcio o de alimentos funcionales con alta biodisponibilidad son estrategias para evitar las consecuencias de la deficiencia de este mineral.

Un alimento puede considerarse funcional si se demuestra de forma satisfactoria que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo del consumidor, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que permita mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas. Numerosas investigaciones de índole epidemiológica y experimental han demostrado que el consumo de algunos alimentos puede ser un factor de protección (frutas, verduras, cereales no refinados, leguminosas) o de riesgo (alimentos ricos en grasas saturadas, colesterol, sal, azúcares simples)(Araya et al., 2009).

En la Argentina el Código Alimentario Argentino (CAA) no cuenta, por el momento, con una definición de alimentos funcionales, pero posee un capítulo en el que se ocupa específicamente de los alimentos de régimen o dietéticos. En este capítulo se hace mención a los alimentos modificados en su perfil nutricional, enriquecidos y fortificados, que de acuerdo a la definición de la Asociación Dietética Americana (ADA) quedarían incluidos dentro del concepto de alimentos funcionales (CAA, 2013).

Los alimentos que contienen cereales y en particular los productos de panificación, como panes, galletitas, etc; representan una alternativa interesante como productos funcionales ya que tienen propiedades nutricionales propias de los cereales y sus

derivados (harinas, salvado, germen o mezclas de ellos) y al adicionar bioactivos se podría desarrollar alimentos más saludables (Araya et al., 2009).

Una estrategia para alcanzar una nutrición óptima y disminuir el riesgo de ECNT podría ser el diseño de un alimento de consumo habitual como las galletitas con el agregado de calcio y fibras prebióticas.

I.1. Fibra dietaría

La Fibra Dietaria (FD) fue definida por D.P. Burkitt y H.C.Trowell 1975 como los "polisacáridos vegetales y lignina, que no son digeribles en el tracto gastrointestinal humano" (Burkitt & Trowell, 1975).

Dentro de la fibra dietaria se distinguen dos fracciones: soluble e insoluble. Dentro de la fraccion de fibra soluble, los compuestos de bajo peso molecular resistentes a la hidrólisis de las enzimas del tracto digestivo humano, se denominan prebióticos.

Gibson y Roberfroid definen a un prebiótico como: "Un ingrediente alimentario no digerible que afecta de modo beneficioso al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o de un limitado número de bacterias del colon" (Gibson & Roberfroid, 1995).

Criterios que debe cumplir un prebiótico

- Resistencia a la acidez gástrica: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico no es modificado por la acidez estomacal.
- Resistencia a la absorción gastrointestinal: ensayo realizado como indicador de que el prebiótico no se absorbe a nivel del epitelio intestinal.
- Fermentación por la microflora intestinal.

- Estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de bacterias intestinales benéficas que contribuyen a la salud y bienestar.

El proceso de fermentación de la fibra en el colon posibilita el mantenimiento y desarrollo de la flora bacteriana, así como el de las células epiteliales (Fernández-Bañares F & Gassull, 1992). En el colon ocurren fundamentalmente dos tipos de fermentación; la fermentación sacarolítica y la proteolítica. La primera es la más beneficiosa para el organismo y produce principalmente ácidos grasos de cadena corta (AGCC): acético, propiónico y butírico; en una proporción molar casi constante 60:25:15, gases y disminución del pH luminal.

Gibson, en el Reino Unido presidió un grupo de expertos para evaluar distintos ingredientes alimentarios candidatos a prebióticos. Este grupo de trabajo estableció que los compuestos que cumplían de forma estricta las condiciones anteriormente descriptas eran los fructanos inulina, fructo-oligosacáridos (FOS), los galacto-oligosacáridos (GOS) y la lactulosa (Guillotg & del Monte, 2015).

I.2. Fructanos

Los fructanos están formados por una molécula de sacarosa a la que se unen sucesivas moléculas de fructosa por enlaces β 2→1 o β 2→6. En las plantas superiores se han encontrado cinco clases de estructuras diferentes de fructanos: inulina, levano, levano mixto, neoseries de inulina, y neoseries de levano.

I.2.1. Propiedades de los fructanos

Los fructanos de diferente grado de polimerización poseen diversas propiedades tanto físicas como tecnológicas. Los FOS, por su menor tamaño de cadena, tienen

un 30 % del poder edulcorante de la sacarosa, y su capacidad para retener agua es superior. Como no son azúcares reductores, no favorecen a la reacción de Maillard, son estables a pH >3 y a temperaturas de hasta 130 ºC. Pueden ser usados como ingredientes en tortas o productos de panificación, cereales para desayuno, barras de cereales y productos lácteos (Franck A, 2006).

I.2.2. Inulina- definición

La inulina es un polisacárido con cadenas lineales de uniones β 2→1 de unidades fructosilo, siendo el trisacárido más pequeño de la serie la isocestosa. Se encuentra en diferentes vegetales donde se concentra o almacena en el tejido fino de la planta, generalmente en raíces y rizomas que contienen las concentraciones más altas. Entre las especies de plantas que contienen fructanos se identifican las del grupo Liliace [ajo *(Allium sativum)*, cebolla *(Allium cepa)*, espárrago *(Asparagus officinalis)*, puerro *(Allium ampeloprasum var. porrum)*] y Compositae [achicoria *(Cichorium intybus)*, alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosus L.)* y yacon *(Smallanthus sonchifolius)*] (Roberfroid, 2005; Van Loo et al., 1995).

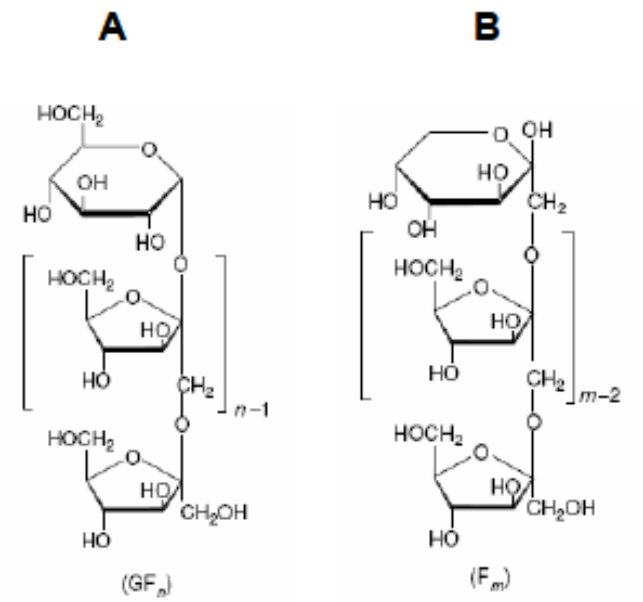

Figura I. 1: Estructura química de los fructoligosacáridos (Inulina). Con una molécula terminal de glucosa (β-D-glucopiranosil) (A) y con una molécula terminal de fructosa (β-D-fructopiranosil) (B) Fuente: Extraido de (Madrigal & Sangronis, 2007).

El consumo promedio de inulina y oligofructosa en Estados Unidos es de 1 a 4 g/día y en Europa es de 3 a 10 g/día (Van Loo et al., 1995). El valor energético estimado tanto para la inulina como para los FOS es de 1,5 kcal (Roberfroid, 1999).

I.3. Aplicaciones en alimentos

La inulina y la oligofructosa se utilizan en los alimentos por sus ventajas nutricionales y por sus propiedades tecnológicas. Debido a que son compuestos con alta solubilidad y a que no producen cambios en las características organolépticas son apropiados para su utilización en alimentos líquidos como leches, jugos, yogures bebibles y helados entre otros.

Numerosos estudios señalan que los prebióticos además tienen un efecto potenciador sobre la absorción de ciertos minerales, entre ellos el calcio.

I.4. Calcio

El calcio es el catión más abundante del organismo, representando el 2,24% del peso corporal libre de grasa. El organismo humano contiene entre 850 y 1500 gr de calcio que representa alrededor del 1,7% del peso corporal,(American Society for Bone and Mineral Research, 2013; Pita Martín de Portela, 2003) formando junto con el fósforo (P) un fosfato complejo de cristales de hidroxiapatita, que se encuentra en los huesos. El 1% restante del calcio está en fluidos y tejidos, siendo esencial para regular funciones fisiológicas como irritabilidad neuromuscular, contracción muscular, automatismo cardíaco, coagulación sanguínea y un gran número de reacciones bioquímicas cuyo conocimiento se incrementa día a día (Fernandez et al., 2011).

I.4.1. Metabolismo y absorción del Ca

El calcio de los alimentos es ionizado en el medio ácido del estómago y en el intestino interacciona con los demás componentes de la dieta formando complejos cuya solubilidad depende del pH del medio.

El calcio es absorbido en el intestino delgado por dos mecanismos:

- Transporte pasivo o no saturable.

El tranporte pasivo, mecanismo independiente de la vitamina D, depende de la concentración de calcio intraluminal y ocurre en toda la longitud del intestino delgado y grueso. Esta ruta puede ser estimulada por la presencia de sustratos fermentables.

La fermentación de la fibra prebiótica, al disminuir el pH intestinal produce cambios que aumentan la solubilidad y el intercambio iónico de hidrógeno celular por calcio, estimulando el transporte pasivo o paracelular.

- Transporte activo o saturable, dependiente del metabolito de la vitamina D, predominante en el duodeno proximal.

El butirato producido en la fermentación de los prebióticos provoca el aumento de la concentración de calbindina y de la actividad de los receptores a vitamina D_3 estimulando el trasnporte activo del calcio **(Tabla I.1.)** (Maiyar & Norman, 1992)**.**

Los carbohidratos no digeribles de baja polimerización tales como los FOS son más activos en el colon proximal, mientras que las moléculas de cadena más larga podrían tener su efecto en la parte distal. Combinar ambos tipos de componentes en un producto puede ofrecer un efecto sinérgico sobre la absorción del calcio, ya que dicha absorción ocurre a lo largo de todo el intestino (Lavanda, Saad, Lobo, & Colli, 2011).

Tabla I. 1: Mecanismos de absorción de Ca afectados por los prebióticos:

EFECTO SOBRE	VIA	MECANISMO
*Transporte Pasivo	• SCFA (acetato>propionato>butirato >lactato) • Propionato > acetato	• ↓pH : ↑ solubilidad • ↑intercambio iónico (H x Ca)
*Transporte activo	• Butirato	• ↑Síntesis CaBP • ↑receptor 1,25 diOH vit D_3

SCFA: Short-chain fatty acid. (Ácidos grasos de cadena corta)

I.4.2. Factores que afectan la absorción de Ca

- **Estimuladores de Ca**

La biodisponibilidad del calcio en la dieta es del 30-40%, y los factores que estimulan la absorción son: lactosa, ácido cítrico, aminoácidos básicos, péptidos y las fibras prebióticas.

- **Inhibidores de Ca**

La absorcion se ve afectada por varios compuestos como: oxalatos, fosfatos, fitatos, fluoruros, ácidos grasos de cadena larga y fibra (Mota-Blancas & Perales-Caldera, 1999).

I.4.3. Requerimientos de Ca

El tejido óseo es un tejido dinámico en el cual existen dos procesos simultáneos: deposición de calcio y resorción ósea. Desde el nacimiento hasta la adolescencia la deposición de calcio supera la resorción de manera que se produce un aumento del contenido de calcio en el hueso hasta llegar al “pico máximo de masa ósea” entre los 18 a 25 años. Posteriormente ambos procesos se producen en igual magnitud y a partir de la cuarta a quinta década de vida se produce un incremento de la salida de calcio que supera la deposición de este mineral, por lo cual hay una disminución de la masa ósea corporal.

Por este motivo, la ingesta de calcio durante la niñez debe ser la adecuada para lograr alcanzar el pico máximo de masa ósea, de manera que durante la vejez se disminuya la posibilidad de la aparición de procesos osteopénicos que devengan en osteoporosis (American Society for Bone and Mineral Research, 2013).

En la **tabla I.2**., se pueden observar los requerimientos de calcio para distintos grupos etarios, que indican la ingesta recomendada de este mineral, teniendo en cuenta que la absorción de una dieta mixta se encuentra dentro del 30%

Tabla I. 2: Ingesta de Ca en mg/día (DRIs): Estimulate Average Requirements Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies).

GRUPO (años)	Ca (mg/día)
Lactantes (0-1)	200-260 (AI)
Niños (1-3 y 4-8)	***700-1000***
Hombres (9-18; 19-70; >70)	1300-1000-1200
Mujeres (9-18; 19-50; 51-70 y >70)	1300-1000-1200-1200
Embarazo (<18 y > 18)	1300-1000
Lactancia(<18 y > 18)	1300-1000

SOURCES: Dietary Reference Intakes for Calcium Phosphorous, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride (1997); Dietary Reference Intakes for Calcium (2011). These reports may be accessed via www.nap.edu.(Food and Nutrition Board; Institute of Medicine; National Academies, 2011). **AI:** Adequate Intake (Ingesta Adecuada)

I.5. Diseño de alimentos para incrementar la biodisponibilidad de Ca

Los alimentos fortificados con calcio son una opción que puede utilizarse en el desarrollo de alimentos para niños que no logran cubrir las recomendaciones citadas anteriormente con la dieta habitual.

Una de las formas de agregar calcio a los alimentos es utilizando sales como el Carbonato de Calcio el cual presenta una adecuada disponibilidad (Fernandez et al., 2011).

Los productos de panadería de alto consumo en nuestro país como las galletitas, se plantean como una posibilidad interesante al momento de diseñar un producto con estas características.

I.6. Galletitas

Se entiende por galletitas a los productos elaborados a base de harina de trigo u otras mezclas, moldeadas y horneadas, con o sin el agregado de agentes químicos y/o biológicos autorizados. Las galletitas fabricadas con harina de trigo blanca refinada son pobres en fibra dietaria (Lezcano, 2015a).

La producción anual de galletitas dulces y saladas registra una tendencia positiva y creciente desde el año 2005 hasta el 2014; se estima una producción es de 425 mil toneladas por año. Las galletitas dulces figuran entre los cuatro productos masivos que integran la canasta básica de los hogares argentinos (Lezcano, 2015b).

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Desarrollar una galletita a base de harina de trigo, fortificada con carbonato de calcio, y agregar una fuente de fibra prebiótica (mezcla de inulina y oligofructosa), para evaluar su capacidad como ingrediente funcional que contribuya a aumentar la absorción de calcio.

II.2. Objetivos específicos

- ✓ Diseñar una galletita saludable para la población infantil.
- ✓ Determinar la composición nutricional del alimento desarrollado.
- ✓ Evaluar la biodisponibilidad de calcio de la galletita mediante un modelo experimental biológico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Materia prima

III.1.1. Galletita:

A continuación, se mencionan las materias primas empleadas para la formulación del producto:

1. ***Harina de trigo:*** se empleó harina de trigo, marca Favorita 0000.

2. ***Aceite de Maíz:*** se empleó aceite de maíz comercial, marca Mazola.

3. ***Leche fluida descremada:*** se utilizó leche líquida parcialmente descremada, marca comercial Sancor

4. ***Huevos:*** se utilizó huevo entero, del mercado local.

5. ***Fructanos:*** se utilizó una mezcla de inulina y oligofrucosa en una relacion 70:30 (Beneo Orafti® Synergy1, 2012)

6. ***Carbonato de Calcio****:* marca Biopack. (Biopack, Cod. 9780.08)

7. ***Orégano:*** se agregó orégano deshidratado, marca comercial Alicante.

8. ***Polvo para hornear:*** se utilizó polvo para hornear marca comercial, Royal.

9. ***Sal:*** se empleó sal fina marca comercial, Celusal.

En la **Tabla III. 1** se detalla la composición de la galletita con los ingredientes usados para la elaboración y sus cantidades respectivamente.

Tabla III. 1: Composición de la galletita / 100 g.

Ingredientes	Cantidad (g)
Harina de trigo	58,1
Aceite de maíz	11,6
Leche descremada	11,6
Huevos	14,5
Fructanos	2,3
Carbonato de Calcio	0,7
Orégano	0,7
Polvo de Hornear	0,3
Sal	0,1

III.1.2. Elaboración de la galletita:

III.1.2.1. Método de preparación.

Se mezclaron todos los ingredientes solidos durante un minuto con cuchara, luego se agregó el aceite, la leche y por ultimo los huevos uno a uno, amasando manualmente la mezcla por aproximadamente 15 minutos. Luego se estiró la masa con rodillo hasta un espesor entre 0,3 - 0,5 cm, se cortó con cuchillo en tiras de aprox 10 cm de alto y 2,5 cm de ancho, posteriormente se horneó a 180 °C durante 20 minutos.

III.2. Determinación de la composición nutricional.

III.2.1. Determinación de proteínas

Se empleó el método de Kjeldahl para determinar el contenido de proteínas utilizando el factor 6.25 (% proteínas = % N x 6.25).

III.2.2. Determinación de lípidos

Se realizó la determinación de lípidos por método indirecto de extracción básica, Rose Gottlieb. Se expresó como extracto etéreo %, mediante la fórmula.

$$G\ [\%] = [(m2 - m1)\ .\ 100] / M$$

m1: masa en gramos del matraz erlenmeyer.

m2: masa en gramos del matraz erlenmeyer con grasa tras el secado.

M: peso de la muestra en gramos.

III.2.3. Determinación de fibra dietaría. AOAC 991.43

Se determinó el contenido de fibra dietaria total de alto peso molecular, empleándose el método enzimatico-gravimétrico. Se tomó 1 g de muestra, se agregó buffer fosfato pH = 6 y se trató con α-amilasa, proteasa y amiloglucosidasa sucesivamente. Posteriormente, se precipitó la fibra dietaria total (FDT) por adición de etanol 95% v/v, durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo fue filtrada y lavada en pasos sucesivos con etanol 78%, etanol 95% y acetona pura, posteriormente fue secada (105 °C) y pesada. A uno de los residuos de FD se le determinó el contenido de cenizas incinerando la muestra a 550 °C, y al otro se le determinó contenido de proteínas por el método de Kjeldahl. Se determinó como el residuo corregido por contenido de proteínas y cenizas. (AOAC 991.43, 1995).

III.2.4. Determinación de humedad

Se determinó por diferencia de pesajes antes y después de desecación en estufa, a 100 ± 2˚C hasta peso constante (alrededor de 48 horas) y el resultado se expresó con la siguiente formula:

$$H\ (\%) = (m1 - m2)/(m1 - m0) * 100$$

donde:

m0 = masa de capsula de Petri vacía (g)

m1 = masa de capsula de Petri con la muestra húmeda (g)

m2 = masa de capsula de Petri con sólidos luego del secado (g)

III.2.5. Determinación de cenizas

Se determinó por calcinación en mufla a 550˚C, hasta cenizas blancas, y se calculó la diferencia de peso, antes y después de someter las muestras a tratamiento.

III.2.6. Determinación de minerales

Se realizó la determinación de calcio por mineralización con ácido nítrico utilizando bombas Parr para su digestión.

Posteriormente el análisis de calcio se llevó a cabo por espectrofotometría de absorción atómica con un espectofotómetro Perkin Elmer, modelo SpectrAA-400, con llama de aire-acetileno, slit de 0,5 mm y longitud de onda de 422,7 nm. Se agregó cloruro de lantano, en una concentración de 6500 ppm en la solución de lectura como supresor de interferencias (Perkin Elmer Coorporation, 1996).

III.2.7. Determinación de fructanos

Las muestras fueron analizadas por duplicado. Se realizó la determinación de fructanos por cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, equipo Waters, con una columna de intercambio iónico , Nucleogel Sugar 810 Ca, con detector de índice de refracción, Waters R 401. (Zuleta, 2001)

III.3. Modelo experimental *in vivo* para la evaluación de la biodisponibilidad de Ca en la galletita

Para la determinación de la biodisponibilidad del calcio en la galletita, se trabajó con un modelo experimental *in vivo*, en el cual ratas de la cepa Wistar fueron alimentadas durante 60 días desde el destete con tres dietas: una dieta control, una dieta a base de fructanos y la dieta experimental elaborada con la galletita.

III.3.1. Animales

Se trabajó con 8 ratas de la cepa Wistar por grupo al destete de 23-25 días, (peso: 40 ±5 g), criadas y mantenidas en bioterio en condiciones estandarizadas de temperatura (21± 1 °C) y humedad (50-70%), con ciclo de luz oscuridad de 12 horas regulado automáticamente (Fuentes, Mendoza, Rosales, & Cisneros, 2008).

Las ratas (n= 8 / grupo) fueron colocadas en jaulas individuales de acero inoxidable, administrándoles agua desionizada y las dietas correspondientes durante 60 días *"ad-libitum".* (DC: Dieta Control, DF: Dieta Control de Fructanos y DG: Dieta Galletita). Este trabajo de investigación contó con la aprobación del Comité de Ética, Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. Departamento de Sanidad, Nutrición, Bromatología y Toxicología.

Dietas experimentales

III.3.2. Dieta control

Esta dieta se elaboró de acuerdo a la composición establecida por AIN-93G (American Institute of Nutrition) y se utilizó celulosa como fuente de fibra (5%) (AIN-93 G, 2013)

III.3.3. Dieta control de fructanos

La dieta se elaboró de acuerdo a las recomendaciones de AIN-93G, reemplazando la celulosa por fructanos (# Orafti® Synergy1, BENEO, Tienen Belgium).

III.3.4. Dieta galletita

Esta dieta se elaboró utilizando la galletita molida con el agregado de los macro y micro nutrientes necesarios para cubrir las recomendaciones de AIN-93G.

La mezcla de sales minerales agregadas no contuvo carbonato de calcio debido a que esta sal ya se encontraba dentro de la formulación de la galletita elaborada. Con este diseño se logró cubrir el 50% de las recomendaciones de calcio establecidas para estos animales **(Tabla III.2).**

Tabla III. 2: Diseño de las dietas experimentales (g/100 g de dieta).

Ingredientes (g/100g dieta)	Dieta Galletita	Dieta Control	Dieta Fructanos
Caseína *	5,7	20	20
Lípidos **	---	7	7
Mezcla de Minerales ***	----	3,5	3,5
Mezcla de Minerales sin Ca	1,4	---	---
Mezcla de Vitaminas ******	0,9	1	1
L-Cistina	0,3	0,3	0,3
Colina	0,6	0,7	0,7
Celulosa	---	5	---
Fructanos #	---	---	10
Galletita	91,2	---	---
Dextrina	---	62,5	57,5

*Caseinato de Potasio, Nestlé Argentina S.A, conteniendo 85.1% de proteína y 0.095 g% Ca.
** Aceite de Soja Comercial
*** Composición de acuerdo con AIN 93 Mineral -MX
**** Composición de acuerdo con AIN 93 Vtamin Mix -VX
***** Dextrina : Ingredion, Globe 019150

III.4. Determinación de la composición centesimal de las dietas

En las dietas experimentales se determinaron:

a) proteínas, b) grasas, c) fibra, d) cenizas, e) humedad y f) minerales, según los métodos descritos en el apartado III.2.

III.4.1. Determinación de calcio (Ca)

Se realizó la determinación de calcio según lo descrito en III.2.6.

III.4.1.1. Determinación de fósforo (P)

El Fósforo se determinó por el método de Gomori. (Gomori, 1993)

III.5. Determinaciones en el modelo experimental *in vivo*

III.5.1. Determinación del consumo de dieta e ingesta de Ca.

El consumo de dieta fue registrado cada dos o tres días utilizando una balanza analítica Mettler con precisión de ± 0.1 g para calcular la ingesta diaria y total de cada dieta. Posteriormente con el dato de concentración de calcio en las dietas se calculó la ingesta diaria de calcio.

III.5.2. Absorción aparente de Ca (%ABS)

Tres días antes de finalizar la experiencia se midió el consumo de alimento y se recogieron las heces. Las dietas y las heces se mineralizaron y se determinó el calcio según se describió en la sección III.2.6, posteriormente se calculó la absorcion aparente de calcio de acuerdo a la siguiente fórmula:

% de Absorción Aparente de Ca = $\left(\frac{Ingerido - Fecal}{Ingerido}\right) * 100$

III.5.3. Determinación de la densidad mineral ósea (DMO)

Previo al sacrificio de los animales se determinó la densidad mineral ósea. Las ratas fueron anestesiadas con 0,1 mg de chorhidrato de ketamina/100 g de peso corporal + 0,05 ml de xilazina.

La DMO se midió en un Densitómetro DPX Alpha 8034, Lunar Radiation Corporation (Madison, WI, Estados Unidos) con software especial para pequeños animales. Con los datos obtenidos se calcularon la DMO de fémur, columna y tibia proximal.

III.5.4. Peso y pH del ciego

Después del sacrificio, se extrajo el ciego sobre el cual se determinaron el peso del ciego y el pH del contenido cecal, como parámetros para evaluar el efecto de la fermentación colónica de las diferentes dietas administradas.

III.5.5. Medidas y composición ósea

Se extrajeron los fémures derechos, se secaron durante 72 horas en estufa a 100°C y se eliminó el tejido graso sumergiéndolos durante 15 días, en una mezcla de cloroformo: metanol (3:1). Luego se secaron en estufa durante 48 horas a 100°C, para determinar:

a) **Longitud del hueso:** con Vernier, con una aproximación de 1:20 mm.

b) **Peso del hueso:** con una balanza analítica Mettler con precisión ± 0,1 mg.

Posteriormente se calcinaron, mediante mineralización por vía seca, en mufla a 700°C, hasta aspecto blanco cristalino.

Sobre las cenizas obtenidas se determinaron el % de Ca y P. (mediante los métodos descritos en el capítulo III.2.6. y III.4.1.1.).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Composición nutricional de la galletita

Los resultados obtenidos del estudio realizado se presentan en la **Tabla** IV. 1.

Tabla IV. 1: Porcentaje de nutrientes en la galletita (%) en base seca.

Nutrientes	Porcentaje (%) (g/100g)
Proteína	11,7
Lípidos	19
Carbohidratos	60,4
Fibra TOTAL	6,2
I. FD alto PM	4,1
II. Fructanos	2,1
Cenizas	2
Humedad	2,7
Calcio	0,296

La composición nutricional de la galletita reflejó en términos energéticos un balance adecuado que se adapta bastante a las recomendaciones actuales. %P: 10.4, %G: 37.2 y %CHO: 52.4, teniendo en cuenta que una dieta equilibrada tiene que tener %P: 10-15, %G: 25-30 y %CHO: 55-65, En cuanto al contenido de fibra dietaria total, que incluye la FD de alto PM y la fibra prebiótica (Fructanos) nos permitiría calificarlo como un alimento rico en fibra. (CAA, 2013).

La ingesta de dos porciones de 30 g de galletitas por día cubre el 18% de la ingesta recomendada de calcio para un niño en edad escolar.

IV.2. Cálculo de la ingesta de dieta y de la ingesta Ca durante la experiencia.

En la **Tabla IV. 2** se detalla la ingesta total en gramos durante 60 días, la ingesta diaria en g/día y la ingesta diaria de calcio en mg/día de las dietas DG, DF y DC.

Tabla IV. 2: Ingesta de dieta total (g/60 días), ingesta de dieta diaria (g/día), e ingesta diaria de Ca (mg/día) en los tres grupos experimentales.

	p	**D. Control**	**D. Fructanos**	**D. Galletita**
Ingesta total (g/ 60 días)	*< 0.0001*	1089 ± 94 [a]	854 ± 83 [b]	1262 ± 113 [c]
Ingesta diaria (g/día)	*< 0.0001*	18,8 ± 1,6 [a]	15,1 ± 1,9 [b]	20,8 ± 1,8 [a]
Ingesta Ca (mg/día)	*< 0.0001*	93,8 ± 8,0 [a]	75,5 ± 9,6 [b]	56.2 ± 4.9 [c]

Datos expresados como promedio ± desvío estándar. Se realizó test de la varianza (ANOVA) y las diferencias intragrupo a posteriori se analizaron mediante el test de Bonferroni. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas.

La ingesta de dieta expresada en g/60 días del grupo DG fue superior a DC y a DF respectivamente *(p<0.0001)*. Cuando se calculó la ingesta en g/día, DG presentó una ingesta mayor a DF, pero sin diferencias significativas con respecto a DC. DF presentó la menor ingesta de dieta tanto a lo largo de la experiencia como en g/día.

Este aumento en el consumo de DG podría adjudicarse a las características organolépticas de la galletita. (Marcel Roberfroid, 2007a).

El menor consumo de dieta DF, con respecto a los demás grupos, se podría adjudicar al efecto sobre la saciedad de los fructanos, estudiado por numerosos autores. (Fernández-Bañares F & Gassull, 1992)

El contenido de calcio en las dietas medido por espectrofotometría de absorción atómica fue de 0.5 g Ca/100 g para DC y DF g y de 0.27 g/100 g para DG.

Estas diferencias halladas se deben a que la galletita fue diseñada de manera tal, de cubrir aproximadamente el 50% de los requerimientos de calcio de las ratas. Por lo tanto, de los tres grupos, DG fue el que presentó la menor ingesta de calcio diaria *(p < 0,0001).*

IV.3. Determinaciones de peso del ciego, pH cecal, excreción fecal de Ca y % de absorción aparente de Ca

Con el objeto de corroborar la relación entre la fermentación colónica y la biodisponibilidad de calcio se registró el peso y pH del ciego,

Se calculó la excreción fecal de calcio diaria y el % de absorción aparente de calcio en los animales de experimentación. (**Tabla IV. 3)**

Tabla IV. 3: Peso del ciego (g), pH cecal, ingesta de Ca (mg/día), excreción fecal de Ca diaria (mg/día) y porcentaje de absorción aparente de Ca (% ABS) de los tres grupos experimentales.

	p	**D. Control**	**D. Fructanos**	**D. Galletita**
Peso ciego (g)	< *(0.0001)*	3,05 ± 0,25 [a]	5,93 ± 0,28 [b]	6,19 ± 0,53 [b]
pH ciego	< *(0.0001)*	6,97 ± 0,18 [a]	5,52 ± 0,22 [b]	5,74 ± 0,18 [b]
Ingesta Ca (mg/día)	< *(0.0001)*	121,7 ± 19,9 [a]	104,7 ± 14,7 [b]	59,8 ± 8,4 [c]
Excreción fecal de Ca (mg/día)	< *(0.0001)*	34,8 ± 4,4 [a]	15,2 ± 9,7 [b]	17,2 ± 2,0 [c]
Absorción Ca (% ABS)	< *(0.0001)*	71,4± 3,3 [a]	85,4 ± 9,6 [b]	70,2 ± 4,9 [a]

Datos expresados como promedio ± desvío estándar. Se realizó test de la varianza (ANOVA) y las diferencias intragrupo *a posteriori* se analizaron mediante el test de Bonferroni. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas.

El peso del ciego de los grupos DG y DF fue mayor y el pH cecal menor con respecto a DC *(p < 0,001)*, sin existir diferencias significativas entre ambas dietas. El

aumento de peso del ciego y la disminución del pH del contenido cecal serían consecuencia de la fermentación de los fructanos contenidos en las dietas DF y DG por la microflora intestinal.

Como concecuencia de esta fermentación se produjeron AGCC, los cuales aumentarían la absorción de cationes, tales como el calcio. (Lavanda et al., 2011).

Si observamos la eliminación fecal y el % de absorción aparente de calcio, DG presentó menor excreción fecal con respecto a DC y DF *(p<0.0001)* mientras que el % de absorción aparente de calcio de DG con respecto a DC no presentó diferencias significativas *(p< 0,001).* La baja eliminación y el alto porcentaje de absorción aparente de calcio del grupo DG, implicarían una alta retención del calcio ingerido, debido a la presencia de los fructanos en la formulación de la galletita. El "efecto fructanos ", pudo visualizarse en la dieta DF que presentó la mayor absorción aparente de los tres grupos *(p<0.0001)*.

Estos resultados también fueron observados por otros investigadores, Rémésy et al, fueron los primeros en encontrar un aumento de la absorción de calcio en ratas alimentadas con fructanos tipo inulina al 15% p/p (Rémésy et al, 1993; M. Roberfroid, 2007). Por otra parte, Delzenne, et al., demostraron en diversos ensayos que la mezcla de inulina y oligofructosa al 10%, aumentaba la absorción aparente de calcio de la dieta al igual que en este trabajo (Delzenne et al., 1995).

IV.4. Determinación del contenido mineral óseo y densidad mineral ósea de fémur, columna y tibia

En la **Tabla IV. 4** se pueden observar los valores de contenido mineral óseo corporal total (CMO) expresado en g, la densidad mineral ósea de columna (DMO c), fémur

(DMO f) y tibia proximal (DMO t) de los tres grupos de animales experimentales al finalizar la experiencia.

Tabla IV. 4: Contenido mineral óseo total (CMO) (expresado en g), densidad mineral ósea del fémur derecho, (DMO f), densidad mineral ósea de columna (DMO c) y densidad mineral ósea de tibia proximal (DMO t), a los 60 días en los tres grupos experimentales.

	p	**D. Control**	**D. Fructanos**	**D. Galletita**
CMO (g)	*< (0.001)*	3,693 ± 0,641 [a]	5,374 ± 1,060 [b]	5,107 ± 0,531 [b]
DMO f (mg/cm^2)	*< (0.01)*	263,2 ± 16 [a]	278 ± 11,6 [b]	287,5 ± 13 [b]
DMO c (mg/cm^2)	*< (0.001)*	231,5 ± 10,6 [a]	269,4 ± 25,7 [b]	264,7 ± 9,9 [b]
DMO t (mg/cm^2)	*< (0.0001)*	220,1 ± 15,3 [a]	266 ± 14,8 [b]	242,3 ± 16 [c]

Datos expresados como promedio ± desvío estándar. Se realizó test de la varianza (ANOVA) y las diferencias intragrupo a posteriori se analizaron mediante el test de Bonferroni. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas.

El CMO de los grupos DG y DF fue significativamente mayor a DC *($p < 0,001$)*.

La DMO por áreas mostró que, DG y DF presentaron mayores DMO f *($p < 0,01$)*, DMO c *($p<0.001$)* y DMO t *($p<0.001$)* que DC, existiendo pequeñas diferencias significativas entre ambos grupos para la DMO t (Tabla IV.4).

Bosscher et al., investigaron los cambios en el contenido mineral óseo del cuerpo entero en ratas *($p = 0,02$)*, luego del consumo de una dieta con inulina (10%) y con bajas, medias o altas concentraciones de calcio, lo cual produjo un aumento del contenido mineral óseo, lo cual se corroboró en el presente estudio (Bosscher et al., 2006;Roberfroid et al., 2002).El efecto de la mezcla de inulina y la oligofructosa sobre la densidad mineral ósea fue investigado por Ohta et al., que reportó un ligero

pero significativo aumento en la densidad mineral ósea del fémur (+ 5%) (Ohta et al., 1998).

Adicionalmente Roberfroid reportó que dietas conteniendo inulina en un porcentaje de 5 y 10% p/p y bajo contenido en calcio (0,2%), producían un aumento de la retención de calcio a pesar de que la cobertura de calcio era menor al 50% de las recomendaciones para esos animales de la misma manera que se evidenció en el presente trabajo (Roberfroid et al., 2002).

Por otra parte, Kruger realizó estudios en modelos animales alimentados con oligofructosa (DP2-8), inulina (DP> 23) y una mezcla de 92% de inulina y 8% de oligofructosa de cadena corta (DP2-8), demostrando que la medición de la densidad mineral ósea en fémur y columna presentó valores mayores en el grupo alimentado con inulina (DP> 23) (Kruger et al., 2003)

IV.5. Determinaciones de Ca y P en los fémures derechos de los animales.

En la **Tabla IV. 5** se pueden observar los siguientes parámetros óseos en los fémures derechos de las ratas de los grupos experimentales: peso (mg), longitud (cm), contenido de Ca y P (mg/100 g fémur) y la relación entre estos dos minerales Ca/P (mg/mg).

Tabla IV. 5: Peso, longitud, contenido de Ca y P y relación de Ca/ P en fémur derecho de las ratas de los tres grupos experimentales.

	p	**D. Control**	**D. Fructanos**	**D. Galletita**
Peso Fémur (mg)	*(0.07)*	503,5 ± 37,4	523,3 ± 50	552,8 ± 30,8
Longitud Fémur (cm)	*< (0.01)*	1,84 ± 0,08 [a]	1,69 ± 0,16 [b]	1,88 ± 0,08 [a]
Ca en Fémur (mg/100 g Fémur)	*< (0.001)*	21,0 ± 0,5 [a,b]	20,4 ± 0,6 [a]	21,7 ± 0,9 [b]
P en Fémur (mg/100 g Fémur)	*< (0.0001)*	12,6 ± 1,2 [a]	12,3 ± 0,5 [a]	9,9 ± 0,6 [b]
Relación Ca /P en Fémur (mg/mg)	*< (0.0001)*	1,67 ± 0,12 [a]	1,66 ± 0,09 [a]	2,19±0,08 [b]

Datos expresados como promedio ± desvío estándar. Se realizó test de la varianza (ANOVA) y las diferencias intragrupo a posteriori se analizaron mediante el test de Bonferroni. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas.

Los tres grupos experimentales no mostraron diferencias significativas en el peso de los fémures *(p< 0,007)* sin embargo DG tuvo una mayor longitud con respecto a DF *(p < 0,01)* pero no con respecto a DC. El contenido de calcio en fémur de DG fue mayor a DF *(p < 0,05),* sin diferencias con respecto a DC. El contenido de fósforo de DG fue significativamente menor a DF y a DC *(p < 0,0001)*; por consiguiente, la relación calcio/fósforo del grupo DG fue la mayor de los tres grupos *(p< 0.0001),* lo cual indica la posibilidad de una mejor osificación que con las dietas de los otros grupos. Estos resultados coinciden con trabajos realizados por otros autores. Richardson trabajando con modelos experimentales en ratas, encontró un aumento significativo del 14%, del contenido de calcio en fémur con respecto a la dieta control, luego de administrar dietas con inulina durante 12 semanas (Richardson et al., 2002).

IV.6. Estudios en humanos

Los hallazgos obtenidos en el presente trabajo de investigación permiten corroborar los resultados observados en humanos en diferentes estudios. En la siguiente tabla se muestra una revisión de trabajos realizados en diferentes grupos poblacionales en los cuales se estudiaron los efectos del consumo de fructanos, tipo inulina sobre la absorción de calcio.

Tabla IV. 6 Relación carbohidrato ingerido, dosis administrada (g/día), duración (días), grupo etário y número de participantes evaluados.

Carbohidrato	Dosis (g/día)	Duración (días)	Grupo etário	*n*	Efecto	Referencia
Inulina **Oligofructosa**	1,3 3,5	1	Niños Jovenes y adultos	15.000	N E	(Moshfegh et al., 1999)
Mezcla de inulina y oligofructosa	0.4	-	Formula para infantes	-	↑	(Bosscher et al., 2003)
Oligosacáridos (GOS, FOS)	0,8 relacion 9:1	30	Lactantes prematuros	15	↑	(Lidestri et al., 2003)
Mezcla de inulina y oligofructosa	8	21	Niñas	59	↑	(Griffin et al., 2002) [a]
Mezcla de inulina y oligofructosa	8	21	Niñas	54	↑	(Griffin et al., 2003) [b]
Fructanos tipo inulina de bajo y alto GP	8	60	Jovenes	98	↑	(Abrams et al., 2007) [a]
Inulina	40	28	Hombres jovenes sanos	9	↑	(Coudray et al., 1997)
Oligofructosa	15	9	Hombres jovenes sanos	12	↑	(Van den et al., 1999)
Inulina	15	1	Jovenes sanas	15	N E	(Teuri et al., 1999)
Inulina	8	60	Jovenes en pubertad	48	↑	(Abrams et al., 2005) [b]
Inulina	0.75, 1.00 y 1.25	30	Bebés sanos	36	N E	(Yap et al., 2005)
Inulina	9	21	Jovenes adolesentes	14	N E	(Martin et al., 2010)

↑: Efecto positivo absorción aparente de calcio
N E: Ningun efecto (sin diferencias significativas)

Los resultados obtenidos en los trabajos de investigación de diversos autores, mostraron que el consumo diario de mezcla de inulina y oligofructosa aumenta la absorción de calcio, dependiendo de la edad cronológica y fisiológica de los individuos sanos con un consumo de cantidades adecuadas de calcio. Se demuestra la necesidad de realizar ensayos en los que la absorción de calcio y la densidad mineral ósea se midan a largo plazo involucrando tanto a los adolescentes como a niños en edad preescolar.

V. CONCLUSIONES

- ✓ Se pudo comprobar la fermentabilidad de la fibra elegida a través de los cambios producidos a nivel colónico (pH y peso cecal), luego de ingestión de la dieta experimental que aumentó la biodisponibilidad del calcio con una ingesta de calcio mucho menor.
- ✓ La galletita diseñada produjo un aumento de la absorción y retención del calcio en el modelo animal llevado a cabo, lo cual enfatiza la importancia de la matriz alimentaria elegida.
- ✓ Los resultados obtenidos con el diseño del alimento planteado en este trabajo, permitirían la obtención de un producto saludable y de gran impacto en la salud ósea de la población infantil a fin de prevenir problemas futuros como la osteopenia y la osteoporosis.

Químico de Alimentos
RUTH MARGARITA PARDO GONZÁLEZ

Directora M. Sc. ÁNGELA ZULETA

Coodirectora Dra. ADRIANA WEISSTAUB

VI. REFERENCIAS

Abrams, S. A., Griffin, I. J., & Hawthorne, K. M. (2007). Young Adolescents Who Respond to an Inulin-Type Fructan Substantially Increase Total Absorbed Calcium and Daily Calcium Accretion to the Skeleton 1 – 3, *137*, 2524–2526.

Abrams, S. A., Griffin, I. J., Hawthorne, K. M., Liang, L., Gunn, S. K., Darlington, G., & Ellis, K. J. (2005). A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *82*(1), 471–476.

AIN-93 G. (2013). AIN-93 G Growth Purified Diet. *Formulated for the Growth of Adult, Non-Reproducing Rodents. Harlan Laboratories, Inc.*, *#5801-G*(123), 1.

American Society for Bone and Mineral Research. (2013). *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. *The Endocrinologist* (Vol. 4). http://doi.org/10.1002/9780470623992

AOAC 991.43. (1995). ANNEX G AOAC Official Method 991.43 Total, Soluble, and Insoluble Dietary Fibre in Foods. *AOAC Official Methods of Analysis. Cereal Foods.Charper 32, P.*, (7), 1–4.

Araya, H., Zuleta, Á., Lutz, M., León, A. E., Alviña, M., & Añón, M. C. (2009). *Book. Aspectos nutricionales y saludables de los productos de panificación*. (A. Zuleta & H. Araya, Eds.), *IV. Hidratos de carbono como ingredientes funcionales* (Universida). Valparaiso, CHILE: Lutz, Mariane León, Alberto Edel.

Beneo Orafti® Synergy1. (2012). Orafti® Synergy 1. *Connecting Nutrition and Health*, *1*, 12.

Bosscher, D., Deelstra, H., Caillie-bertrand, M. V, & Cauwenbergh, R. V. (2003). Availabilities of calcium , iron , and zinc from dairy infant formulas is affected by soluble dietary fibers and modified starch fractions. *Nutrition, BASIC NUTRITIONAL INVESTIGATION*, *19*, 641–645. http://doi.org/10.1016/S0899-9007(03)00063-7

Bosscher, D., Van Loo, J., & Franck, A. (2006). Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. *International Dairy Journal*, *16*(9), 1092–1097. http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.028

Burkitt, D. P., & Trowell, H. C. (1976). Refined Carbohydrate and Disease. *Academic Press INC , New York. (Book)*, *10003*, 27–30. Retrieved from 0-12-144750-2

CAA. (2013). ANMAT, Capítulo XVII: Alimentos de Regimen o Dietéticos. *Codigo Alimentario Argentino*, *Artículos:*(3), 2–64.

Coudray, C., Bellanger, J., CastigliaDelavaud, C., Remesy, C., Vermorel, M., & Rayssignuier, Y. (1997). Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *European Journal of Clinical Nutrition*, *51*(6), 375–380. http://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600417

Delzenne, N., Aertssens, J., Verplaetse, H., Roccaro, M., & Roberfroid, M. (1995). Effect of fermentable fructo-oligosaccharides on mineral, nitrogen and energy digestive balance in the rat. *Journal Life Sciences*, *57*(17), 1579–1587.

ENNyS. (2007). Encuesta Nacional de Nutricion y Salud. *Presidencia de La Nación,*

Plan Federal de Salud, *1*, 1–183.

Fernández-Bañares F, & Gassull, M. (1992). Metabolismo colónico de la fibra dietética: efectos fisiológicos y posibles indicaciones de los ácidos grasos de cadena corta. *Gastroenterol Hepatol*, *15*(9), 536–542.

Fernandez, D. A., Sosa, D. P., Setton, D. D., Virginia, D., Fabeiro, D. M., Maria, D., … Hernandez, D. J. (2011). Calcio y Nutrición. *Comité Nacional de Nutrición Sociedad, Sociedad Argentina de Pediatría, Buenos Aires.*, 2–29.

Food and Nutrition Board; Institute of Medicine; National Academies. (2011). DRI-2011(E+V). Dietary Reference Intakes (DRIs): Vitamins and Elements. *Food and Nutrition Board; Institute of Medicine; National Academies*, (1997), 10–12.

Franck A. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications: Chapter 10: Inulin*. *Taylor & Francis Group*. http://doi.org/doi:10.1201/9781420015164.ch6\r10.1201/9781420015164.ch6

Fuentes, F. M., Mendoza, R. A., Rosales, A. L., & Cisneros, R. A. (2008). *Guia de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Raton*. *Instituto Nacional de salud*. Retrieved from www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA_ANIMALES_RATON.pdf

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, *125*(6), 1401–1412. http://doi.org/10.1079/NRR200479

Gomori, G. A. (1993). Determination of phosphorus by Semi-automated Colorimetry. Method 365.1. *Journal ofLaboratory and Clinical Medicine*, *2.0*(955–960), 1–13.

Griffin, I. . J., Davila, P. M., & Abrams, S. A. (2002). Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes †. *British Journal of Nutrition*, *87*(2002), 187–191. http://doi.org/10.1079/BJN/2002536

Griffin, I. J., Hicks, P. . . D., Heaney, R. P., & Abrams, S. A. (2003). Enriched chicory inulin increases calcium absorption mainly in girls with lower calcium absorption. *Nutrition Research*, *23*(7), 901–909. http://doi.org/10.1016/S0271-5317(03)00085-X

Guillotg, C., & del Monte, A. (2015). Prebiòticos y sus beneficios en la alimentaciòn. *Revista Gastrohnup*, *17*(3), 18–25.

Kruger, M. C., Brown, K. E., Collett, G., Layton, L., & Schollum, L. M. (2003). The effect of fructooligosaccharides with various degrees of polymerization on calcium bioavailability in the growing rat. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *228*(6), 683–8. Retrieved from http://ebm.sagepub.com/content/228/6/683.full

Lavanda, I., Saad, S. M. I., Lobo, A. R., & Colli, C. (2011). Prebiotics and their effect on calcium bioavailability | Prebióticos y su efecto en la biodsponibilidad del calcio. *Revista de Nutrição Campinas*, *24*(2), 333–344. http://doi.org/10.1590/S1415-52732011000200014

Lezcano, E. (2015a). Galletitas y Bizcochos : Tecnología y Proceso de Elaboración Galletitas y Bizcochos. *Ministerio de Agricultura, Alimentos Argentinos*, *1*, 1–11.

Lezcano, E. (2015b). Galletitas y Bizcochos 2015. *Alimentos Argentinos, Ministerio de Agricultura. Art 766*, *1*, 2–37.

Lidestri, M., Agosti, M., Marini, A., & Boehm, G. (2003). Oligosaccharides might

stimulate calcium absorption in formula-fed preterm infants. *Acta Paediatrica Supplement*, *92*(441), 91–92.

Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). d. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *57*(4), 387–396. http://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2006.00230.x

Maiyar, A. C., & Norman, A. W. (1992). Effects of sodium butyrate on 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor activity in primary chick kidney cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *84*(1–2), 99–107.

Martin, B. R., Braun, M. M., Wigertz, K., Bryant, R., Zhao, Y., Lee, W., … Weaver, C. M. (2010). Fructo-oligosaccharides and calcium absorption and retention in adolescent girls. *Journal of the American College of Nutrition*, *29*(4), 382–386.

Moshfegh, A. J., Friday, J. E., Goldman, J. P., & Chug Ahuja, J. K. (1999). Presence of inulin and oligofructose in the diets of Americans. *The Journal of Nutrition*, *129*(7 Suppl), 1407S–1411S.

Mota-Blancas, E., & Perales-Caldera, E. (1999). Los mecanismos de absorción de calcio y los modificadores de absorción con base para la elaboración de una dieta de bajo costo para pacientes osteoporóticas. *Gaceta Medica de México*, *135*(3), 291–304.

Ohta, a, Motohashi, Y., Ohtsuki, M., Hirayama, M., Adachi, T., & Sakuma, K. (1998). Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin-D9k differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. *The Journal of Nutrition*, *128*(6), 934–939.

Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Dieta*

(Buenos Aires), *25*(119), 20–33.

OMS/FAO. (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. *Organización Mundial de La Salud, Ginebra*, *916*, 1–152. http://doi.org/0509-2507

Perkin Elmer Coorporation. (1996). Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy. *Analytical Methods*, 216.

Pita Martín de Portela, M. (2003). Vitaminas y Minerales en Nutrición. *Ed. La Prensa Medica Argentina*, *2da Edició*, 92–99. Retrieved from 950-505-196-4

Rémésy, C., Levrat, M. A., Gamet, L., & Demigné, C. (1993). Cecal fermentations in rats fed oligosaccharides (inulin) are modulated by dietary calcium level. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *264*(5), 855–862.

Richardson, J. E., Verghese, M., Walker, I. A., Bonsi, I. A., Howard, C., Shackelford, L., & Chawan, C. B. (2002). *Effects of prebiotics on bone mineralization in Fisher 344 male weanling rats. Institute of Food Technology, Annual Meeting, Annaheim, CA*.

Roberfroid, M. (2007). Inulin-type fructans - Functional Food Ingredients art. *The Journal of Nutrition*, (b), 2493–2502.

Roberfroid, M. B. (1999). What is beneficial for health? The concept of functional food. *Food and Chemical Toxicology*, *37*(9–10), 1039–1041. http://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00080-0

Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*,

93(1), 13–25. http://doi.org/10.1079/BJN20041350

Roberfroid, M. B., Cumps, J., & Devogelaer, J. P. (2002). Dietary Chicory Inulin Increases Whole-Body Bone Mineral Density in Growing Male Rats. *Journal of Nutritions*, *132*, 3599–3602.

Teuri, U., Ka¨rkka¨inen, M., Lamberg-Allardt, C., & Korpela, R. (1999). Addition of inulin to breakfast does not acutely affect serum ionized calcium and parathyroid hormone concentrations. *Ann Nutr Metab*.

Van den, H. E., Muys, T., van Dokkum, W., & Schaafsma, G. (1999). *Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents*. *The American Journal of Clinical Nutrition* (First edit). Elsevier Inc.

Van Loo, J., Coussement, P., de Leenheer, L., Hoebregs, H., & Smits, G. (1995). On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *35*(6), 525–526. http://doi.org/10.1080/10408399509527714

Yap, K. M., Mohamed, S., Yazid, A. M., Maznah, I., & Meyer, D. M. (2005). Dose-response effects of inulin on the faecal short-chain fatty acids content and mineral absorption of formula-fed infants. *Nutrition & Food Science*, *35*(4), 208–219.

Zuleta A. (2001) Inulin Determination for Food Labeling.Agric.Food.Chem, 49, 4570-72.