

Quitosanos y sus derivados como fibra dietaria. Utilización para alimentos lácteos funcionales y su efecto en la disponibilidad de nutrientes”

Dra. Marina Dello Staffolo- PLAPIQUI (CONICET-UNS) Bahía Blanca

Introducción

La quitina es un amino-polisacárido que contiene enlaces β -(1,4) como los que posee la celulosa. Es un componente de los exoesqueletos de los artrópodos marinos (como cangrejos y langostas) y de las paredes celulares de muchos hongos. El quitosano, es un polímero de glucosamina que se obtiene por la desacetilación de la quitina. También, se han obtenido los quitooligosacáridos (COS) mediante la hidrólisis del quitosano. Los COS tienen un tamaño molecular más pequeño que el quitosano y, por lo tanto, menor viscosidad y mayor solubilidad en soluciones acuosas. Ambos compuestos son carbohidratos resistentes a la hidrólisis por las enzimas alimentarias humanas, por lo que se los utiliza como nuevas fuentes de Fibra Dietaria (Westenbrink y col., 2013). Además, son biocompatibles y no tienen toxicidad en los órganos animales (Muzzarelli, Terbojevich y Cosani, 1996). Como moléculas bioactivas, los COS muestran efectos antitumorales “in vivo” e “in vitro”, aumento de la absorción de calcio y aumento de la resistencia ósea, beneficios en el tratamiento del asma y modulación de la obesidad y la inflamación asociada (Baboota y col., 2013).

La ingesta de fibra puede influenciar en diferentes formas la absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal. Se denomina biodisponibilidad a la cantidad de nutriente que está disponible para su absorción en la forma química que es fisiológicamente utilizable (Van Campen y col., 1999). En el caso de glucosa, un aumento en el contenido total de fibra de los alimentos ingeridos puede disminuir la respuesta glicémica (Goff y col., 2018). No obstante, algunos carbohidratos no-digeribles pueden impedir la absorción de minerales y elementos traza en el intestino delgado debido a la capacidad de unión o secuestro de átomos o moléculas que poseen por la presencia de residuos de ácido galacturónico y ácido fítico (Tungland y col., 2002). El ion calcio (Ca^{++}) regula procesos fisiológicos (formación de huesos y dientes) y bioquímicos (excitabilidad muscular, coagulación sanguínea, procesos secretorios de proteínas y hormonas, integridad y transporte en la membrana plasmática, reacciones enzimáticas) importantes. Para asegurar estos procesos, la concentración plasmática es mantenida dentro de límites muy estrechos por un sistema regulador formado por las hormonas paratiroidea y calcitriol en el cual interviene la proteína fijadora de calcio generada por las células epiteliales intestinales. El hierro se absorbe como Fe^{2+} en todas las porciones del intestino delgado por un mecanismo en el cual interviene la proteína apotransferrina (Guyton, 1992).

Existen distintas maneras de estudiar la disponibilidad de nutrientes. Hay estudios en personas del balance de nutrientes (tienen en cuenta la ingesta y excreción de los mismos), estudios con animales de experimentación y estudios “in vitro”, es decir realizados a escala de laboratorio. Estos últimos ofrecen una alternativa a los estudios en animales o humanos, son relativamente simples, rápidos, permiten mejor control de los factores intervinientes, y proveen de información válida (Luccia y Kunkel, 2002). El objetivo es simular el tracto digestivo humano ya sea el ambiente del estómago, del intestino delgado, del intestino grueso o ambos dependiendo de la hipótesis a estudiar.

El propósito de los trabajos realizados en este campo, fue estudiar en primer término, la influencia del quitosano adicionado a un alimento modelo como el yogur, en la disponibilidad de glucosa (macronutriente), calcio (macromineral) y hierro (micromineral) por medio de una simulación “in vitro” del entorno gastroduodenal. En un estudio posterior, se evaluó la influencia de la adición de COS en la absorción de lípidos mediante la evaluación de la lipólisis, el perfil de los ácidos grasos y el contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en yogures luego de su digestión empleando el mismo modelo gastroduodenal. En ambos casos, también se emplearon fibras de otros orígenes para comparar y valorar los hallazgos obtenidos.

Simulación química del ambiente gastroduodenal y técnicas analíticas empleadas

El modelo experimental tenía como fin reproducir en el laboratorio, las reacciones que tienen lugar en el estómago y duodeno del ser humano. En los ensayos para estudiar la disponibilidad de glucosa se utilizaron mezclas conteniendo yogur, fibra y glucosa. Para calcular la cantidad de glucosa a utilizar se tuvieron en cuenta los carbohidratos disponibles de una dieta humana mixta y una concentración de glucosa en el volumen final de digesto que proporcionara absorbancias medibles con el espectrofotómetro. Los ensayos para estudiar la disponibilidad de calcio se realizaron sin adición de calcio exógeno debido que el yogur es una importante fuente de este mineral en la dieta humana (de la Fuente y col., 2003). Los experimentos para estudiar la disponibilidad de hierro fueron desarrollados con mezclas conteniendo yogur, fibra y

100 mg de sulfato de hierro II, de acuerdo a los requerimientos nutricionales vigentes. La simulación digestiva fue llevada a cabo en los siguientes pasos:

a) Las mezclas correspondientes fueron homogeneizadas en HCL 0,1 M durante 60 minutos agitando a 37°C con pH 1,0-2,0, para reproducir el ambiente gástrico.

b) Luego, se procedió a aumentar el pH hasta 6,8-7,5 unidades, por adición de NaHCO₃ de 15 g/L e incrementar la velocidad de agitación simulando el pasaje del contenido estomacal al duodeno. La temperatura se mantuvo constante, pero la velocidad de la agitación fue aumentando desde 30 hasta 300 r.p.m. para reproducir el ambiente duodenal.

c) Para estudiar la disponibilidad de glucosa y calcio, las simulaciones digestivas se dejaron descansar por 15 minutos. Durante este lapso de tiempo hubo separación en dos fases. Luego, se tomaron alícuotas de la fase superior del digesto para determinar la concentración de glucosa y calcio.

d) Para estudiar la disponibilidad de hierro c/u de las simulaciones gastroduodenales se colocaron en tubos de diálisis compuestos por una membrana de celulosa (43 mm de espesor y 27 mm de diám.). Los tubos de diálisis se sumergieron en agua destilada, manteniéndose a 37° C con agitación por fuera del tubo. Esta membrana tenía el objetivo de simular la pared duodenal. A los 30 y 60 minutos se tomaron alícuotas de los dializados y se determinó el contenido de hierro en cada uno de ellos.

Las técnicas analíticas empleadas para cuantificar glucosa, calcio y hierro fueron: el método enzimático de la glucosa oxidasa (Wiener Lab Glicemia enzimatic AA Kit, Argentina), método espectrofotométrico con cresolfaleina complexona (Wiener Lab Ca-color Kit, Argentina) y el método espectrofotométrico con PBTS=piridil bis-fenil trazina sulfonato (Wiener Lab Fe-color Kit, Argentina), respectivamente (Rodríguez y col., 2008; Dello Staffolo y col., 2011).

Para realizar el perfil lipídico de los yogures adicionados con COS al 0,1% p/p antes y después de la simulación digestiva, se llevó a cabo la extracción de los lípidos con una solución de cloroformo/metanol 2:1 v/v, luego se realizó la metilación para extraer finalmente los metil ester de los ácidos grasos con n-hexano, lavados con NaOH 1.2% p/v. Estas muestras fueron secadas con corriente de nitrógeno líquido para llevar a cabo el análisis cromatográfico. Por otra parte, alícuotas de estas muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado para el análisis por resonancia magnética nuclear (NMR) para estudiar la lipólisis. Se utilizó un cromatógrafo 7890B equipado con espectrómetro de masas 5977A (Agilent Technologies). La composición de ácidos grasos fue expresada como porcentajes relativos. Los isómeros del CLA fueron identificados comparando sus tiempos de retención y sus perfiles de fragmentación con patrones internacionales. Los espectros 1H NMR de los lípidos extraídos fueron obtenidos con un espectrómetro Bruker Avance Ultrashield 300 MHz NMR (Vela Gurovic y col., 2015).

Resultados y discusión

Se observaron diferentes comportamientos macroscópicos durante las simulaciones llevadas a cabo para estudiar la disponibilidad de glucosa y calcio (Fig. 1) y la biodisponibilidad de hierro (Fig. 2), según el tipo de fibra adicionada a los yogures. Se conoce que el quitosano se disuelve en medio ácido como el que posee el estómago y no lo hace en medio alcalino. Por lo tanto, con el aumento del pH por el pasaje al duodeno, formó flóculos con el yogur. El psyllium produjo una dispersión viscosa; mientras que bambú, inulina, manzana y trigo conformaron junto con el yogur, una fase menos definida y más reducida que con las fibras ya mencionadas.



Fig. 1. Comportamiento de las fibras en la simulación digestiva para estudiar disponibilidad de Ca⁺⁺ y Fe⁺⁺



Fig. 2. Digestos con Hierro de la simulación antes de la diálisis. (1) Inulina, (2) Bambú, (3) Psyllium, (4) Quitosano, (5) Trigo y (6) Manzana

Se produjo una reducción significativa ($p < 0,05$) en la biodisponibilidad de la glucosa con quitosano ($17,7 \pm 2,1$), con psyllium ($15,3 \pm 1,8$ %), que fue menor con trigo ($9,5 \pm 2,1$ %) y con

inulina ($5,7 \pm 1,8 \%$). Por el contrario, manzana y bambú no redujeron la biodisponibilidad de glucosa en el sistema. Con respecto a la disponibilidad del calcio, el análisis estadístico confirmó que hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en el comportamiento de las diferentes fibras que estuvo dado principalmente por la gran reducción en la biodisponibilidad de calcio en presencia de quitosano ($21,0 \pm 2,5$) que forma flóculos y de fibra de manzana ($16,5 \pm 1,6$) que posee un 75% de fracción insoluble y un 25% de soluble. Sin embargo, según el test de Tukey no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en la reducción del calcio entre las fibras insolubles: trigo ($12,1 \pm 1,2$) y bambú ($11,0 \pm 1,2$) ni entre psyllium ($8,1 \pm 0,9$) e inulina ($7,0 \pm 0,9$) que son fibras parcial y totalmente solubles, respectivamente (Rodríguez y col., 2008).

En el estudio de la biodisponibilidad de hierro, los digestos antes de la diálisis que se observan en la figura 2 también presentan la formación de flóculos con quitosano y aumento de la viscosidad con psyllium. Solamente los yogures con fibra de manzana presentaron una coloración marrón más oscura que en los ensayos de glucosa y calcio. Esto pudo deberse a la presencia del sulfato ferroso. Algunos de los dializados se muestran en la figura 3 donde persisten los flóculos formados por el quitosano por dentro de la membrana que simula la pared digestiva. En la figura 4 se pueden apreciar los porcentajes de retención de hierro para los distintos yogures con y sin fibras a los 30 y 60 minutos de cada simulación.



Fig. 3- Etapa de diálisis de la simulación. (1) Psyllium, (2) Trigo, (3) Quitosano, (4) Yogur sin fibra

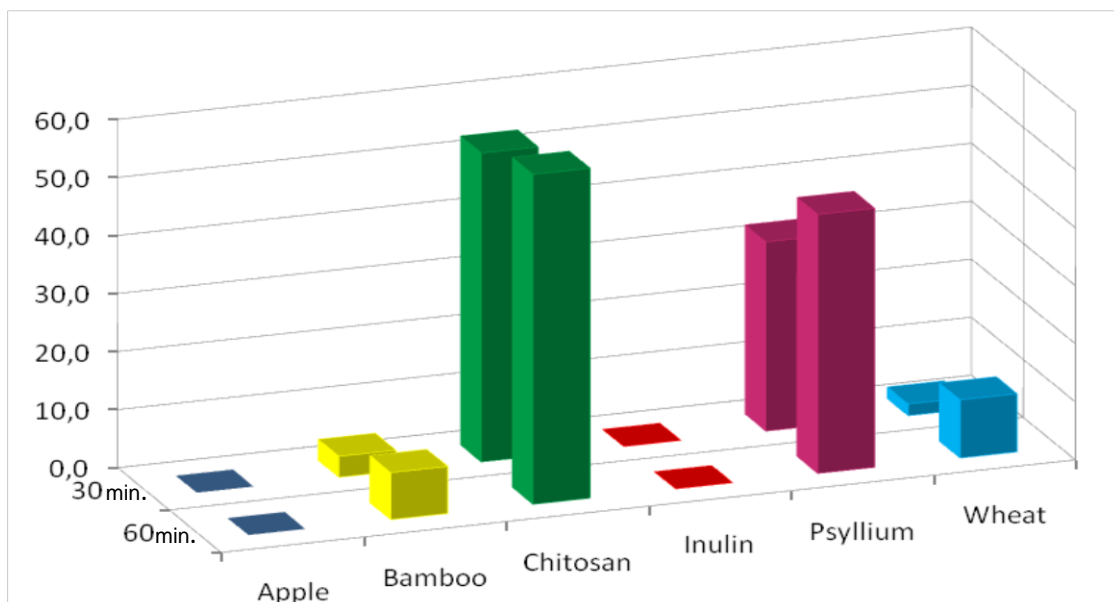


Fig. 4- Porcentajes de retención de hierro para los distintos yogures con fibras a los 30 y 60 minutos de la simulación.

Los yogures con quitosano presentaron el mayor porcentaje de retención tanto a 30 como a 60 minutos. De mayor a menor, prosiguieron los yogures con psyllium. Además, se observó que los yogures con bambú o con trigo, ambas fibras insolubles, se comportaron aumentando la retención de hierro luego de 60 minutos de diálisis y no se hallaron diferencias significativas

entre sus porcentajes de retención. Los yogures con fibra de manzana o con inulina no mostraron retención de hierro durante el ensayo (Dello Staffolo y col., 2011). Este hallazgo está de acuerdo con estudios de otros investigadores, en los cuales se indica que la inulina no interfiere con la absorción de hierro.

Los yogures adicionados con 0,1 % de COS luego de la simulación digestiva, no presentaron variaciones significativas en los perfiles lipolíticos y en el de los ácidos grasos, con excepción del CLA y sus isómeros que disminuyeron en presencia de 0,1% de COS, luego de la digestión "in vitro". Esto pone en evidencia que sustancias lábiles como el CLA pueden ser afectadas por la presencia de COS en sistemas químicos que semejan los procesos gastrointestinales (Vela Gurovic y col., 2015).

Conclusiones

Con los resultados de estos estudios se pudo concluir que la adición de quitosano disminuye la disponibilidad de glucosa, calcio y hierro, debido a la capacidad que posee de formar flóculos a pH alcalino como ocurre en el medio duodenal. Otras fibras utilizadas en estos ensayos tienen diferente comportamiento según su naturaleza química y según el nutriente estudiado. Los COS, adicionados a yogur en una concentración de 0,1% p/p solo afectan el contenido de CLA de éste producto lácteo. Es decir que, la adición de quitosano o sus derivados al yogur, puede ser utilizada como instrumento para formular un alimento que, siendo incorporado en dietas para personas con necesidades nutricionales específicas, permita aprovechar los beneficios para la salud, más allá del ámbito exclusivamente nutritivo, que se le atribuyen a estas sustancias en numerosos estudios clínicos.

Bibliografía

- Baboota, R.K., Bishnoi, M., Ambalam, P., Kondepudi, K.K., Sarma, S.M., Boparai, R.K. and Podili, K. (2013). Functional food ingredients for the management of obesity and associated comorbidities—A review. *Journal of Functional Foods*, 5, 997–1012.
- de la Fuente, M.A., Montes, F., Guerrero, G., Juárez, M. (2003). Total and soluble contents of calcium, magnesium, phosphorus and zinc in yogurts. *Food Chemistry*, 80, 573-578.
- Dello Staffolo M., Martino M., Bevilacqua A., Montero M., Rodríguez MS., Albertengo, L. (2011). Chitosan Interaction with Iron from Yoghurt Using an In Vitro Digestive Model: Comparative Study with Plant Dietary Fibers. *International Journal of Molecular Science*, 12, 4647-4660.
- Goff, H.D., Repina, N., Fabekb, H., El Khourya, D., Gidley, M.J. (2018). Dietary fibre for glycaemia control: Towards a mechanistic understanding. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 14, 39–53.
- Guyton, A. C. (1992). *Tratado de fisiología médica*. Editorial Interamericana-McGraw-Hill, México.
- Luccia, B.H.D., Kunkel, M.E. (2002). In vitro availability of calcium from sources of cellulose, methylcellulose, and psyllium. *Food Chemistry*, 77, 139-146.
- Muzzarelli, R.A.A., Terbojevich, M., y Cosani, A. (1996). Unspecific activities of lipases and amylases on chitosans. In R. A. A. Muzzarelli (Ed.). *Chitin enzymology* (Vol. 2, pp. 69). Grottammare, Italy: Atec.
- Rodríguez, M.S. y Albertengo, L. (2005). Interaction between chitosan and oil under stomach and duodenal digestive chemical conditions. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69, 2057–2062.
- Rodríguez, M.S.; Montero, M.; Dello Staffolo, M.; Martino, M.; Bevilacqua, A.; Albertengo, L. (2008). Chitosan influence on glucose and calcium availability from yoghurt: In vitro comparative study with plants fibre. *Carbohydrate Polymers*, 74, 797–801.
- Tungland, B. y Meyer, D., (2002). Nondigestible oligo- and Polysaccharides (Dietary Fiber): Their Physiology and Role in Human Health and Food. *Comprehensive Reviews in Food Science Safety – Institute of Food Technologist*, 3, 73 – 91.
- Van Campen, D.R.; Glahn, R. (1999). Micronutrients bioavailability techniques: Accuracy, problems and limitations. *Fields Crops Research*, 60, 93-113.
- Vela Gurovic M.S., Dello Staffolo, M., Montero, M., Debbaudt, A., Albertengo, L. y Rodríguez, M.S. (2015). Chitooligosaccharides as novel ingredients of fermented foods. *Food and Function*, 2015, 6, 3437.
- Westenbrink, S., Brunt, K., van der Kamp, J.-W. (2013). Dietary fibre: Challenges in production and use of food composition data. *Food Chemistry*, 140, 562–567.