

Alimentos funcionales

Repercusiones del consumo de mezclas calentadas de glucosa-lisina y glucosa-metionina sobre el calcio óseo

C. Delgado-Andrade, I. Seiquer y M.^a P. Navarro

Unidad de Nutrición. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Granada.

Resumen

Durante el tratamiento térmico de los alimentos puede desarrollarse la reacción de Maillard, que tiene lugar, fundamentalmente, entre los grupos carbonilo de azúcares reductores y los grupo amino proteicos. Los productos de la reacción de Maillard (PRM) pueden afectar la biodisponibilidad mineral por modificaciones de su forma físico-química en el alimento o en el lumen, alterando el proceso de absorción o su normal metabolismo. En este trabajo se estudió la influencia de PRM sobre aspectos de la biodisponibilidad del Ca *in vitro* e *in vivo*. Mezclas equimolares de glucosa-lisina (GL) y glucosa-metionina (GM) (40% humedad) fueron calentadas a 150° C durante 90 minutos (muestras GL₉₀ y GM₉₀, respectivamente). La solubilidad *in vitro* se midió adicionando cada muestra a una solución 3,75 mM Ca con pH y fuerza iónica del intestino; tras agitación y centrifugación se determinó el calcio soluble e insoluble. Un 3% de GL₉₀ y GM₉₀ se añadieron individualmente a la dieta AIN93-G para la obtención de las dietas D-GL₉₀ y D-GM₉₀. Con ellas y con la AIN93-G, como control, se alimentaron durante 21 días tres grupos de ratas Wistar, realizándose balance de calcio en la última semana y, tras sacrificio, extracción de distintos órganos. La presencia de GM₉₀ no afectó a la solubilidad del calcio; GL₉₀ la disminuyó ligeramente, quedando en ambos casos más del 94% soluble. El consumo de D-GL₉₀ y D-GM₉₀ no modificó la biodisponibilidad del elemento, utilizándose tan eficazmente como en la dieta control (57,6 ± 1,3%, 57,8 ± 2,3% y 63,9 ± 2,6% en las dietas control, D-GL₉₀ y D-GM₉₀, respectivamente). Sin embargo, la ingesta de los PRM produjo cambios en el metabolismo que disminuyeron el calcio óseo, acumulándose de forma compensatoria en otros órganos.

(Nutr Hosp 2005, 20:70-76)

Palabras clave: *Productos de la reacción de Millard, calcio, disponibilidad, hueso.*

Correspondencia: Cristina Delgado-Andrade
Unidad de Nutrición. Estación Experimental del Zaidín, CSIC
Camino del Jueves, s/n
18100 Armilla, Granada, España
E-mail: cdelgado@eez.csic.es

Recibido: 20-XI-2003.
Aceptado: 27-III-2004.

EFFECTS OF INTAKE OF HEATED MIXTURES OF GLUCOSE-LYSINE AND GLUCOSE-METHIONINE ON BONE CALCIUM

Abstract

During food thermal treatment Maillard's reaction may occur, which implicates mainly the carbonyl groups of reductory sugars and amino protein groups. Maillard's reaction products (MRP) may interfere with mineral bioavailability because of modifications of their physical-chemical moiety in the food or the lumen, disrupting the absorption process or its normal metabolism. In this study, we sought to investigate MRP influence on issues related to Ca bioavailability *in vitro* and *in vivo*. Equimolar mixtures of glucose-lysine (GL) and glucose-methionine (GM) (40% moisture) were heated at 150° C for 90 minutes (samples GL₉₀ and GM₉₀, respectively). *In vitro* solubility was measured by adding each sample to a 3.75 mM Ca solution at intestinal pH and ionic strength; after shaking and centrifugation, soluble and insoluble calcium was determined. Three percent of GL₉₀ and GM₉₀ were individually added to the AIN93-G diet to obtain D-GL₉₀ and D-GM₉₀ diets. Three Wistar rats groups were fed for 21 days with both diets and with AIN93-G as control, carrying out calcium balance during last week and extirpating various organs after sacrifice. GM₉₀ did not affect calcium solubility; GL₉₀ reduced it slightly, remaining in both cases more than 94% soluble. D-GL₉₀ and D-GM₉₀ did not modify calcium bioavailability, with as effective usage as with the control diet (57.6 ± 1.3%, 57.8 ± 2.3% and 63.9 ± 2.6% in control diet, D-GL₉₀ and D-GM₉₀, respectively). MRP intake produced, however, metabolic changes that decreased bone calcium, accumulating compensatorily in other organs.

(Nutr Hosp 2005, 20:70-76)

Key words: *Maillard's reaction products, calcium, bioavailability, bone.*

Introducción

El calcio es el catión más abundante, así como el quinto elemento más común en el organismo humano. Es, junto con la proteína, el elemento estructural más importante, participando, combinado con el fósforo, en la formación del hueso y el diente (más del 99% del Ca total corporal se encuentra en el esqueleto). Así, el desarrollo y mantenimiento del hueso es el mayor determinante de las necesidades de Ca¹. Además, interviene en multitud de funciones, como la conducción nerviosa, la contracción muscular, la coagulación sanguínea, la permeabilidad e integridad de las membranas celulares, las secreciones glandulares, etc.²⁻⁵. Debido a la importancia de todos estos aspectos, es de enorme interés identificar factores que puedan afectar la disponibilidad del calcio en la dieta, modificando su utilización y estatus nutritivo.

La reacción de Maillard, que se origina entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carbonilo de un azúcar reductor, es una de las reacciones, favorecidas por el calor, más típicas en los alimentos, aunque también ha sido observada en sistemas que no estaban expuestos a calentamiento, como es el caso de los productos almacenados a bajas temperaturas para su mejor conservación. Incluso se ha detectado en los organismos vivos, en los que se la relaciona directamente con los procesos de envejecimiento y con las complicaciones de la diabetes⁶. Las características de estos productos, así como la tasa de pardeamiento que llegan a alcanzar, dependen de varios factores, como la naturaleza y la razón molar de los reactantes, contenido de humedad, pH y temperatura, entre otros⁹.

La consecuencia nutritiva más significativa de la reacción de Maillard es la modificación de la proteína de la dieta, siendo la lisina el aminoácido más afectado⁸, aunque muchos otros pueden verse involucrados. La participación de la metionina resulta interesante, debido a que los aminoácidos azufrados suelen ser limitantes en muchas proteínas alimentarias, y a la posible toxicidad de los productos de la reacción de Maillard (PRM) formados con ella⁹.

El efecto de los PRM sobre la biodisponibilidad mineral se atribuye a su comportamiento como agentes quelantes de metales. Rendleman (1987)¹⁰ puso de manifiesto la importancia de estos productos en la quelación de iones metálicos en alimentos, al observar, en tostadas elaboradas con leche, una mayor capacidad para unir al Ca y al Cu respecto a las tostadas convencionales. Además, encontró una considerable unión al Ca en los pigmentos pardos del café. Sin embargo, algunos autores han observado que compuestos tempranos de la reacción de Maillard, como la fructosil-lisina, no muestran una unión significativa con el Ca, sugiriendo que el mineral se acompleja preferentemente con los PRM de mayor peso molecular¹¹.

Actualmente, parece haber quedado bien establecida la absorción intestinal de algunos PRM solubles de

bajo peso molecular¹². Se ha descrito que productos de la reacción más avanzados y con mayor peso molecular afectan la excreción y la absorción mineral¹³. En este sentido, ensayos llevados a cabo en ratas alimentadas con dietas adicionadas de mezclas calentadas de glucosa-glicina o xilosa-lisina mostraron un incremento de la digestibilidad del calcio, aunque también de su excreción urinaria¹⁴. En estudios posteriores, realizados también con PRM procedentes del sistema glucosa-glicina, no se puso de manifiesto efecto alguno sobre la digestibilidad del mineral cuando se trataba de ratas holoxénicas¹⁵. O'Brien y col. (1994)¹⁶, alimentando ratas con una dieta adicionada de un 0,5% de PRM del sistema glucosa-glutamato monosódico no observaron ningún efecto negativo sobre el balance de calcio. Otros estudios realizados usando como alimento leches infantiles en polvo o esterilizadas en botella evidenciaron que, aunque el calcio de las fórmulas esterilizadas en botella era disponible *in vitro*, era pobremente utilizado por las ratas recién nacidas. Los autores sugieren que este resultado podría explicarse por la interacción del calcio y la lactulosa y por la presencia de PRM avanzados, no absorbibles¹⁷.

Ya que muchos aspectos de la influencia de los PRM sobre la utilización del calcio de la dieta están aún por dilucidar, y debido al abundante consumo de estos productos en la dieta habitual humana, en el presente trabajo nos propusimos estudiar el efecto de los PRM sobre ciertos aspectos de la disponibilidad del Ca *in vitro* e *in vivo*.

Material y métodos

Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon utilizando glucosa (Merck, Darmstadt, Alemania), lisina y metionina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.). Mezclas equimolares de glucosa y lisina-HCl (muestra GL) o glucosa y metionina (muestra GM) (ambas con 40% de humedad) fueron calentadas en un horno (Selecta 2000210, Barcelona, España) a 150° C durante 90 min. (muestras GL₉₀ y GM₉₀, respectivamente), utilizando recipientes abiertos. Tras el calentamiento la reacción se detuvo como se describe en Delgado-Andrade (2002)¹⁸. El producto obtenido se extrajo con agua desmineralizada (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore Corp., Bedford, Mass., U.S.A.), se congeló a -20° C, se liofilizó (FTS System, INC., TDS-3, New York, U.S.A.) y se conservó en bolsas de polietileno a 4° C con silicagel hasta el momento de su utilización en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

El desarrollo del pardeamiento durante el tratamiento térmico se realizó mediante la medida de la absorbancia a 420 nm¹⁹ en un espectrofotómetro u.v./visible Milton Roy Spectronic-1201 (Rochester, N. Y., U.S.A.).

Ensayo de solubilidad in vitro

100 mg de cada muestra (GL, GL₉₀; GM, GM₉₀) fueron individualmente suspendidos en un volumen final de 10 ml de una solución 3,75 mM de Ca. Para semejar las condiciones intestinales, el pH y la fuerza iónica fueron ajustados en las soluciones que contenían las muestras a 6,5-7 y 0,165, respectivamente, usando NaOH 4N y KCl 1,65M¹⁰. Las soluciones fueron agitadas en baño a 25° C durante 2 h y centrifugadas a 8.000 r.p.m. (Hettinch Zentrifugen, Universal 30FR D-78532 Tuttligen) otras 2 h. Tras la centrifugación, se midió el contenido de Ca en las fracciones obtenidas. Los porcentajes de Ca soluble y precipitado fueron calculados a partir de la concentración inicial de Ca.

Preparación de las dietas

La dieta AIG-93G para ratas de laboratorio²⁰ fue utilizada como control (D-C). Las muestras GL₉₀ y GM₉₀ fueron individualmente adicionadas a la dieta AIN-93G en una proporción final del 3%, resultando las dietas D-GL₉₀ y D-GM₉₀ respectivamente.

Las tres dietas fueron analizadas en cuanto a su contenido en nutrientes y no se encontraron diferencias significativas entre ellas. El contenido medio en nutrientes fue el siguiente (media ± desviación estándar): humedad (%) 8,01 ± 0,44, N₂ (g/kg) 29,07 ± 0,17, grasa (g/kg) 69,43 ± 0,54 y Ca (g/kg) 4,80 ± 0,27.

Ensayo biológico

Treinta ratas Wistar recién destetadas con peso 41,7 ± 0,4 (media ± error estándar) fueron situadas individualmente en jaulas metabólicas en una habitación de ambiente controlado que se mantuvo a 20-22° C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12h y 55-70% de humedad. Los animales fueron distribuidos en tres grupos de diez ratas (5 hembras y 5 machos) y se les asignó uno de los tratamientos dietéticos. Los grupos se denominaron C (control), GL₉₀ y GM₉₀. Las ratas consumieron las distintas dietas y agua desmineralizada *ad libitum*. El ensayo comenzó con una etapa preliminar de 14 días durante la que se monitorizó la ingesta sólida y el peso, seguida de un segundo período de 7 días en el que se realizó el balance de Ca, mediante la recogida de heces y orina, controlándose igualmente ingesta y peso. Las heces se pesaron antes de su liofilización y fueron posteriormente homogenizadas. La orina se recogió sobre HCl 0,5% (vol/vol), se filtró (Papel de filtro Whatman n.º 40, exento de cenizas, Whatman, Inglaterra) y se diluyó hasta un volumen apropiado. Para controlar en la medida de lo posible la contaminación ambiental durante la recogida de las excretas, se manipularon jaulas vacías del mismo modo para ser utilizadas como blancos.

El día 21 los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (5 mg/100 g peso) (Laboratorios Abbott, Granada, España) y sacrificados por extracción total de la sangre mediante la canulación de la arteria aorta (según protocolo aprobado por el U.S. Dept. of Agriculture, Health and Human Service y por The Institutional Care and Use Committee). La sangre fue centrifugada a 1700 × g durante 10 minutos para la obtención de suero. Se extrajeron el hígado y fémur que, junto con el suero, fueron congelados a -20° C hasta el momento del análisis de calcio.

Todo el procedimiento experimental desarrollado en este estudio se realizó de acuerdo a la actual regulación europea para animales de laboratorio.

Técnicas analíticas

Alícuotas de heces y dietas fueron totalmente digeridas por la adición de HNO₃ y HClO₄ concentrado y por calentamiento a altas temperaturas en un baño de arena. Los órganos fueron digeridos por vía seca en un horno muffla (Selecta, Mod. 366, Barcelona, España) a 450° C hasta la obtención de cenizas blancas, que fueron disueltas con HCl/HClO₄/H₂O (1:1:2) (Suprapur, Merck, Darmstadt, Alemania). Todas las muestras fueron diluidas con agua Milli-Q (Milli-Q Ultrapure Water System, Millipore Corp. Bedford, MA) hasta un volumen adecuado para su medida.

La concentración de Ca en la orina y suero fue determinada directamente en la dilución adecuada para cada muestra.

El análisis de calcio se llevó a cabo en todas las muestras mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica a la llama en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Analyst 700 (Norwalk, Conn., U.S.A.). Se prepararon soluciones estándar de Ca a partir de una solución stock Tritisol (Cl₂Ca en 6,5% HCl, 1.000 mg Ca, Merck). Se adicionó cloruro de lantano (Merck) a las muestras y a los estándares (0,3%) con el fin de eliminar interferencias.

Mezclas representativas de heces, orina y dieta fueron usadas como control interno para comprobar la precisión. El coeficiente de variación inter ensayo para el calcio fue 0,85% en heces, 0,95% en orina y 2,07% en la dieta. Se utilizó polvo de leche (material de referencia certificado CRM 063; Community Bureau of Reference, Bruselas, Bélgica) para cuantificar la exactitud, conduciendo a un valor de 13,48 ± 0,04 mg/g de Ca (media ± desviación estándar; valor certificado: 13,49 ± 0,10 mg/g).

Todo el material utilizado a lo largo de los experimentos fue lavado con HNO₃ 10N y se utilizó agua Milli-Q sin excepciones.

Los siguientes índices fueron calculados utilizando los datos obtenidos de la ingesta y la excreción de Ca en heces y orina durante la última semana del ensayo: retención aparente o balance (Ca ingerido - Ca fecal - Ca urinario); eficacia de retención (%R/A) = retención

aparente / Ca ingerido - Ca fecal \times 100; y eficacia de utilización o biodisponibilidad (%R/I) retención aparente / Ca ingerido \times 100.

Tratamiento estadístico

Los resultados de la solubilidad del Ca *in vitro*, del balance de Ca y de la concentración del mismo en los distintos órganos fueron analizados mediante un Anova de una vía y seguidos de un test de Duncan para comparar medias que mostraran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Resultados y discusión

Ensayo de solubilidad *in vitro*

Puesto que los PRM pueden afectar la disponibilidad del Ca a través de modificaciones en su “especiación”, es decir, en su forma físico-química, lo primero que ha de tenerse en cuenta es el estado inicial (soluble o precipitado) del elemento en la solución de partida, cuya concentración era 3,75 mM Ca, en ausencia de muestra y bajo las mismas condiciones de pH y fuerza iónica. De esta forma, se obtuvo que un 93,6 \pm 6,50% quedaba soluble y que el 7,02 \pm 4,95% precipitaba. Al incluir la muestra GL en la solución cálcica no se observó cambio significativo en la solubilidad del elemento (tabla I), ya que prácticamente se encontraba todo soluble. Este hecho concuerda con las observaciones de Irving (1973)²¹, cuando señala que el efecto estimulador del aminoácido sobre la absorción del Ca no está ligado a la formación de complejos con el mismo. En el caso de la muestra GL₉₀ (tabla I), su presencia en la solución tampoco indujo modificación cuantitativa del Ca soluble, aunque el porcentaje de Ca precipitado fue significativamente superior.

Tabla I
Porcentaje de calcio soluble y precipitado en presencia de las distintas muestras

Muestra	Ca soluble (%)	Ca precipitado (%)
GL	98,7 \pm 0,01	2,1 \pm 0,10 ^a
GL ₉₀	94,4 \pm 1,07	3,6 \pm 0,23 ^b
GM	94,2 \pm 0,87	1,7 \pm 0,15 ^a
GM ₉₀	95,5 \pm 1,19	2,9 \pm 0,32 ^b

GL: mezcla glucosa-lisina cruda; GL₉₀: mezcla glucosa-lisina calentada a 150° C durante 90 minutos; GM: mezcla glucosa-metionina cruda; GM₉₀: mezcla glucosa-metionina calentada a 150° C durante 90 minutos. Los valores representan la media \pm DS de seis determinaciones. Superíndices distintos dentro de la misma columna indican diferencias significativas para cada una de las mezclas ($p < 0,05$, ANOVA de una vía, test de Duncan).

Tabla II
Balance de calcio en ratas alimentadas con las distintas dietas

Grupo	Ca mg/día	
	Ingerido	Retenido
C	63,3 \pm 3,12	36,7 \pm 2,31
GL ₉₀	60,4 \pm 3,31	35,4 \pm 2,95
GM ₉₀	61,5 \pm 3,17	39,5 \pm 2,70

C: ratas alimentadas con la dieta AIN-93G; GL₉₀: ratas alimentadas con la dieta D-GL₉₀; GM₉₀: ratas alimentadas con la dieta D-GM₉₀. Los valores representan la media \pm ES de 10 animales. No se encontraron diferencias significativas en ningún caso ($p < 0,05$, ANOVA de una vía, test de Duncan).

Tampoco se manifestó variación en la solubilidad del mineral debida a la inclusión de la muestra GM en la solución de Ca, ni por la inclusión de la muestra GM₉₀, caso en el que sólo se observó un incremento leve, aunque significativo, de la fracción precipitada.

A pesar de que Rendleman ya en 1987 señalaba la unión del Ca a melanoidinas insolubles procedentes de otros reactantes, con posibilidad de uniones variables según estos últimos, nuestros resultados sugieren una unión inferior con las melanoidinas insolubles formadas. Los datos obtenidos concuerdan con los resultados del mismo autor al señalar que los pigmentos pardos del café tienen muy baja afinidad por el Ca, ya que su precipitación sólo se origina a concentraciones muy altas del catión, que no eran las de nuestro ensayo. En la misma línea algunos autores han señalado que la afinidad de estos compuestos para unir distintos minerales no está bien definida, aunque sugieren un orden en el que el Ca ocuparía el último lugar, precedido del Mg¹¹.

Ensayo biológico

La ingesta cálcica no fue diferente significativamente en ningún grupo (tabla II). Por su previsible capacidad para fijar al Ca¹⁰, se sugería que los productos de la reacción de Maillard podrían afectar su absorción ya que, por una parte, los compuestos insolubles o solubles de elevado peso molecular, excretados totalmente vía fecal²², podrían entorpecer su absorción, mientras que la unión a premelanoidinas absorbibles favorecería su eliminación en la orina¹⁶. La bibliografía sólo señala disminuciones reales del Ca absorbido en ensayos con proteínas calentadas en los que se produce también depresión de la ingesta, que se convierte en el principal determinante del menor aporte cálcico al organismo, ya que, en ocasiones, la digestibilidad del mismo se halla aumentada^{17,23}.

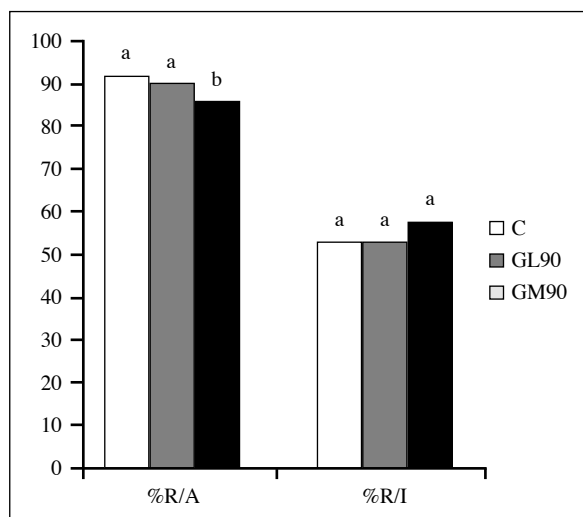


Fig. 1.—Índices biológicos en ratas alimentadas con las distintas dietas. I: calcio ingerido; A: calcio absorbido; R: calcio retenido; C: ratas alimentadas con la dieta AIN-93G; GL₉₀: ratas alimentadas con la dieta D-GL₉₀; GM₉₀: ratas alimentadas con la dieta D-GM₉₀. Letras distintas indican diferencias significativas entre los distintos grupos ($p < 0,05$, ANOVA de una vía, test de Duncan).

Aumentos en la excreción urinaria de Ca se han relacionado con el consumo de dietas ricas en proteína, fundamentalmente carne²⁴, dependientes en gran medida de su contenido en aminoácidos azufrados^{25,26}, o con dietas suplementadas con metionina²⁷. Parece que un incremento en la filtración de SO₄²⁻ es pobremente reabsorbido²⁸ y puede afectar negativamente la reabsorción del Ca filtrado, bien haciendo más electronegativo el lumen tubular o aumentando la fracción complejada de Ca filtrado²⁹. Según los últimos autores, la hiperexcreción cálcica en la orina sería proporcional al contenido en azufre de la dieta, y ello explicaría que en nuestros ensayos la metionina residual y, posiblemente, también sus productos de Maillard, si de alguna manera se metabolizan y eliminan³⁰, contribuyeran al incremento del Ca urinario¹⁸. En consecuencia, en el grupo GM₉₀ disminuyó la eficacia con la que el Ca se utilizó a nivel metabólico, cuyo coeficiente, %R/A (fig. 1), descendió leve pero significativamente, poniendo de manifiesto una vez más la importancia del aminoácido participante en los productos formados y en sus consecuencias fisiológicas³¹.

A pesar de lo expuesto, los cambios en la excreción del Ca urinario fueron cuantitativamente pequeños y compensados parcialmente por la absorción¹⁸, de manera que no se llegó a afectar el balance cálcico, similar en todos los grupos (tabla II). Estos resultados concuerdan con otras observaciones de hiper calciuria acompañadas de retenciones estables tanto con el consumo de compuestos pardos^{16,32} como por el de alimentos hiperproteicos ricos en aminoácidos azufrados, si bien con estos últimos resultó más frecuente el deterioro del Ca corporal³³.

De forma global, el Ca se utilizó en la última semana de balance con una eficacia similar en todos los grupos (fig. 1). Aún así, no puede concluirse de este trabajo que la ingesta de tales productos no haya afectado en absoluto la utilización nutritiva del catión ni su metabolismo, ya que la distribución del calcio corporal parece que sí se vio modificada por el consumo de todos los productos ensayados (tabla III). De este modo, se indujo una redistribución anormal del elemento hacia órganos no específicos, como el hígado, en detrimento de su almacén natural, el hueso.

Como era de esperar, la calcemia permaneció estable, de acuerdo con lo observado por O'Brien y Walker (1988)³⁴ a dosis mucho más elevadas de ingesta de productos pardos. Sorprendentemente, el Ca se acumuló en el hígado de los animales que ingirieron los PRM (tabla III). Nada similar se ha encontrado en la bibliografía como consecuencia del consumo de PRM, sólo cabe recordar la acumulación preferencial de estos compuestos en este órgano^{30,8} y sugerir que, de alguna forma, ello pudo mediar el depósito del elemento.

Sin duda, los efectos que merecen mayor atención son los ocurridos a nivel óseo (tabla III). Los fémures de las ratas que consumieron los derivados pardos contenían menos Ca, lo que no fue sólo producto del menor peso femoral, ya que en el grupo de glucosa-lisina calentada los pesos eran similares a los de las ratas controles, en las que, además, no se encontró la correlación peso de fémur-contenido cálcico, que sí se detectó en las demás. Por tanto, debieron existir mecanismos adicionales que hicieron disminuir la concen-

Tabla III

Contenido y concentración de calcio en hígado, fémur y suero de ratas alimentadas con las distintas dietas

	Grupos		
	C	GL ₉₀	GM ₉₀
Hígado			
Peso (g)	6,79 ± 0,62	6,02 ± 0,51	6,69 ± 0,57
Ca (mg)	0,62 ± 0,04	0,76 ± 0,09	0,78 ± 0,07
Ca (mg/g)	0,09 ± 0,01 ^a	0,13 ± 0,01 ^b	0,12 ± 0,01 ^b
Fémur			
Peso (g)	0,25 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^{ab}	0,22 ± 0,02 ^b
Ca (mg)	50,1 ± 1,79 ^a	40,2 ± 1,59 ^b	39,1 ± 2,73 ^b
Ca (mg/g)	198 ± 8,28 ^a	181 ± 3,22 ^b	181 ± 1,97 ^b
Suero			
Ca (mg/dl)	11,8 ± 0,44	10,7 ± 0,58	11,6 ± 0,32

C: ratas alimentadas con la dieta AIN-93G; GL₉₀: ratas alimentadas con la dieta GL₉₀-D; GM₉₀: ratas alimentadas con la dieta GM₉₀-D. Los valores representan la media ± ES de 10 animales. Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas entre los distintos grupos ($p < 0,05$, ANOVA de una vía, test de Duncan).

tración cálcica ósea y que parecen estar relacionados con el consumo de los PRM, sin depender del tipo de aminoácido que intervino en la mezcla, ni del Ca retenido.

Describe una reducción del hueso en animales que consumieron alimentos pardos³⁵, así como menores pesos, cenizas y contenido cálcico de huesos de ratas alimentadas con dietas cuya proteína, caseína, había sido dañada por el calor, afectándose también, en alguna cuantía, la concentración de Ca óseo²³.

Ciertas observaciones que, de alguna forma, podrían estar relacionadas con los efectos de los PRM, sin depender del tipo de aminoácido que intervino en la mezcla ni del Ca retenido.

La bibliografía científica describe una reducción de la fuerza del hueso en animales que consumieron alimentos pardos³⁵, así como menores pesos, cenizas y contenido cálcico de huesos de ratas alimentadas con dietas cuya proteína, caseína, había sido dañada por el calor, afectándose también, en alguna cuantía, la concentración de Ca óseo²³.

Por último, deben señalarse ciertas observaciones que, de alguna forma, podrían estar relacionadas con los efectos de los PRM sobre el hueso. El colágeno es una proteína de vida media larga, de lento recambio, por lo que resulta muy susceptible a la glicación *in vivo*³⁶. Según los estudios de varios autores^{37,38}, el colágeno epitelial parece ser un tejido especialmente apropiado para el acúmulo de productos de Maillard. Prueba de ello es el aislamiento de histidino-alanina y lisino-alanina en matrices de colágeno óseo calcificadas^{39,40}. Además, actualmente se piensa que la participación de azúcares derivados de glicosilaciones no enzimáticas en el entrecruzamiento de la matriz proteica podría relacionarse con el envejecimiento^{41,42}, frecuentemente asociado con los fenómenos osteoporóticos⁴³. De hecho, la formación de productos avanzados de la glicosilación origina cambios bioquímicos y fisiológicos en el tejido conectivo³⁶. Aunque nosotros no hemos comprobado la existencia de tales compuestos en el hueso, sugerimos la posible participación de estos cambios en las modificaciones observadas en la calcificación ósea. En este sentido, en las investigaciones más recientes se discute si los productos pardos exógenos son sinérgicos o antagónicos con sus análogos producidos endógenamente.

En resumen, puede decirse que el consumo de estos derivados del calentamiento de las mezclas de glucosa-lisina y glucosa-metionina no modificó de forma notable la disponibilidad del Ca, ya que su presencia no modificó la solubilidad del elemento en una proporción apreciable. No se alteró tampoco la eficacia en la utilización global del Ca, esto es, su biodisponibilidad. Sin embargo, tras su ingesta en la dieta parecieron manifestarse cambios metabólicos que afectaron negativamente la mineralización ósea y ocasionaron acúmulos tisulares anormales del nutriente, lo que, a largo plazo, podría desembocar en consecuencias negativas para la salud.

Referencias

1. Cashman KD, Flynn A: Optimal nutrition: calcium, magnesium and phosphorus. *Proc Nut Soc* 1999, 58:477-487.
2. Krane SN: Calcium phosphatase and magnesium. En Rasmussen H (ed.): *The International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*. Pergamon Press, London, vol. I, 1970:19-59.
3. Robertson WG: Chemistry and biochemistry of calcium. En Nordin (ed.): *Calcium in Human Biology*. B.E.C. International Life Science Institute. London. Springer-Verlag, 1988:1-25.
4. Favus, MJ: *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, 2nd edition. Ed.: Favus, M. J. Raven Press, New York, 1993.
5. Instituto de Medicina: Dietary reference intakes: calcium, magnesium, phosphorus, vitamin D and fluoride. National Academy Press, Washington D. C., 1997.
6. Ledl F: Chemical pathways of the Maillard Reaction. En Finot PA, Aeschbacher HU, Hurrell RF y Liardon R (eds.): *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Advances in Life Science, Birkhäuser, Verlag, Switzerland, 1990:345-353.
7. Kato Y, Matsuda T, Kato N, Nakamura R: Maillard Reaction of disaccharides with protein: suppressive effect of non reducing end pyranoside groups on browning and protein polymerization. *J Agr Food Chem* 1989, 37:1077-1081.
8. O'Brien J, Morrissey PA: Nutritional and Toxicological aspects of Maillard Browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1989, 28:211-248.
9. Benevenga NJ, Steele D: Adverse effects of excessive consumption of amino acids. *Ann Rev Nutr* 1984, 4:157-181.
10. Rendleman JA: Complexation of calcium by the melanoidin and its role in determining bioavailability. *J Food Sci* 1987, 6,52:1699-1705.
11. O'Brien J, Morrissey PA: Metal ion complexation by products of the Maillard Reaction. *Food Chem* 1997, 58:17-27.
12. Faist V, Erbersdobler HF: Metabolic transit and in vivo effects of melanoidins and precursor compounds deriving from the Maillard Reaction. *Ann Nutr Metab* 2001, 45:1-12.
13. Furniss DE, Vuichoud J, Finot PA, Hurrell RF: The effect of Maillard Reaction Products on Zinc Metabolism in the rat. *Brit J Nutr* 1989, 62:739-749.
14. Adrian J, Boisselot-Lefebvres J: Efficiency of various B vitamins in zein base diets. *Int Z Vitam Ernahrungsforsch Beih* 1977, 47:1,32-9.
15. Andrieux C, Saquet E: Effects of Maillard's reaction products on apparent mineral absorption in different parts of the digestive tract. The role of microflora. *Reprod Nutr Develop* 1984, 23:379-386.
16. O'Brien J, Morrissey PA, Flynn A: Alterations of Maillard metabolism and secondary pathology in rats fed Maillard reaction products. En Labuza TP, Reineccius GA, Monnier V, O'Brien J, Baines J (eds.): *Maillard Reaction in Chemistry, Food and Health*. 1994:397-401.
17. Sarriá B, López-Fandino R, Vaquero MP: Does processing of a powder or in-bottle-sterilized liquid infant formula affect calcium bioavailability? *Nutrition* 2001, 17:326-331.
18. Delgado-Andrade: Reacción de Maillard: Influencia sobre la biodisponibilidad mineral. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Delgado-Andrade, Granada, España, 2002.
19. Friedman M, Molnar-Perl I: Inhibition of browning by sulfur amino acids. 1. Heated amino acid-glucose systems. *J Agric Food Chem* 1990, 38:1642-1647.
20. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC: AIN-93 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.
21. Irving JT: *Calcium and Phosphorus Metabolism*. Academy Press, New York, 1973, 25.
22. Finot PA: Metabolism and Physiological effects of Maillard Reaction Products (MRP). En Finot PA, Aeschbacher HV, Hurrell RF, Liardon R (eds.): *The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 1990:259-272.

23. Yuan YV, Kitts DD: Calcium absorption and bone utilization in spontaneously hypertensive rats fed on native and heat-damaged casein and soya-bean protein. *Br J Nutr* 1994, 71,4:583-603.
24. Whiting SJ, Draper HH: The role of sulfate in the calciuria of high protein diets in adult rats. *J Nutr* 1980, 110:212-217.
25. Singh PP, Hussain F, Gupta RC, Pendse AK, Raj-Kiran, R-G: Effect of dietary methionine and inorganic sulfate with and without calcium supplementation on urinary calcium excretion of guinea pigs (*Calvia porcellus*). *Indian Exp Biol* 1993, 31(11):96-97.
26. Block GD, Wood RJ, Allen LH: A comparison of the effects of feeding sulfur amino acids and protein on urine calcium in man. *Am J Clin Nutr* 1980, 33:2128-2135.
27. Wang XB, Zhao XH: The effect of dietary sulfur-containing amino acids on calcium excretion. *Adv Exp Med Biol* 1998:442495-442499.
28. Zemel MB: Calcium utilization: effect of varying level and source of dietary protein. *Am J Clin Nutr* 1988, 48:880-883.
29. Shuette SA, Zemel MB, Linkswiler HM: Studies on the mechanism of protein-induced hypercalciuria in older men and women. *J Nutr* 1980, 110:305-315.
30. Homma S, Fujimaki M: Growth response of rats fed a diet containing nondialyzable melanoidins. *Prog Food Nutr Sci* 1981, 5:209.
31. Abu-Dweih BM, Tukan SK, Takruri HR: The effect of browning intensity on the protein quality of qurshallah. *Int J Food Sci Nutr* 2000, 6:483-488.
32. Seiquer I, Aspe T, Vaquero P, Navarro: Effects of heat treatment of casein in the presence of reducing sugars on calcium bioavailability: in vitro and in vivo assays. *J Agr Food Chem* 2001, 49(2):1049-1055.
33. Lotspeich WD: Renal tubular absorption of inorganic sulfate in the normal dog. *Am J Physiol* 1974, 151:311-318.
34. O'Brien J, Walker R: Toxicological effects of dietary Maillard Reaction Products in the rat. *Food Chem Toxicol* 1988, 26(9):775-783.
35. Gregor JL, Emery SM: Mineral metabolism and bone strength of rats fed coffee and decaffeinated coffee. *J Agric Food Chem* 1987, 35:551-556.
36. Sajithlal GB, Chithra P, Chandrakasan G: An in vivo study on the role of metal catalyzed oxidation in glycation and crosslinking of collagen. *Mol Cell Biochem* 1999:257-263.
37. Dunn JA, Dyer DG, Knecht KJ, Thorpe SR, McCance DR, Bailie K, Silvestri G, Lyons TJ, Baynes JW: En Finot PA, Aeschbacher HV, Hurrell RF, Liardon R (ed.): *Maillard reaction in Food Processing. Human Nutrition and Physiology*. Advances in life Sciences. Birkhäuser, Verlag, 1990:425-430.
38. Abraham E, Tsai C, Abraham A, Swamy M: Formation of early and advanced glycation products of lens crystallins with erythrose, ribose and glucose. En Finot PA, Aeschbacher HV, Hurrell RF, Liardon R (eds.): *Maillard reaction in Food Processing. Human Nutrition and Physiology*. Advances in life Sciences. Birkhäuser, Verlag, 1990:437-442.
39. Fujimoto D, Hiramama M, Iwashita T: Histidinoalanine, a new crosslinking amino acid, in calcified tissue collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 1982a:104,1102.
40. Fujimoto D, Hiramama M, Iwashita T: Occurrence of lysinoalanine in calcified tissue collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 1982b:103,1378.
41. Monnier VM, Sell DR, Nagaraj RM, Miyata S, Grandhee S, Odetti P, Ibrahim SA: Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging and uremia. *Diabetes* 1992:41,36.
42. Reiser K: Nonenzymatic glycation of collagen in aging and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991, 196,17.
43. Wood RJ: Searching for the determinants of intestinal calcium absorption. *Am J Clin Nutr* 2000, 72:675-676.