

# Productos cárnicos funcionales preparados con nuez.

## Evaluación del efecto funcional. Parte 3.

OLMEDILLA ALONSO, B; GRANADO LORENCIO, F; HERRERO BARBUDO, C; BLANCO NAVARRO, I; Y SÁNCHEZ-MUNIZ, FJ<sup>1</sup>  
 (EN REPRESENTACIÓN DEL EQUIPO INVESTIGADOR<sup>2</sup> DEL SUBPROYECTO 3 DE MCYT. AGL2001-2398-C03-03)  
 UNIDAD DE VITAMINAS. SERVICIO DE ENDOCRINOLOGÍA Y NUTRICIÓN. HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO. MADRID.  
 E-MAIL: BOLMEDILLA.HPTH@SALUD.MADRID.ORG

<sup>1</sup>DPTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN). FACULTAD DE FARMACIA. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. E-MAIL: FRASAN@FARM.UCM.ES



**E**n este texto continuamos la información sobre el estudio "Productos cárnicos funcionales preparados con nuez" (MCYT. AGL2001-2398-C03) que se ha expuesto en los dos números anteriores de esta revista. En el presente artículo describimos las aproximaciones experimentales desarrolladas para evaluar, en humanos, el efecto producido por el consumo de los productos cárnicos descritos anteriormente (Jiménez Colmenero et al, 2005). Como se recordará, el planteamiento central se relacionaba con el beneficio en salud comunitaria que supondría una disminución

en el consumo de carne y un aumento de determinados alimentos de origen vegetal (p.ej. nueces) (Jiménez Colmenero & Olmedilla, 2004), basados en evidencias epidemiológicas y la actividad biológica de ciertos componentes mostrados en ensayos in vitro y en animales. De forma específica, el objetivo era desarrollar productos cárnicos modificados, cuali y cuantitativamente, para obtener un perfil nutricional asociado con menor riesgo cardiovascular.

Como ya se expuso, las nueces fueron elegidas como componente "funcional" del nuevo producto cárnico debido a su

composición nutricional relevante en relación con **enfermedades cardiovasculares** comparado con otros frutos secos (ej. contenido total en PUFA, ácidos grasos w-6 y w-3, contenido en  $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol, fitosteroles, polifenoles, proteínas ricas en arginina) y a su gran aceptabilidad por la población. Asimismo, la cantidad a incorporar se basó en datos de consumo de nueces por persona y día en nuestro país, datos derivados de estudios epidemiológicos y recomendaciones actuales sobre ingesta de nueces (FDA, 2003).

Como se señaló en los artículos anteriores (Jiménez Colmenero & Olmedilla,



2004; Jiménez Colmenero et al, 2005), según consenso científico europeo, “un **alimento** puede considerarse **funcional** si demuestra de forma satisfactoria que tiene efecto beneficioso sobre una o más funciones diana en el organismo, aparte de los efectos nutricionales, de forma que sea relevante tanto para mejorar el estado de salud o bienestar y/o para la reducción de riesgo de enfermedad” (Diplock *et al.*, 1999). No obstante, a pesar del gran desarrollo de este tipo de alimentos, existe una importante falta de información sobre la “funcionalidad” de los componentes (efecto sobre la salud humana) derivada del consumo habitual de estos alimentos.

El contenido de la **vitamina E en los productos cárnicos de nueva formulación** (salchichas y filetes reestructurados con y sin nueces) y en la nuez en polvo, se ha determinado mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), con métodos y resultados validados mediante nuestra participación en el Programa de control de calidad "Fat-soluble Vitamins Quality Assurance Programme" (National Institute of Standards and Technology, USA). Los análisis realizados (X Congreso Anual de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, 2004) muestran que la vitamina E en la nuez se encuentra en forma libre, no esterificada, y la concentración de los principales vitámeros se muestran en la tabla 1.

Las pruebas que apoyen el efecto funcional de estos alimentos pueden derivarse de estudios epidemiológicos, experimentales (in vitro, animales, ensayos en humanos) y de intervención en humanos utilizando **biomarcadores** intermedios con relevancia en la detección precoz y pronóstico de la enfermedad. Mediante estos biomarcadores se deberían decidir sobre los temas relativos a validación y verificación científica de alegacio-

nes en alimentos e información al consumidor (PASSCLAIM, 2004).

### Estudios para la valoración del efecto funcional de los productos cárnicos con nuez

La evaluación del efecto funcional se planteó mediante **dos** tipos de **ensayos** complementarios; por un lado, evaluando la respuesta **post-prandial** en plasma de  $\gamma$ -**tocoferol** tras ingesta única del producto cárnico (**biomarcador de exposición**) y, por otro, evaluando la biodisponibilidad **a medio plazo** de algunos componentes derivados de la nuez (ej.  $\gamma$ -tocoferol, w-6/w-3 ratio) y el **impacto del consumo regular sobre marcadores e indicadores de riesgo cardiovascular** (biomarcadores de función y riesgo), incluyendo marcadores de homeostasis lipídica, inflamación, trombosis, antioxidantes, presión sanguínea, homocisteína y vitaminas B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y folato.

### Biomarcador de exposición: gamma-tocoferol

Comparado con otros frutos secos, las nueces contienen poca cantidad de  $\alpha$ -tocoferol (ca. 2 mg vs 25 mg/100g en avellanas o almendras) pero un alto contenido en  $\gamma$ -tocoferol (41 mg vs 2 mg/100g) (Souci et al., 1989), lo que las convierte en una excelente fuente dietética de este vitámero. Apoyando su actividad biológica, distintos estudios indican que el  $\gamma$ -tocoferol muestra una elevada actividad antioxidante con, potencialmente, importantes implicaciones fisiológicas (Christen et al., 1997; Devaraj & Traber, 2003) y además, tanto  $\gamma$ -tocoferol como su principal metabolito ( $\gamma$ -carboxietil hidroxicromano) presentan otras actividades como antioxidantes frente a especies reactivas de nitrógeno, actividad natriurética, efecto antiinflamatorio (por inhibición de actividad COX-

2) o regulación de óxido nítrico sintetasa (Jiang et al., 2001). Por otro lado, distintos estudios observacionales han descrito bajos niveles de  $\gamma$ -tocoferol (ajustados por niveles lipídicos), pero no de  $\alpha$ -tocoferol, en sujetos con enfermedad coronaria (Ohrvall et al., 1996; Kontush et al., 1999). Por todo ello, y dado que el contenido de  $\gamma$ -tocoferol en los cárnicos era significativamente mayor que la aportada en la dieta, los niveles de  **$\gamma$ -tocoferol en suero** se utilizaron como **marcador de exposición durante el estudio de intervención con cárnicos reestructurados con nueces**.

### Estudio de intervención con productos cárnicos con nuez (a dosis de ingesta compatibles con una dieta equilibrada)

La intervención dietética a medio plazo consistió en un ensayo de biodisponibilidad no ciego, cruzado, con dosis múltiples (5 veces/ semana durante 5 semanas), con un mes de “lavado” entre ambos tratamientos (reestructurados con y sin nuez). El estudio planteado tenía en consideración dos factores fundamentales en este tipo de ensayos, la dosis y la posible presencia de un retraso en la respuesta similar al observado para otros nutrientes. Los sujetos recibieron la recomendación de no modificar sus hábitos dietéticos ni sociales, excepto para consumir los productos a ensayar en vez de otro producto cárnico habitual. Teniendo en cuenta el contenido de la nuez y la composición de los productos a ensayar, el aporte de  $\gamma$ -tocoferol a los voluntarios en el ensayo es de ca. 6,3 mg de  $\gamma$ -tocoferol por filete (aprox. 150g) y unos 4 mg por ración de salchicha (aprox. 80 g). Esto supone que cada voluntario, mediante el consumo de estos cárnicos, ingieren aproximadamente unos 29 mg  $\gamma$ -tocoferol por semana. En términos de consumo

equivalente de nueces, este sería de 30 g nuez/ filete y 16 g nuez/ ración de salchichas lo que implica un consumo de 136 g de nueces a la semana, que representa un consumo medio de 19,4 g nueces / día. (Figura 1) Este consumo supone alrededor del 70% de la cantidad considerada como adecuada (FDA 2003) y es consistente con las recomendadas por diversas entidades y grupos de científicos con el objetivo de reducir el riesgo de enfermedad coronaria (junto con una dieta baja en grasas saturadas y colesterol).

*Selección de participantes a partir de población con diversos factores de riesgo de enfermedad cardiovascular:*

Los criterios de inclusión establecidos de acuerdo a los criterios de la OMS/FAO (2003) para prevención de enfermedades crónicas, fueron de entre los factores no modificables, la *edad* y de entre los factores modificables, el *sobrepeso*, *dislipemia*, *hábito al tabaco* y *presión arterial*. En un principio se estableció como requerimientos para la inclusión: edad (hombres de 45-60 años, mujeres de 55-65 años y sin terapia hormonal sustitutiva), sobrepeso (IMC >25 y <30), colesterol (>220 mg/dl e < 300 mg/dl), y al menos uno de los dos siguientes: presión arterial (próxima a 140/90 mm Hg) o tabaquismo.

El número de participantes previsto era de 32 (16 hombres y 16 mujeres). No obstante, debido a la baja respuesta obtenida en función de estos requerimientos, hubo que modificar algo los criterios de inclusión, así, se amplió el rango de *edad* (hombres: 45-69 años; mujeres: 50-69 años) y *sobrepeso* (Índice de Masa Cor-

poral > 25 kg/m<sup>2</sup> y < 34,9 kg/m<sup>2</sup>), junto con al menos uno de los siguientes: consumo de tabaco, colesterolemia > 220 mg/dl o presión arterial aprox. 140/90 mm Hg. En conjunto, un total de 68 personas interesadas que creían cumplir los criterios de inclusión contactaron con el equipo investigador de las cuales, 30 fueron descartadas por diversas razones (utilización habitual de fármacos para tratamiento de hipercolesterolemia, hipertensión u otros, hiperglucemia, etc), y 10 perdieron contacto, quedando finalmente incluidos un total de 25 sujetos (15 hombres, 10 mujeres).

### Estudio de biodisponibilidad en humanos de vitamina E a partir del producto cárnico con nueces:

En tres sujetos se realizó el ensayo tanto con filete de carne con nuez como sin nuez "a dosis única" (**modelo "farmacocinético"**). El ensayo se realizó durante el período **post-prandial**, 7 horas, durante las cuales se tomaron muestras para valorar vitamina E ( $\alpha$ - y  $\gamma$ -tocoferol) en suero y en quilomicrones, entre otros parámetros que se comentarán a continuación. Los resultados muestran un aumento en la concentración de  $\gamma$ -tocoferol (biomarcador de exposición a este producto) sólo tras la ingesta de reestructurados con nuez y no así en los productos control (sin nuez), obteniéndose el valor máximo de  $\gamma$ -tocoferol en plasma a las 6 horas de su ingesta (tiempo evaluado = 6 horas) (Fig. 2). El producto cárnico es eficaz para aportar, a dosis y pautas de con-

sumo compatible con una dieta equilibrada: a) nuez en cantidades asociadas a efectos cardiovasculares beneficiosos, b) un aumento de  $\gamma$ -tocoferol en suero, principio activo asociado con disminución de riesgo cardiovascular.

### Estudio en humanos del consumo de 5 raciones semanales del producto cárnico sobre marcadores de riesgo cardiovascular:

Se ha utilizado un protocolo de ensayo próximo a condiciones dietéticas habituales como medio sostenible a largo plazo, ya que se sustituye el consumo de carne y derivados durante el período de 5 semanas por el consumo de 5 productos cárnicos modificados con nuez añadida por semana (4 filetes + 1 ración salchicha) (35 días). Como marcador de ingesta se considera el  $\gamma$ -tocoferol y entre los parámetros e indicadores de riesgo cardiovascular estamos valorando los siguientes: colesterol (LDL y HDL) y triglicéridos en plasma y la presión arterial (SEN, 2004). También se han separado lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL) mediante ultracentrifugación, analizando en cada fracción lipoproteica colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas totales. Se están realizando también análisis de eicosanoides, Lp(a), Apo AI y Apo B, agregación plaquetaria, marcadores de inflamación (PCR y los marcadores de adhesión de monocitos VCAM e ICAM) y marcadores de peroxidación lipoproteica y capacidad antioxidante. La concentración de glutathion peroxidasa, glutathion reductasa y su-

**FIGURA 1. MARCADOR DE INGESTA DEL PRODUCTO CÁRNICO FUNCIONAL ( $\gamma$ - TOCOFEROL) Y CANTIDAD DE NUEZ QUE APORTA POR ESTOS CÁRNICOS A LA DIETA**

**Ingesta de  $\gamma$ -tocoferol y de nuez por ración y por semana:**

6,3 mg $\gamma$ - tocoferol	filete
4 mg $\gamma$ - tocoferol	salchicha
29 mg $\gamma$ - tocoferol	semana
30 g nuez	filete
16 g nuez	salchicha
136 g nueces	semana (19,4 g/día)

**TABLA 1: CONTENIDO EN VITAMINA E ( $\gamma$ -TOCOFEROL,  $\alpha$ -TOCOFEROL Y  $\delta$ -TOCOFEROL) EN LA NUEZ Y EN LOS PRODUCTOS CÁRNICOS OBJETO DEL ESTUDIO**

Producto	$\gamma$ -tocoferol ( $\mu$ g/100g)	$\alpha$ -tocoferol ( $\mu$ g/100g)	$\delta$ -tocoferol ( $\mu$ g/100g)
Nuez en polvo (n=3)	26649	708	5190
Filetes con nuez (n=6)	4165	ca. 50	926
Salchichas con nuez (n=7)	4980	226	1205
Filetes sin nuez	ca. 19	ca. 50	n.d.

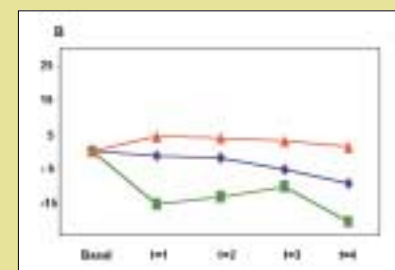
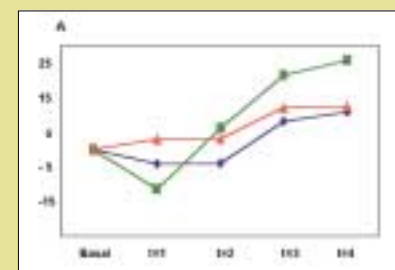


Figura 2.- Respuesta de  $\gamma$ -tocoferol ( $\mu$ g/dl) en quilomicrones tras la ingesta de filete con nuez (A) y filete sin nuez (B) en tres sujetos.



peroxido dismutasa se mide en glóbulos rojos y en plasma.

Resultados preliminares se han presentado en diversos congresos (congresos (VI Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria - IV Congreso Iberoamericano de Nutrición y Salud Pública, 2004; IX Congreso de la Sociedad Española de Nutrición, 2004, I Jornada RCMN del ISCIII, 2004; Congreso Biotec'2004; I Congreso de la FESNAD, 2005) y estos nos sugieren que el consumo de cárnico con nueces tiende a disminuir el colesterol total y el ligado a lipoproteínas de alta densidad (LDL), así como la intensidad de agregación a las 5 semanas del estudio e incrementa el tiempo de agregación máxima a las 3 semanas. Es decir se produce menor número de plaquetas que agregan y necesitan más tiempo para hacerlo de forma máxima. Se miden también otras sustancias vasodilatadoras y antiagregantes como son las prostaglandinas (PG). Ya que las nueces contienen cantidades significativas de ácido linolénico es posible que las células endoteliales produzcan más PGI<sub>3</sub>. A partir de las plaquetas activadas se procederá a estudiar los tromboxanos, sustancias proagregantes plaquetarias y vasoconstrictoras.

Como marcadores de peroxidación lipoproteica se está midiendo las LDL-oxidadas mediante ELISA y marcadores monoclonales de LDL-oxidada (Mercodia). En suero mide la concentración de malondialdehído mediante el test del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y también se valora la actividad de paraoxonasa y arilesterasa, enzimas que se considera participan en la protección antioxidante de las LDL y en el mecanismo de eliminación de radicales libres (Canales y Sánchez-Muniz, 2003). La actividad arilesterasa se ha medido mediante la técnica de Eckerson et al (1983), que utiliza como tampón

Tris/HCl, y mediante otra técnica original del subproyecto realizado en la Facultad de Farmacia (Nus et al., 2004).

Finalmente, dado que la respuesta a la dieta es muy variable de unos individuos a otros, parece importante estudiar la interacción del polimorfismo de algunos genes candidatos y el consumo de carne con nueces sobre diferentes marcadores de riesgo cardiovascular. Dado que el número de pacientes no es muy elevado, se estudian sólo algunos genes candidatos de los que se ha observado tienen interacción en muchos estudios sobre el efecto de diferentes compuestos dietéticos sobre marcadores de riesgo cardiovascular. Hasta el momento se ha procedido a aislar ADN genómico de los participantes y se ha probado la amplificación del gen de la ApoE, ApoA4, ABCG, CETP, PON1 y PON 2.

Los resultados definitivos están en la fase final de generación y de valoración estadística. En un próximo artículo se comentarán los resultados finales de este estudio de intervención con un alimento potencialmente funcional sobre marcadores de riesgo cardiovascular.

### Agradecimientos

<sup>2</sup> Participan en el subproyecto desarrollado en la Facultad de Farmacia: Josana Librelotto, Meritzel Nus, Amaya Canales Juana Benedí, M Teresa Méndez, Rafaela Raposo, Pilar Vaquero.

### Bibliografía

Canales A y Sánchez-Muniz FJ (2003) Paraoxonasa ¿Algo más que un enzima? *Med. Clin. (Barcelona)* 12: 537-548.  
 Christen, S; Woodall AA; Shigenaga MK; Sothwell-Keely PT; Duncan MW; Ames BN. (1997).  $\gamma$ -Tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO<sub>x</sub> and complements  $\alpha$ -tocopherols: physiolo-

gical implications. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA.* 94: 3217-3222.

Devaraj, S; Traber, MG. (2003).  $\gamma$ -tocopherol, the new vitamin E?. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 530-531.

Diplock, A. T; Agget, P. J; Ashwell, M; Bernet, F; Fern, E. B.; Roberfroid, M. B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document. *Brit. J. Nutr.* 81 (suppl.1): S6.

Eckerson, H.W., Romson, J., Wyte, C., La Du, B.N. 1983. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am. J. Human Genet.* 35:214-227.

FDA. Food and Drug Administration. (2003). Office of Nutritional Products, Labeling and Dietary Supplements. Qualified Health Claims. Walnuts and Coronary Heart Disease. (Docket No 02P-0292).

Kontush, A; Spranger, T; Reich, A; Baum, K; Beisiegel, U. (1999). Lipophilic antioxidants in blood plasma as markers of atherosclerosis: The role of  $\alpha$ -carotene and  $\gamma$ -tocopherol. *Atherosclerosis* 144: 117-122.

Jiménez Colmenero, F; Carballo, J; Cofrades, A; Serrano, A; Ayo, J. (2005) Desarrollo de derivados cárnicos funcionales preparados con nuez. Parte 2. *CTC Alimentación*, 23: 20-25.

Jiménez Colmenero, F; Olmedilla, B. (2004) Productos cárnicos funcionales preparados con nuez. *CTC Alimentación*, 22.

Nus M, Sánchez-Muniz FJ, Sánchez-Montero JM (2004). Nuevo método para la determinación de actividad aril esterasa humana in vitro en miméticos de suero humano. *Biotec'2004*. Sociedad Española de Biotecnología. Oviedo, 19-23 de Julio.

Ohrvall, M; Sundlof, G; Vessby, B. (1996). Gamma, but not alpha, tocopherol levels in serum are reduced in coronary

heart disease patients. *J. Int. Med.* **239**: 111-117.

PASSCLAIM (2004). Process for the Assessment of Scientific Support for Claims on Foods. Phase Two: Mowing Forward. Asp, N-G.; Cummings, JH; Howlett, J; Rafter, J; Riccardi, G; Westenhoefer, J. (Guest Editors) *Eur. J. Nutr.*, 43(supl.2).

Souci, S.W; Fachman, W; Kraut, H. (1989). *Food Composition and Nutrition Tables 1989/1990*. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

### Comunicaciones a Congresos mencionadas en el texto:

I Congreso FESNAD (Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética). Nus M, etl. (Cartel 167) Niveles de actividad paraoxonásica en sujetos con sobrepeso y obesidad, publicado en *Nutr. Hosp.* (2005) XX (Supl.1); 51. Nus et al. Efecto del consumo de un cárnico funcional conteniendo nuez sobre los niveles plasmáticos de apolipoproteínas A1 y B. Datos preliminares (Cartel 113) publi-



cado en *Nutr. Hosp.* (2005) XX (Supl.1); 129 y .Nus M, et al Efectos del consumo de un cárnico funcional conteniendo nuez sobre la actividad arilesterasa plasmática. Datos preliminares. (Cartel 117), publicado en *Nutr. Hosp.* (2005) XX (Supl.1); 131.

Congreso Biotec'2004 de la Sociedad Española de Biotecnología. Nus M,

Sánchez-Muniz FJ, Sánchez-Montero JM (Cartel 9). Nuevo método para la determinación de actividad aril esterasa humana in vitro en miméticos de suero humano. Oviedo, 19-23 Julio, 2004.

VI Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria y IV Congreso Iberoamericano de Nutrición y Salud Pública. Canales C, Benedí J y Sánchez Muniz FJ (comunicación oral nº O901). Consumo de carne funcional y agregación plaquetaria en sujetos con riesgo cardiovascular incrementado. Ibiza, 22-25 Septiembre, 2004.

I Jornada Científica de Red de Centros de Metabolismo y Nutrición (RCMN). Redes Temáticas de Investigación cooperativa del Instituto de Salud Carlos III. Olmedilla Alonso, B, et al. Sitges, Barcelona, 16-17 enero 2004.

X Congreso Anual de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Olmedilla, B, et al. Madrid, 24-27 marzo, 2004.

X Reunión Científica Sociedad Española de Nutrición (SEN). Herrero-Barbudo, MC, et al. Cuenca, 1-3 julio 2004. ■

**TECNIA**  
automatización, s.l.

- Automatización de maquinaria
- Programación de PLC`S
- Cuadros eléctricos de automatismos
- Robot industriales
- Equipos de control calidad

**SOMOS ESPECIALISTAS**

Pol. Indust. La Polvorista. C/. Ricote s/n  
30.500 Molina de Segura. MURCIA  
Tel. 968 641 036. Fax 968 640 771.  
www.tecniasl.com info@tecniasl.com