



Absorption of calcium from milks enriched with fructo-oligosaccharides, caseinophosphopeptides, tricalcium phosphate, and milk solids¹⁻³

Eduardo López-Huertas, Birgit Teucher, Julio J Boza, Antonio Martínez-Férez, Gosia Majsak-Newman, Luis Baró, Juan J Carrero, María González-Santiago, Juristo Fonollá, and Susan Fairweather-Tait

¹ From the Institute of Food Research, Norwich, United Kingdom (BT, SFT, and GM-N); Puleva Biotech SA, Granada, Spain (ELH, JJB, AMF, MGS, and JF); the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain (JJC); and Distrito Sanitario Costa del Sol, Servicio Andaluz de Salud, Málaga, Spain (LB).

² Supported by Puleva Food SL, Granada, Spain.

³ Address reprint requests and correspondence to S Fairweather-Tait, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, United Kingdom. E-mail: sue.fairweather-tait@bbsrc.ac.uk.

Received August 1, 2005.

Accepted for publication November 10, 2005.

Am J Clin Nutr 2006;83:310–6. Printed in USA. © 2006 American Society for Nutrition

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL

Absorción de calcio a partir de leches enriquecidas con fructooligosacáridos, fosfopéptidos de caseína, trifosfato cálcico y sólidos lácteos¹⁻³

Eduardo López-Huertas, Birgit Teucher, Julio J. Boza, Antonio Martínez-Férez, Gosia Majsak-Newman, Luis Baró, Juan J. Carrero, María González-Santiago, Juristo Fonollá, Susan Fairweather-Tait¹⁻³

¹ Del “Institute of Food Research”, Norwich, Reino Unido (BT, SFT y GM-N); Puleva Biotech SA, Granada, España (ELH, JJB, AMF, MGS, y JF); departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, España (JJC); y el Distrito Sanitario Costa del Sol, Servicio Andaluz de Salud, Málaga, España (LB)

² Financiado por Puleva fOOD SL, Granada, España

³ Peticiones y correspondencia a *Susan Fairweather-Tait*, Institute of Food Research, Norwich NR4 7UA, UK, Telephone: +44 1603 255306, Fax: +44 1603 452578, E-mail: sue.fairweather-tait@bbsrc.ac.uk

Recibido 1 Agosto 2006, aceptado para publicación Noviembre de 2005

ABSTRACT

Antecedentes: Se requiere una ingesta adecuada de calcio para una salud ósea óptima y la protección de enfermedades crónicas. Los productos lácteos son una fuente de calcio excelente.

Objetivo: Determinación de la absorción de calcio a partir de leches fortificadas empleando la técnica de isótopos estables.

Diseño: 15 voluntarios participaron en un estudio aleatorizado, controlado a doble ciego y cruzado. Se administraron 5 tipos de bebida láctea semidesnatada (1.9% de grasa) junto con un desayuno ligero: leche estándar (control); leche enriquecida con calcio por adición de sólidos lácteos y trifosfato cálcico (TCP) (leche MSS); leche enriquecida en calcio a partir de leche concentrada (leche CON); leche con fructooligosacáridos añadidos (leche FOS); y leche con fosfopéptidos de caseína añadidos (leche CPP). Todas las leches se marcaron con el isótopo estable de calcio ^{42}Ca en forma de CaCl_2 . La leche MSS también se marcó con ^{44}Ca como en forma de TCP. Las cantidades de calcio ingeridas en cada bebida se mantuvieron iguales por ajuste del volumen de leche administrado

Resultados: El calcio absorbido no fue diferente entre la leche control y las leches fortificadas con calcio (leches MSS y CON) o las leches FOS y CPP. Sin embargo, el calcio absorbido a partir del trifosfato cálcico añadido a la leche MSS fue significativamente mayor que el absorbido a partir de la leche control ($27.5 \pm 7.6\%$ vs $24.5 \pm 7.3\%$, respectivamente; $P=0.003$)

Conclusiones: Las leches enriquecidas en calcio son una fuente valiosa de calcio absorbible. La absorción de calcio añadido como trifosfato cálcico fue mayor que el que se absorbió a partir de la leche control, pero la adición de FOSs o CPPs no incrementó de forma significativa la absorción de calcio. Se necesita de más investigación para comprobar la efectividad de los costes y los beneficios de salud pública producidos por el consumo de leches fortificadas.

Am J Clin Nutr 2006; 83: 310-6.

PALABRAS CLAVE: Calcio, isótopo estable, absorción, leche, fortificación, fosfato tricalcico, fructooligosacáridos, fosfopéptidos de caseína.

INTRODUCCIÓN

La ingesta de calcio, particularmente durante la infancia, es un factor muy importante, determinante de la masa ósea en adultos, y también influencia la tasa de pérdida de masa ósea asociada con la edad (1-5). La osteoporosis, enfermedad que afecta a muchos millones de personas en el mundo, se caracteriza por la fragilidad de los huesos que con el tiempo origina fracturas óseas. En países con elevada incidencia de fracturas osteoporóticas, se ha asociado la ingesta reducida de calcio con un incremento del riesgo de fracturas (6). La ingesta baja de calcio también se asocia con incrementos del riesgo de padecer cáncer de colon e hipertensión y puede afectar el crecimiento normal en niños (6, 7)

Los productos lácteos son una fuente excelente de calcio biodisponible. Las encuestas de ingesta de alimentos indican que la leche y los productos lácteos constituyen la principal fuente de calcio de la dieta, representando el 66% de la ingesta total de calcio en la dieta española (8), el 72% en la de Estados Unidos (9), y el 45% en la dieta del Reino Unido (10). Sin embargo, en algunos grupos de población el promedio de ingesta diaria de calcio puede ser significativamente menor que la ingesta recomendada, que en adultos abarca de 900 a 1500 mg/d, en ocasiones incluso no alcanzando 50% de la ingesta adecuada (11).

Se han sugerido varias estrategias para incrementar la ingesta de calcio y/o su absorción. Entre ellas está la fortificación de leche con calcio lácteo o sales de calcio, pero la disponibilidad de sales de calcio en leche no se ha caracterizado bien. De la misma manera se ha propuesto que algunos ingredientes alimentarios, como los fructo-oligosacáridos (FOSs) y los fosfopéptidos de caseína (CPPs), pueden incrementar la absorción de calcio a partir de leche u otros alimentos. Los FOSs pertenecen al grupo de oligosacáridos no digeribles (NDO) donde también se incluye la inulina, la oligofructosa (fructanos de la raíz de chicoria), y los galacto-oligosacáridos. Los NDOs pueden ser digeridos por la microflora intestinal, principalmente en el colon, lo que produce ácidos grasos de cadena corta que reducen el pH intestinal e incrementan la solubilidad del calcio, así como su transporte paracelular y transcelular (12,13).

También se ha sugerido que los NDOs incrementan el transporte activo de calcio mediante la activación de calbindin-D9k (14,15). Varios estudios humanos han mostrado un incremento en la absorción de calcio cuando se incluyeron NDOs en la dieta por un periodo de días o semanas (16-18). Los CPPs fragmentos peptídicos de caseína ricos en fósforo a los que se les asume contribuir a la elevada biodisponibilidad del calcio en la leche por prevenir la formación de sales insolubles de calcio y quizá por reducir las interacciones entre el calcio y otros minerales de la leche (19). Aunque estudios *in vitro* y en animales han mostrado efectos positivos de los CPPs en la absorción de calcio, los resultados obtenidos en estudios humanos no son concluyentes al respecto (20-23). Ya que la leche es una de las principales fuentes de calcio de la dieta, hemos investigado la posibilidad de usar la leche como matriz para administrar calcio adicional, ya sea incrementando su biodisponibilidad o incrementando la concentración de calcio en la leche.

En este trabajo se muestran los resultados de un estudio llevado a cabo con isótopos estables en el que se mide en voluntarios humanos la absorción de calcio a partir de leche semidesnatada y de varios tipos de leche modificada que poseen el potencial de aportar más calcio al consumidor: leche adicionada de sólidos lácteos y trifosfato cálcico, leche concentrada, leche adicionada de FOSs de cadena corta, y leche adicionada de fosfopéptidos de caseína. Los ingredientes se añadieron a las leches a dosis bajas con el objetivo de poder producir productos lácteos funcionales de bajo coste que puedan usarse ampliamente.

SUJETOS Y MÉTODOS

Sujetos

Quince sujetos (8 hombre y 7 mujeres) de edades entre 25-36 años se captaron de entre el personal de Puleva Biotech SA (Granada, España). Los sujetos recibieron un examen físico y se revisó su historial médico antes de que fueran incluidos en el estudio. Ninguno de los sujetos participantes había padecido de enfermedad que tuviese influencia sobre la absorción o metabolismo del calcio, malabsorción, diabetes, artritis reumatoide, enfermedades con trastornos de hormona paratifoidea, enfermedad intestinal, renal o hepática. Los participantes no consumieron ningún tipo de medicación durante el estudio. Todos los sujetos eran no fumadores y recibieron instrucciones de no modificar su actividad física o su dieta habitual; sin embargo, a aquellos voluntarios que de forma habitual consumían alcohol se les pidió que no lo hicieran durante el periodo de duración del estudio.

Los voluntarios recibieron información extensa de los objetivos y propósitos del estudio y entregaron consentimiento informado por escrito. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki, y el protocolo de ensayo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario San Cecilio (Granada, España).

Preparación de las soluciones de isótopos estables

Se empleó la técnica del isótopo estable doble, lo que implica la administración simultánea de 2 isótopos estables diferentes, uno se administra oralmente y el otro de forma intravenosa. La fracción de absorción (FA) verdadera de calcio se calculó a partir del enriquecimiento en muestras de orina de ambos isótopos, teniendo en cuenta las cantidades administradas y la abundancia natural de los isótopos estables (24, 25).

Los isótopos estables se adquirieron a la empresa Chemotrade (Dusseldorf, Alemania) como carbonatos de calcio: los ^{42}Ca y ^{44}Ca se usaron en las bebidas lácteas (es decir, se administraron por vía oral), y el ^{43}Ca se administró por vía intravenosa. Las abundancias de los diferentes marcadores isotópicos se midieron por espectrometría de masas de ionización térmica: ^{42}Ca enriquecido (24.3% ^{40}Ca , 73.4% ^{42}Ca , 0.4% ^{43}Ca , 1.8% ^{44}Ca , <0.01% ^{46}Ca , 0.09% ^{48}Ca), ^{43}Ca enriquecido (39.2% ^{40}Ca , 0.65% ^{42}Ca , 49.5% ^{43}Ca , 10.5% ^{44}Ca , <0.01% ^{46}Ca , 0.14% ^{48}Ca), ^{44}Ca enriquecido (3.42% ^{40}Ca , 0.13% ^{42}Ca , 0.03% ^{43}Ca , 96.4% ^{44}Ca , 0.02% ^{48}Ca). La sal de $^{43}\text{CaCO}_3$ se disolvió en ácido clorhídrico ultrapuro, se añadió suero salino estéril para inyección, se ajustó el pH a 5.0 usando NaOH y la solución final se filtró. La solución se esterilizó con el uso de un autoclave, y se dispensaron alícuotas en ampollas estériles conteniendo cada una 1 mg de ^{43}Ca . La solución de $^{42}\text{CaCl}$ se preparó usando el mismo procedimiento básico. Para la preparación de la sal de

^{44}Ca trifosfato calcico (^{44}Ca -TCP), el $^{43}\text{CaCO}_3$ la sal se disolvió primero con HNO_3 concentrado para producir $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y luego se precipitó con KH_2PO_4 y NaOH a pH9, como ya se ha descrito previamente (26). El precipitado de ^{44}Ca -TCP se lavó con agua desionizada y se secó a 90°C durante la noche. Se prepararon alícuotas conteniendo 6 mg de ^{42}Ca o 15 mg de ^{44}Ca que se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Bebidas del ensayo

Se administraron cinco bebidas diferentes en orden aleatorio a todos los voluntarios durante los 5 periodos de estudio (**Tabla 1**). Las bebidas ensayadas, todas leches semidesnatadas (1.9% grasa), fueron las siguientes: leche estándar marcada extrínsecamente con ^{42}Ca como $^{42}\text{CaCl}$ (leche control); leche enriquecida en calcio mediante la adición de un 12.6% de calcio a partir de sólidos lácteos y un 15.5% de calcio a partir de trifosfato cálcico [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] y marcada extrínsecamente con ^{42}Ca como $^{42}\text{CaCl}$ y con ^{44}Ca de la solución de TCP [(Leche MSS) Puleva Calcio; Puleva FOOD, Granada, España]; leche enriquecida en calcio mediante la adición de un 33% de calcio a partir de leche concentrada, marcada con ^{42}Ca como $^{42}\text{CaCl}$ (Leche CON); leche conteniendo 5g de FOS/L (Ebro-Puleva, España; ver composición en la **Tabla 2**) marcada extrínsecamente con ^{42}Ca como $^{42}\text{CaCl}$ (leche FOS); y leche suplementada con 2 g fosfopéptidos CE 90 CPP/L (DMV International, Holanda) con la siguiente composición: 89.1% proteína (conteniendo 22.5% de CPP), 0.1% grasa, 0.1% carbohidratos, 5.7% cenizas (60 mg de Ca/100 g de producto) y 5% humedad, marcada extrínsecamente con ^{42}Ca como $^{42}\text{CaCl}$ (leche CPP).

Las bebidas lácteas se marcaron con 6 mg de ^{42}Ca el día antes del test de absorción y se dejaron durante la noche a 4°C para permitir el equilibrio entre isótopo marcado de calcio y el calcio lácteo nativo. La leche MSS también se marcó con 15 mg de ^{44}Ca para poder medir de forma específica la absorción de calcio a partir del trifosfato cálcico adicionado. Se comprobó la solubilidad de los FOSs y los CPPs antes de que se adicionaran a las bebidas del estudio, y se disolvieron completamente en las leches antes de la adición de los isótopos estables. Los volúmenes administrados de las bebidas del estudio se ajustaron para proporcionar un total de 268 mg de calcio, teniendo en cuenta el calcio derivado de los ingredientes adicionados y la dosis de isótopo(s) adicionado. Los volúmenes de las bebidas del estudio oscilaron entre 165 y 224 mL.

Diseño del estudio

El estudio fue controlado, aleatorizado, a doble ciego y cruzado, con 5 periodos de estudio que correspondieron con las 5 bebidas lácteas ensayadas. Los voluntarios recibieron instrucciones de seguir con su dieta habitual y prescindir de alimentos que consumieran de forma excepcional y que no fuesen capaces de obtener de nuevo durante el resto del estudio. Los voluntarios recibieron instrucciones de anotar todos los alimentos y bebidas consumidas durante los 4 días anteriores al primer test de absorción, en el día del test de absorción y durante los 2 días (48 h) después de la dosis (7 días en total). Las anotaciones de alimentos y bebidas se llevaron a cabo en diarios proporcionados por los investigadores, empleando medidas caseras. Los voluntarios recibieron instrucciones de revisar sus diarios y consumir los mismos alimentos y bebidas en las mismas cantidades (en la medida de lo posible) durante los otros 4 periodos del estudio, excluyendo los

periodos de “lavado” de 2 semanas anteriores al siguiente test de absorción. Se realizaron estimaciones de ingesta dietética en las semanas 1 y 11 usando los diarios completados por los voluntarios. Las ingestas de nutrientes y calcio se calcularon usando las tablas de composición de alimentos españoles publicadas (27). En el día 1, antes del primer periodo de estudio, y al final del estudio, se tomaron muestras de sangre de cada voluntario para determinar las concentraciones de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] y hormona paratifoidea intacta (iPTH). Las características de los sujetos del estudio se muestran en la **Tabla 3**.

En el día 2, después de un periodo de ayuno nocturno, los voluntarios ingirieron uno de los 5 productos lácteos que se especificaron anteriormente, junto con un desayuno ligero que consistía en 2 tostadas de pan blanco con mantequilla y mermelada (conteniendo 59 mg de calcio total, excluyendo el calcio de la bebida test). Entre 30 min y 1 hora después de la administración oral del producto lácteo, se inyectó 1 mg de ^{43}Ca (en forma de $^{43}\text{CaCl}$) en la vena antecubital por un periodo de 20 min y bajo supervisión médica. En este tiempo y durante las 3 h siguientes no se permitió a los voluntarios que consumieran ningún tipo de alimento o bebida, con excepción de agua desionizada. Desde el día 1 (24h antes del día del ensayo con la bebida láctea) hasta el día 4, se recogieron muestras de orina de 24 h en contenedores lavados con ácido. Una vez finalizados los días de recogida de orina, los voluntarios entraron en una fase re “lavado” de 2 semanas de duración, antes de comenzar con un nuevo periodo de ensayo. Las alícuotas de orina se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se llevaron a cabo los análisis.

Preparación de las muestras de orina

Las muestras de orina se descongelaron y se mezclaron vigorosamente usando un mezclador vortex. A esta mezcla se añadieron aproximadamente 2 mL de una solución 7.2 M de HNO_3 y 0.5ml de H_2O_2 (ambas Ultrapure grade, Merck, Lutterworth, Reino Unido) y se las dejó reaccionar durante la noche a temperatura ambiente. Las muestras se irradiaron a $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 40 min en un sistema cerrado de digestión ultravioleta (Modelo 707, Metrohm, Herisau, Suiza) hasta completa digestión. Los digeridos claros se transfirieron a viales de Teflón lavados con ácido y se evaporaron a sequedad bajo una lampara de 1-kW en una campana de flujo laminar.

Medidas de calcio, hormona paratifoidea intacta, y 25-hidroxivitamina D

El calcio total se midió en todos los alimentos e ingredientes mediante espectrometría de absorción atómica (AAS) como se describe en (25). El contenido de calcio total de las muestras de orina se analizó usando un AAS de llama (modelo 3300, Perkin-Elmer, Norwalk, CT) después de una dilución (1:25 o 1:50 según se requiriese) con 0.5% de La (como solución de cloruro de Lantano). Los estándares se prepararon usando soluciones estándar de AAS (1g Ca/L; VWR Internacional Ltd, Poole, Reino Unido; 1 g Na/L; Fluka; Sigma-Aldrich Company Ltd, Gillingham, UK) empleando cociente 1:3:5 como se describe en (25). Todas las muestras se analizaron por duplicado, y controles de orina certificados (Lyphochek, Quantitative Urine Control, Level 1-62161, Bio-Rad) se analizaron con cada batch. La media de todas las muestras analizadas por duplicado ($51.5 \pm 1\text{ mg/L}$) se correspondieron bien con la concentración certificada de calcio (48mg/L, range 43-53mg/L). iPTH se midió en suero por quimioluminiscencia (DPC, Los Angeles, CA) usando 2 anticuerpos marcados obtenidos frente a los fragmentos N- y C- terminales de la hormona.

25(OH)D se midió en suero mediante radio-inmunoensayo empleando un kit comercial (Biosource Internacional, Inc, Camarillo, CA).

Análisis por espectrometría de masas y cálculo de la fracción de absorción

Los cocientes isotópicos se midieron con un espectrómetro de masas single-focus con multicolector (Isoprobe; Micromass, Manchester) usando un sistema de introducción de muestra Aridus con nebulizador microconcéntrico T1H (Cetac, Omaha, NE). Se usó NIST915, un carbonato cálcico (clínico), para bracketing de cada muestra experimental y la precisión de las medidas se optimizó por normalización de los ratios con ratios de isótopos conocidos (28).

La fracción de absorción de calcio (FA) se calculó a partir del ratio de las masas de los isótopos estables administrados por vía oral (^{42}Ca y ^{44}Ca) e intravenosa (^{43}Ca) medidos en orina, expresados como fracción de la dosis administrada. Esta técnica asume que el isótopo administrado por vía oral, una vez absorbido, sigue la misma cinética de el isótopo administrado por vía intravenosa y el calcio natural. Para calcular las fracciones molares de cada fuente de calcio presente en las muestras de orina se empleó una técnica de inversión matriz (29). El uso de la técnica del isótopo dual que las fuentes de calcio fueron orales (^{42}Ca y ^{44}Ca), intravenosa (^{43}Ca), y abundancia natural. Se calculó la fracción de absorción de calcio verdadera según las siguientes ecuaciones (30):

$$TFA = \frac{{}^{42}\text{Ca}_{\text{oral_masaenorina}}}{{}^{43}\text{Ca}_{\text{iv_masaenorina}}} \cdot \frac{{}^{43}\text{Ca}_{\text{dosis_iv}}}{{}^{42}\text{Ca}_{\text{dosis_oral}}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$TFA = \frac{{}^{44}\text{Ca}_{\text{oral_masaenorina}}}{{}^{43}\text{Ca}_{\text{iv_masaenorina}}} \cdot \frac{{}^{43}\text{Ca}_{\text{dosis_iv}}}{{}^{44}\text{Ca}_{\text{dosis_oral}}} \quad \text{Ecuación 2,}$$

donde TFA=fracción de absorción de calcio verdadera, iv=intravenosa.

Aunque la orina se recogió en “pools” de 24-h durante 3 días después de la dosis, el cálculo de la fracción de absorción se llevó a cabo en las orinas del día 2 (24-48 h) ya que el porcentaje promedio de enriquecimiento de los isótopos administrados por vía oral ^{42}Ca y ^{44}Ca en el día 3 (48-72h) se encontró estar por debajo de los límites aceptables de detección. De esta forma también se eliminó cualquier error potencial en la estimación de la absorción de calcio que puede resultar del tiempo transcurrido en el equilibrio cinético de la dosis oral y la intravenosa durante las primeras 24-h después de la dosis. Todas las muestras de orina del día 2 se analizaron por triplicado, y el nivel de enriquecimiento necesario para proporcionar límites aceptables de certeza en el cálculo de la fracción de absorción se aseguró usando como base estudios previos (31)

Análisis estadístico

Para evaluar las diferencias en la absorción de calcio a partir de las 5 bebidas del estudio se aplicó un análisis de varianza de medidas repetidas, seguido de un test post hoc de Tukey. Se emplearon test pareados de *t* para evaluar las diferencias en iPTH , 25(OH)D, índice de masa corporal, e ingesta de nutrientes. Los datos se expresan como medias \pm EEM (error estándar de la media), y se consideró significativo a un valor de $P < 0.05$. Para realizar en análisis estadístico se empleó software SPSS (versión 11.5; SPSS Inc, Chicago, IL)

RESULTADOS

Todos los participantes finalizaron el estudio, y el cumplimiento fue bueno. En la Tabla 3 se muestran las características de los sujetos, incluyendo concentraciones séricas de iPTH , 25(OH)D y la ingesta diaria promedio de calcio y otros nutrientes. No se detectaron diferencias significativas en las concentraciones séricas de iPTH y 25(OH)D al principio y final del estudio ($P > 0.05$), ninguno de los sujetos poseía concentraciones séricas de 25(OH)D que indicasen deficiencias de vitamina D (< 25 nmol/L), y el intervalo de valores encontrados fue relativamente estrecho (32.9-71.4 nmol/L). No se encontraron cambios significativos en la ingesta de nutrientes o calcio a lo largo del estudio ($P > 0.05$). Los datos recogidos al principio y al final del estudio, a partir de los diarios de ingesta de alimentos y bebidas mostraron una ingesta promedio de calcio de 913 mg/día (intervalo entre los sujetos 690 a 1287 mg/día)

La precisión intra-ensayo (%CV, coeficiente de variación) de los ratios de isótopos en las muestras enriquecidas con isótopos, de acuerdo con los análisis por triplicado, fue de $0.07 \pm 0.07\%$ para $^{42}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, $0.14 \pm 0.14\%$ para $^{43}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$, y $0.19 \pm 0.17\%$ para $^{44}\text{Ca}/^{40}\text{Ca}$. El enriquecimiento en ^{43}Ca varió desde un promedio del 12.2% a las 24 horas después de la dosis hasta el 6.4% a las 72 horas después de la dosis. El enriquecimiento promedio más bajo detectado para ^{42}Ca y ^{44}Ca medido en las muestras de orina del día 3 fue del 2.5%. Debido al bajo enriquecimiento en calcio de las muestras de orina del día 3, los resultados están basados en los datos de las muestras de orina del día 2.

Los valores de absorción de calcio obtenidos a partir de las 5 bebidas del ensayo se muestran en la **Tabla 4**. El porcentaje promedio de los valores de absorción de calcio obtenido a partir de las 5 bebidas del estudio se encontró dentro del intervalo de valores publicado para la leche –es decir 13.5-40.4%. La absorción de calcio a partir de las leches fortificadas con calcio (leches MSS y CON) fue similar al que se encontró para la leche. Sin embargo, la absorción de calcio a partir del trifosfato cálcico (marcado con ^{44}Ca) añadido a la leche MSS fue significativamente mayor ($27.5 \pm 7.6\%$; $P = 0.003$) que la leche control ($24.5 \pm 7.3\%$), tal y como se muestra en la **Tabla 4**. La absorción de calcio a partir de la leche FOS ($25.6 \pm 5.5\%$) respecto de la leche control fue casi significativamente diferente pero no mostró diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.055$). No se encontraron diferencias en la absorción de calcio lácteo entre las leches control y CPP.

DISCUSIÓN

La ingesta adecuada de calcio es crítica para alcanzar un pico óptimo de masa ósea, y también influencia la tasa de pérdida de masa ósea asociada al

envejecimiento. Para una ingesta óptima de calcio se recomiendan fuentes de calcio procedentes de los alimentos (7) ya que previenen trastornos en el balance de minerales y aportan otros nutrientes que desempeñan un papel en el mantenimiento de la salud ósea. Aunque los productos lácteos, naturalmente ricos en calcio, constituyen la mayor fuente de calcio altamente disponible de la dieta, la fortificación podría aportar significativamente más calcio y por lo tanto ayudar a los consumidores a alcanzar una ingesta óptima de calcio. Sin embargo, el uso de diferentes sales de calcio en productos fortificados debería de evaluarse en términos de disponibilidad de calcio.

El objetivo del presente estudio fue la evaluación de la absorción de calcio a partir de leche, leche adicionada de calcio lácteo y sales de calcio, leche concentrada, y leche suplementada con FOSs o CPPs. Se empleó la técnica del doble marcaje con isótopos estables para estimar de forma exacta la fracción de absorción de calcio a partir de muestras de orina recogidas 24-48 h después de la dosis (muestras de orina del día 2). Se observaron diferencias entre el porcentaje de absorción calculado a partir de las muestras de orina recogidas el día 1 (0-24 h) y las del día 2 (24-48 h) para algunos voluntarios, aunque no todos (datos no mostrados). Estas variaciones son muy probablemente debidas a las pequeñas diferencias iniciales en las tasas de excreción del isótopo administrado por vía oral e intravenosa (32). La motilidad intestinal va a afectar al tiempo requerido para que la absorción se complete, especialmente teniendo en cuenta el hecho de que el calcio puede absorberse en las partes más distales del tracto gastrointestinal, como el colon (33).

La absorción media de calcio a partir de las distintas leches usadas en el estudio osciló entre el $22.9 \pm 5.8\%$ y el $27.5 \pm 7.6\%$, en consonancia con los valores de absorción de calcio previamente descritos por nuestro grupo de investigación (32) y otros grupos (34-37). Debido a que la absorción de calcio depende de la carga ("load") total de calcio (38), las 5 bebidas ensayadas en nuestro estudio se ajustaron en volumen para contener la misma cantidad de calcio total. El calcio marcado extrínsecamente supuso el 2.2% del calcio contenido cada una de las bebidas lácteas del ensayo excepto en el caso de la leche MSS que contenía un 5.6% de calcio adicional en forma de ^{44}Ca . Una estrategia válida y generalmente aceptada para estudiar la absorción de calcio a partir de leche es el uso del marcaje extrínseco con calcio. El estado fisicoquímico del calcio en la leche de vaca es tal que la marca [el isótopo estable en este caso] se intercambia virtualmente con todos los sitios de unión del calcio de la leche, independientemente de su estado físico y sus ligandos químicos (39) y, por lo tanto, la cuantificación en orina de incremento de la concentración del isótopo que se ha añadido a la leche como marcaje, representa la absorción verdadera del calcio en la bebida.

La leche MSS, que contenía una combinación de sólidos lácteos y una sal de calcio asequible (trifosfato cálcico), contenía un tercio más de calcio que la leche estándar (la control). El trifosfato cálcico es una fuente común de calcio que se emplea para la fortificación de alimentos (39), y el 45% del calcio lácteo está en forma de trifosfato cálcico del fosfocaseinato, que es insoluble y coloidal y se libera durante la digestión (40). Nosotros adicionamos un 15.5% de calcio a la leche MSS en forma de trifosfato cálcico para alcanzar una concentración de 160 mg de calcio por 100 mL de leche. Cantidades adicionales a éstas originaban un producto con baja estabilidad. La combinación de la sal de calcio y los sólidos lácteos usados para

la fortificación con calcio, en vez de usar únicamente sólidos lácteos, también redujo un 10% el contenido en proteína de la leche MSS. La reducción del contenido de proteína láctea de la dieta también puede reducir la pérdida de calcio por la orina, tal y como se demostró en un estudio en el cual un producto lácteo con mayor contenido en calcio y menor contenido en proteína, fósforo y energía se comparó con una leche estándar (41). En nuestro estudio, el porcentaje de calcio absorbido a partir de leche estándar o leches fortificadas con calcio, que contenían un 33% más de calcio por unidad de volumen, fue el mismo. Aunque no se observaron ventajas en términos de fracción de absorción de calcio, la ingesta con una comida de un 30% de volumen de las leches fortificadas originó la absorción del mismo porcentaje de calcio

Trabajos anteriores han mostrado que sales inorgánicas y orgánicas de calcio, incluyendo el trifosfato cálcico, el carbonato cálcico, y el citrato cálcico, muestran esencialmente la misma fracción de absorción cuando se han testado en humanos, a pesar de poseer solubilidades muy diferentes en soluciones acuosas, lo que sugiere que la absorbabilidad de calcio a partir de alimentos está influenciada principalmente por otros componentes del alimento (42)

La absorción de calcio a partir del trifosfato cálcico que se adicionó la leche MSS fue significativamente mayor ($P=0.003$) que el calcio de la leche. La mayoría de los ensayos controlados en humanos no han mostrado diferencias entre la fracción de absorción de calcio total a partir de leche y a partir de sales de calcio (35, 36, 43, 44), con algunas excepciones como el mayor porcentaje de absorción de calcio a partir de pan fortificado con sulfato de calcio (45) y el menor porcentaje de absorción de calcio a partir de una leche de imitación de soja fortificada con trifosfato cálcico cuando se comparó con leche (39). Estos resultados subrayan la influencia de la matriz del alimento en la absorbabilidad del calcio. Nuestro estudio muestra una absorbabilidad superior de la sal de calcio en la leche fortificada, pero las diferencias fueron relativamente pequeñas podrían tener poca importancia nutricional.

En nuestro estudio, la ingesta de una única dosis de 1.1 g de FOSs administrados en leche originó un incremento marginal en la absorción de calcio ($P=0.055$) respecto de la leche control. Algunos estudios en humanos, empleando isótopos estables, mostraron efectos positivos de la lactulosa, la inulina, FOSs y galactooligosacáridos en la absorción de calcio, pero estas sustancias se administraron en mayores cantidades (5-20 g/día) y por un periodo más extenso de días o semanas (16-18).

Los FOSs de corta cadena, principalmente aquellos con 3 monómeros como los GF2, son usados preferentemente por las bifidobacterias y los lactobacilos para la producción de ácidos grasos de cadena corta (46, 47). La mezcla de FOS empleada en nuestro estudio era especialmente rica en estructuras GF2 (>55%; 90% GF2+GF3), los que podría explicar las tendencias observadas, a pesar de las bajas cantidades adicionadas a la leche FOS. Aunque la producción de ácidos grasos de cadena corta pueden originar un incremento en las rutas de transporte de calcio paracelulares y transcelulares, otra explicación posible para la tendencia ascendente observada es la inducción del transporte activo de calcio, ya que estudios animales han demostrado que los oligosacáridos no digeribles pueden inducir calbindin-9k en el intestino (14, 15). Sin embargo, el presente estudio no se diseñó específicamente para investigar los efectos favorecedores de los FOSs, sino para testar si cantidades reducidas de FOS de cadena corta adicionados a un vaso de leche producirían

alguna diferencia respecto de la absorción de calcio. Un diseño de estudio empleando diferentes cantidades de FOSs debería de emplearse para responder a este punto.

Los CPPs parecen poseer la gran capacidad de formar complejos solubles con calcio al pH del lumen intestinal, un hecho que parece explicar el efecto promotor de la absorción pasiva de calcio (23). Los pocos estudio humanos publicados empleando alimentos suplementados con CPP sugieren que la cantidad de CPP en la bebida láctea (87 mg) fue posiblemente demasiado reducida para producir un efecto significativo en la absorción de calcio (CPP : calcio =0.32). En otros estudios se han empleado cantidades mucho mayores, aunque los resultados son controvertidos: por ejemplo, la suplementación de productos lácteos o de pan con 1 g de CPPs no produjo ningún efecto significativo en la absorción de calcio (22, 23), mientras que la incorporación de lamisca cantidad en cereales de base arroz mostró efectos significativos (21). Diversos factores, tales como la matriz del alimento, el estado nutricional y fisiológico de los sujetos, y el ratio CPP/calcio (48), claramente ejercen una influencia en los efectos de los CPP en la absorción de calcio y se necesita de más investigación en este área.

Este estudio apoya el uso de leches enriquecidas en calcio como fuentes buenas de calcio absorbible. La absorción de la sal de calcio a partir de la leche suplementada es comparativamente mayor respecto del de la leche estándar. Las cantidades adicionadas, relativamente reducidas, de FOSs o CPPs no produjeron un incremento en la absorción de calcio. Para comprobar la efectividad de los costes y los beneficios de salud pública producidos, se necesita de más investigación para evaluar los efectos producidos por el consumo de leches suplementadas con calcio durante diferentes periodos de tiempo, en diferentes poblaciones, y con varios patrones de ingesta.

Agradecemos a los voluntarios su participación en el estudio, Jurian Hoogewerff and John Eagles por las determinaciones de isótopos estables por espectrometría de masas y Jack Dainty por el cálculo de isótopos.

EL-H contribuyó al diseño del estudio, captación, desarrollo del ensayo en humanos, análisis de los datos, análisis estadístico, escritura y corrección del manuscrito. BT contribuyó al diseño del estudio, análisis de los datos y su interpretación, y escritura del manuscrito. JJB contribuyó al diseño del estudio, escritura y corrección del manuscrito. AM-F ayudó en el desarrollo del ensayo en humanos. GM-N fue responsable de preparar las muestras para el análisis por espectrometría de masas. LB ayudó con la captación de los voluntarios, la preparación de las bebidas isotópicas y las inyecciones intravenosas. JF contribuyó a la captación y en análisis de las muestras. SF-T contribuyó al diseño del estudio, interpretación de los resultados y corrección del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Heaney RP. Effect of calcium on skeletal development, bone loss, and risk of fractures. *Am J Med* 1991;91(5B):23S-28S
2. Heaney RP. Age considerations in nutrient needs for bone health: older adults. *J Am Coll Nutr* 1996;15(6):575-8.

3. Abrams SA. Calcium turnover and nutrition through the life cycle. *Proc Nutr Soc* 2001; 60(2):283-9.
4. Sandler RB, Slemenda CW, LaPorte RE, et al. Postmenopausal bone density and milk consumption in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr* 1985;42(2):270-4.
5. Lloyd T, Rollings N, Andon MB, et al. Determinants of bone density in young women. I. Relationships among pubertal development, total body bone mass, and total body bone density in premenarchal females. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75(2):383-7.
6. World Health Organ Tech Rep Ser 916. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases, 2003.
7. NIH Consensus Statement. Optimal Calcium intake. 1994;12(4):1-31.
8. Varela G, Moreiras O, Carbajal A, et al. Estudio Nacional de Nutrición y Alimentación 1991, Tomo I. Ed. Instituto Nacional de Estadística. Madrid, 1995.
9. Subar AF, Krebs-Smith SM, Cook A, et al. Dietary sources of nutrients among US adults, 1989 to 1991. *J Am Diet Assoc* 1998;98(5):537-47.
10. Henderson, L, Gregory, J, Irving, K, et al. The National Diet and Nutrition Survey: Adults Aged 19-64 Years, Volume 3: Vitamin and Mineral Intake and Urinary Analytes. London: The Stationery Office, 2003.
11. Nationwide Food Consumption Survey, continuing survey of food intakes by individuals. Women 19-50 years, and their children 1-5 years. Report 86-1. Washington, DC: US government Printing Office, 1986.
12. Scholz-Ahrens KE, Schaafsma G, van den Heuvel EG, et al. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr* 2001;73(2 Suppl):459S-464S.
13. Suzuki T, Hara H. Various nondigestible saccharides open a paracellular calcium transport pathway with the induction of intracellular calcium signaling in human intestinal Caco-2 cells. *J Nutr* 2004;134(8):1935-41.
14. Ohta A, Motohashi Y, Ohtsuki M. et al. Dietary fructooligosaccharides change the concentration of calbindin-D9k differently in the mucosa of the small and large intestine of rats. *J Nutr* 1998;128(6):934-9.
15. Takasaki M, Inaba H, Ohta A. et al. Dietary short-chain fructooligosaccharides increase calbindin-D9k levels only in the large intestine in rats independent of dietary calcium deficiency or serum 1,25 dihydroxy vitamin D levels. *Int J Vitam Nutr Res* 2000; 70(5):206-13.

16. van den Heuvel EG, Schoterman MH, Muijs T. Transgalactooligosaccharides stimulate calcium absorption in postmenopausal women. *J Nutr* 2000;130(12):2938-42.
17. van den Heuvel EG, Muys T, van Dokkum W, et al. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. *Am J Clin Nutr* 1999;69(3):544-8.
18. Coudray C, Bellanger J, Castiglia-Delavaud C, et al. Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *Eur J Clin Nutr* 1997;51(6):375-80.
19. Berrocal R, Chanton S, Juillerat MA, et al. Tryptic phosphopeptides from whole casein. II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *J Dairy Res* 1989; 56(3):335-41.
20. Heaney RP, Saito Y and Orimo H. Effect of caseinophosphopeptides on absorbability of co-ingested calcium in normal postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 1994;12:77-81.
21. Hansen M, Sandstrom B, Jensen M, et al. Casein phosphopeptides improve zinc and calcium absorption from rice-based but not from whole-grain infant cereal. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24(1):56-62.
22. Narva M, Karkkainen M, Poussa T, et al. Caseinphosphopeptides in milk and fermented milk do not affect calcium metabolism acutely in postmenopausal women. *J Am Coll Nutr* 2003;22(1):88-93.
23. Hansen M, Sandstrom B, Jensen M. et al. Effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from bread meals. *J Trace Elem Med Biol* 1997;11(3):143-9.
24. DeGrazia JA, Ivanovich P, Fellows H, et al. A double isotope method for measurement of intestinal absorption of calcium in man. *J Lab Clin Med* 1965;66(5):822-9.
25. Lee WT, Leung SS, Fairweather-Tait SJ, et al. True fractional calcium absorption in Chinese children measured with stable isotopes (^{42}Ca and ^{44}Ca). *Br J Nutr* 1994;72(6):883-97.
26. Koo J, Weaver CM, Enhilan MJ. Solubility of calcium salts and carragenan used in infant formulas did not influence calcium absorption in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17: 298-302

27. Hernández M, Sastre A. Tratado de Nutrición. Madrid, Spain: Díaz de Santos, Spain, 1999.
28. Rosman and Taylor. Isotopic compositions of the elements. Pure and Applied Chemistry 1998;70:217.
29. Harvey LJ, Majsak-Newman G, Dainty JR, Wharf SG, Reid MD, Beattie JH and Fairweather-Tait SJ. Holmium as a faecal marker for copper absorption studies in adults. Clinical Science 2002;102:233-240.
30. Yergey AL, Vieira NE and Covell DG. Direct measurement of dietary fractional absorption using calcium isotopic tracers. Biomed Environ Mass Spectrom 1987;14:603-607.
31. Field MP, Shapses S, Cifuentes M and Sherrell RM. Precise and accurate determination of calcium isotope ratios in urine using HR-ICP-SFMS. J Anal At Spectrom 2002;18:727-733.
32. Fairweather-Tait SJ, Eagles J, Johnson A, Ganatra S, Kennedy H, Gurr MI. Studies on calcium absorption from milk using a double-label stable isotope technique. Br J Nutr 1989;62:379-388.
33. Sandstrom B, Cederblad A, Kivisto A, Stenquist B and Andersson H. Retention of zinc and calcium from the human colon. Am J Clin Nutr 1986;44:501-4.
34. Moser-Veillon PB, Mangels AR, Vieira NE. Calcium fractional absorption and metabolism assessed using stable isotopes differ between postpartum and never pregnant women. J Nutr 2001 ;131(9):2295-9.
35. Recker RR, Bammi A, Barger-Lux MJ. et al. Calcium absorbability from milk products, an imitation milk, and calcium carbonate. Am J Clin Nutr 1988;47(1):93-5.
36. Couzy F, Kastenmayer P, Vigo M, et al. Calcium bioavailability from a calcium- and sulfate-rich mineral water, compared with milk, in young adult women. Am J Clin Nutr. 1995;62(6):1239-44.
37. Weaver CM. Calcium bioavailability and its relation to osteoporosis Proc Soc Exp Biol Med 1992;200(2):157-60.
38. Heaney RP, Weaver CM, Fitzsimmons ML. Influence of calcium load on absorption fraction. J Bone Miner Res 1990;5(11):1135-8.
39. Heaney RP, Dowell MS, Rafferty K. Bioavailability of the calcium in fortified soy imitation milk, with some observations on method. Am J Clin Nutr. 2000; 71(5):1166-9.

40. Gueguen L, Pointillart A. The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr* 2000; 19(2 Suppl):119S-136S.
41. van Beresteijn EC, Brussaard JH, van Schaik M. Relationship between the calcium-to-protein ratio in milk and the urinary calcium excretion in healthy adults - a controlled crossover study *Am J Clin Nutr* 1990;52(1):142-6.
42. Heaney RP, Recker RR, Weaver CM. Absorbability of calcium sources: the limited role of solubility *Calcif Tissue Int* 1990;46(5):300-4.
43. Kohls K. Calcium bioavailability from calcium fortified food products. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1991;37(4):319-28.
44. Mortensen L, Charles P. Bioavailability of calcium supplements and the effect of Vitamin D: comparisons between milk, calcium carbonate, and calcium carbonate plus vitamin D. *Am J Clin Nutr* 1996;63(3):354-7.
45. Martin BR, Weaver CM, Heaney RP. et al. Calcium absorption from three salts and CaSO₄-fortified bread in premenopausal women. *J Agric Food Chem* 2002;50(13):3874-6.
46. Roberfroid MB, Van Loo JA, Gibson GR. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products *J Nutr* 1998;128(1):11-9.
47. Marx SP, Winkler S, Hartmeier W. Metabolization of beta-(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;182(1):163-9.
48. Erba D, Ciappellano S, Testolin G. Effect of the ratio of casein phosphopeptides to calcium (w/w) on passive calcium transport in the distal small intestine of rats. *Nutrition* 2002;18(9):743-6.

Tabla 1. Composición de las leches semi-desnatadas (1.9% de grasa) usadas en el estudio¹

	Control	leche MSS	leche CON	leche FOS	leche CPP
Energía (kcal /100 mL)	46.5	53	56	46.5	46.5
Proteína (g/100mL)	3.1	3.9	4.3	3.1	3.1
Carbohidratos (g/100mL)	4.7	5.8	6.3	4.7	4.7
Grasa (g/100mL)	1.9	1.6	1.6	1.9	1.9
Calcio (mg/100mL)	120	160	160	120	120
Vitamina A (µg/100mL)	120	120	120	120	120
Vitamina D (µg/100mL)	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
FOS (g/100 mL)	-	-	-	0.5	-
CPP (g/100 mL)	-	-	-	-	0.2

¹**Control**, leche semidesnatada (1.9% de grasa); **leche MSS**, leche enriquecida con calcio a partir de sólidos lácteos y trifosfato cálcico; **leche CON**, leche enriquecida con calcio a partir de leche concentrada; **leche FOS**, leche suplementada con fructooligosacáridos (FOSs); **leche CPP**, leche suplementada con fosfopéptidos de caseína (CPPs).

Tabla 2. Composición de los fructo-oligosacáridos (FOSs) suplementados en la leche FOS usada en el estudio¹..

Contenido en carbohidratos (% of DM):	> 99.5
FOS (% de DM)	> 95
GF ₂ (% de DM):	> 55
GF ₃ (% de DM):	> 33
GF ₄ (% de DM):	> 6.5
Glucosa + Fructosa + Sacarosa (%DM):	< 5
Materia seca (DM) (%):	72
Cenizas (% w/w):	< 0.1

¹ DM, material seca; G, galactosa; F, fructosa

Tabla 3. Características de los sujetos¹

	Mean	SD	Range
Edad (años)	28.7	3.7	24-26
IMC (Kg/m ²)	22.3	1.7	19.5-26
iPTH sérica (pg/mL)	35.1	8.2	16.6-52.1
25(OH)D sérica (nmol/L)	56.3	9.3	32.9-71.4
Ingesta energética (kcal)	2248	344	1522-2723
Ingesta proteica (g/d)	81.4	14.2	53-112
Ingesta de grasa (g/d)	92.0	15.0	62-135
Ingesta de carbohidratos (g/d)	266.6	41.7	184-362
Ingesta de Calcio (mg/d)	913.0	189.0	690-1287

¹ Todos los valores son promedio \pm SD; intervalo entre paréntesis. n=15. iPTH, hormona paratifoidea intacta; 25(OH)D, 25-hidroxivitamina D. Los valores se calcularon a partir de los diarios de recogida de datos de ingesta.

Tabla 4. Absorción promedio de calcio a partir de las 5 leches semidesnatadas (1.9% grasa) medidas en muestras de orina de 24 horas recogidas en el día 2 (24-48 h después de la dosis¹)

	Control	leche MSS		leche CON	leche FOS	leche CPP
		Ca lácteo (42Ca)	TCP (44Ca)			
Media (%)	24.5	23.8	27.5 ²	24.1	25.6 ³	22.9
± SD	7.3	7.4	7.6	6.0	5.5	5.8
%CV	29.9	31.1	27.6	25.1	21.5	25.2
Intervalo	14.9-37.4	16.3-37.9	13.5-40.4	15.4-34.8	16.3-35.6	12.9-32.7

¹<n=15. **Control**, leche semidesnatada (1.9% de grasa); **leche MSS**, leche enriquecida con calcio a partir de sólidos lácteos y trifosfato cálcico (**TCP**); **leche CON**, leche enriquecida con calcio a partir de leche concentrada; **leche FOS**, leche suplementada con fructooligosacáridos (**FOSs**); **leche CPP**, leche suplementada con fosfopéptidos de caseína (**CPPs**)

^{2,3} Significativamente diferente respecto a la leche control (ANOVA de medidas repetidas y test de diferencias significativas post hoc de Tukey de $p < 0.01$, † $p=0.055$ versus the control milk (RM-ANOVA, Tukey's HSD post hoc test).

² $P < 0.01$

³ $P=0.055$