

**Volumen 52. N° 1. Marzo 2002**

# ALAN

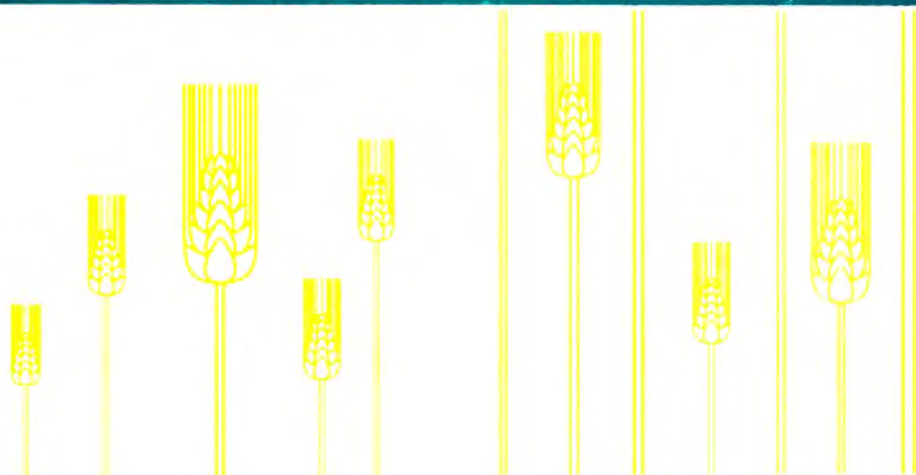
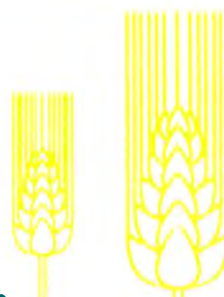
**A R C H I V O S**

**Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición**

**L A T I N O A M E R I C A N O S**

**Continuación de Archivos Venezolanos de Nutrición**

**D E N U T R I C I O N**



*Archivos Latinoamericanos de Nutrición* (ALAN) es editado como órgano oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), para la divulgación de conocimientos en el campo de la alimentación y de la nutrición principalmente en el Hemisferio Americano. En sus páginas se acogen manuscritos en español, inglés, portugués y francés, tanto de miembros como de aquellos que no sean miembros de la Sociedad, y de cualquiera de las siguientes categorías: 1. Trabajos generales (revisiones científicas críticas); 2. Trabajos de investigación (originales); 3. Trabajos de nutrición aplicada (resultados analíticos de programas de intervención y discusión de recomendaciones de aplicación práctica), y 4. Cartas al Editor (comentarios cortos de interés general o relacionados con resultados o conceptos científicos publicados previamente en *Archivos*).



*Archivos Latinoamericanos de Nutrición* (ALAN) is the official publication of the Sociedad Latinoamericana de Nutrición (SLAN), for the dissemination of knowledge in the fields of food and nutrition, principally throughout the American Hemisphere. Articles in Spanish, English, Portuguese and French are accepted, both from the Society members and from nonmembers, in the following categories: 1. General articles (critical scientific reviews); 2. Research articles (originals); 3. Papers in applied nutrition (analytical results from intervention programs and discussion of recommendations of practical application), and 4. Letters to the Editor (short comments of general interest or about scientific facts and concepts previously published in *Archivos*).

**Dirección: Archivos Latinoamericanos de Nutrición**

Apartado 62.778. Chacao.  
Caracas 1060. Venezuela, S.A.  
Fax (58.212) 286.00.61

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION está registrado en ASEREME e indizado en las siguientes Bases de Datos: LILACS/CD ROM; Food Science & Technology Abstracts; MEDLINE, Life Science Collection; Science Citation Index

**ENTIDADES PATROCINANTES**

- **Fundación para la Alimentación y Nutrición "José María Bengoa"**  
Caracas, Venezuela
- **Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP)**  
Guatemala, Guatemala C.A.
- **INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION.** Venezuela
- **CONICIT.** Venezuela
-  **Kellogg's** América Latina
-  **PRODUCTOS ROCHE,** América Latina
- **Fundación POLAR**
- **Nestlé Venezuela, S.A.**
- **Centro de Atención Nutricional Infantil Antímamo. CANIA**
- **PARMALAT de Venezuela**
- **BASF Venezolana S.A.**
- **Cadipro Milk Products, C.A.**
- **ADM Protein Specialties**
- **Coca-Cola de Venezuela**
- **Juan Van Heel, C.A.**

ARCHIVOS LATINOAMERICANOS DE NUTRICION se complace en destacar y agradecer el apoyo económico recibido del CONICIT para la edición sostenida de la revista.

**Bajo la responsabilidad del Capítulo Venezolano de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición.**

# Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Organo Oficial de la  
Sociedad Latinoamericana de Nutrición

---

VOL 52

MARZO 2002

Nº 1

---

## Contenido

Páginas

### TRABAJOS DE INVESTIGACION

#### Nutrición Humana

**Prevalence of anemia during pregnancy: Results of Valencia (Venezuela) anemia during pregnancy study**  
Arturo Martí-Carvajal, Guiomar Peña-Martí, Gabriela Comunian, Sergio Muñoz ..... 5

**Indicadores de riesgo para la deficiencia de vitamina A en menores de 15 años de una comunidad marginal de Valencia, Venezuela**  
María Concepción Páez Valery, Liseti Solano R., Sara Del Real..... 12

#### Bioquímica Nutricional

**Efectos de la diarrea secretora y osmótica sobre la función y morfología del intestino en ratas**  
Margarita de Lima de Mon, Anna M. Cioccia, Eduardo González y Patricio Hevia ..... 20

#### Nutrición Clínica

**El estado nutricional modifica la efectividad de un suplemento dietario de bacterias lácticas sobre la aparición de patologías de vías respiratorias en niños**  
María Esther Rfo, Liliana Beatriz Zago, Hugo Garcia y Luis Winte ..... 29

**Expresión génica de interleucina 1 en la deficiencia de proteínas y vitamina A**  
Vivian Sánchez Alvarez, Manuel Hernández Triana, Mario Abreu Peñate, Ada de las Cagigas Reig,  
Miguel Tam Hurtado, José Rebozo Pérez, Miriam Noa Puig, José Arias Verdé,  
Rebeca Fernández Carriera, Soraya González Calderín, Antonio Sigarroa González ..... 35

## **Nutrición Experimental**

<b>Estimación de proteína potencialmente utilizable en fórmulas infantiles de inicio para neonatos prematuros y de término</b> María J. Binaghi, Andrea Baroni, Carola Greco, Patricia A. Ronayne de Ferrer, Mirta Valencia .....	43
--	----

## **Estudios Dietéticos**

<b>Determinação do consumo de alimentos fontes de vitamina A por gestantes, utilizando o formulário dietético simplificado (FDS)</b> Betizabeth Slater Villar, Maria José Roncada .....	48
--	----

<b>Prácticas alimentarias en las familias del area rural de Medellin- Colombia</b> Martha Cecilia Álvarez Uribe, Laura González Zapata .....	55
---	----

## **Consumo de Alimentos**

<b>Consumo de frutas en una población adulta de Costa Rica</b> Sonia Guzmán Padilla, Marlene Roselló Araya .....	63
---	----

## **Microbiología de Alimentos**

<b>Aislamiento de bacterias Gram positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos</b> José Faría Reyes, Aleida García Urdaneta, Pedro Izquierdo Corser, María Allara Cagnasso, Kutchynskaya Valero Leal .....	68
--	----

<b>Acción germicida <i>in vitro</i> de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos</b> Luis López V, José Romero R y Fernando Ureta V. ....	74
---	----

## **Ciencias de Alimentos**

<b>Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados de caseína</b> Harriman Aley Moraes, Cristiane Márcia da Silva Barbosa, Daniella Cristine Fialho Lopes, Mônica Cristina de Oliveira, Marialice Pinto Coelho Silvestre .....	77
---	----

<b>Efecto de recubrimientos comestibles sobre la calidad sensorial de pimentones verdes (<i>Capsicum annuum L.</i>) durante el almacenamiento</b> Edgar Uquiche Carrasco, Mario Villarroel Tudesca, Luis Cisneros-Zevallos .....	84
---	----

## **Tecnología de Alimentos**

<b>Optimización de una formulación de espaguetis enriquecidos con fibra dietética y micronutrientes para el adulto mayor</b> Emma Wittig de Penna, Lisis Serrano, Andrea Bunger, Delia Soto, Luis López, Nieves Hernández, Jenny Ruales .....	91
--	----

<b>NUEVOS LIBROS</b> .....	101
----------------------------	-----

<b>CARTAS AL EDITOR</b> .....	104
-------------------------------	-----

<b>NOTAS NECROLOGICAS</b> .....	105
---------------------------------	-----

<b>INFORMACION PARA LOS AUTORES</b> .....	107
---	-----

# Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Official Publication of the  
Latin American Society of Nutrition

---

VOL 52

MARCH 2002

Nº 1

---

## Contents

Pages

### RESEARCH PAPERS

#### Human Nutrition

**Prevalence of anemia during pregnancy: Results of Valencia (Venezuela) anemia during pregnancy study**  
Arturo Martí-Carvajal, Guiomar Peña-Martí, Gabriela Comunian, Sergio Muñoz ..... 5

**Risk indicators of vitamin A deficiency in children from slum area of Valencia, Venezuela**  
María Concepción Páez Valery, Liseti Solano R., Sara Del Real ..... 12

#### Nutritional Biochemistry

**Effect of osmotic or secretory diarrhea on rat intestinal function and morphology**  
Margarita de Lima de Mon, Anna M. Cioccia, Eduardo González y Patricio Hevia ..... 20

#### Clinical Nutrition

**Undernutrition affect live lactobacillus effect on respiratory tract infections in children from social risk areas**  
María Esther Río, Liliana Beatriz Zago, Hugo Garcia y Luis Winter ..... 29

#### Gene expression of Interleukin 1 in vitamin A and protein deficiency

Vivian Sánchez Alvarez, Manuel Hernández Triana, Mario Abreu Peñate, Ada de las Cagigas Reig,  
Miguel Tam Hurtado, José Rebozo Pérez, Miriam Noa Puig, José Arias Verdé,  
Rebeca Fernández Carriera, Soraya González Calderín, Antonio Sigarroat González ..... 35

## **Experimental Nutrition**

- Estimation of potentially available protein in starting formulas for term and preterm infants**  
María J. Binaghi, Andrea Baroni, Carola Greco, Patricia A. Ronayne de Ferrer, Mirta Valencia ..... 43

## **Dietary Studies**

- Determination of vitamin A consumption from food sources for pregnant women by using of a simplified dietary assessment (SDA)**  
Betizabeth Slater Villar, Maria José Roncada ..... 48

- Feeding practices among rural families of Medellín, Colombia**  
Martha Cecilia Álvarez Uribe, Laura González Zapata ..... 55

## **Food Consumption**

- Consumption of fruits in an adult Costa Rican population**  
Sonia Guzmán Padilla, Marlene Roselló Araya ..... 63

## **Food Microbiology**

- Isolation of Gram-positive bacteria from raw milk with antimicrobial residues**  
José Faría Reyes, Aleida García Urdaneta, Pedro Izquierdo Corser, María Allara Cagnasso, Kutchynskaya Valero Leal..... 68

- In vitro* germicide action of disinfectant products used in the food industry**  
Luis López V, José Romero R y Fernando Ureta V. .... 74

## **Food Science**

- Characterization of peptide and aminoacid profile in casein hydrolysates**  
Harriman Aley Morais, Cristiane Márcia da Silva Barbosa, Daniella Cristine Fialho Lopes, Mônica Cristina de Oliveira, Marialice Pinto Coelho Silvestre ..... 77

- Edible coating effects on the sensory quality of green bell pepper fruits (*Capsicum annuum L.*) during storage**  
Edgar Uquiche Carrasco, Mario Villarroel Tudesca, Luis Cisneros-Zevallos ..... 84

## **Food Technology**

- Optimization of a spaghetti formula enriched with dietary fibre and micronutrients for elderly people**  
Emma Wittig de Penna, Lisis Serrano, Andrea Bungler, Delia Soto, Luis López, Nieves Hernández, Jenny Ruales ..... 91

- NEW BOOKS** ..... 101

- LETTERS TO THE EDITOR** ..... 104

- IN MEMORIAM** ..... 105

- INFORMATION FOR AUTHORS** ..... 107

## Prevalence of anemia during pregnancy: Results of Valencia (Venezuela) anemia during pregnancy study

Arturo Martí-Carvajal, Guiomar Peña-Martí, Gabriela Comunian, Sergio Muñoz

Clinical Epidemiology Unit, Universidad de Carabobo and Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera", Venezuela and Clinical Epidemiology Unit, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.

**SUMMARY.** To determine the prevalence of anemia during pregnancy in Venezuelan pregnant women. By using a cross-sectional study, 630 Venezuelan pregnant women in their third trimester at labor from the Valencia Anemia during Pregnancy Study were studied. Anemia during pregnancy was defined according to WHO guidelines (Hb < 11g/dl), iron deficiency was considered when serum ferritin level was < 12 ng/ml, and when serum folate level was < 3ng/ml, it was considered as folate deficiency. 630 pregnant women (mean [ $\pm$  SD] age, 24 $\pm$  6.4 years) having an average of Hb 11.38 $\pm$ 1.47 g/dl [95%CI = 11.27 to 11.50] were studied. No patient had hemolytic anemia nor clinical infections. Almost all patients were from low or very low socioeconomic status. Prevalence of anemia was 34.44% (severe: 1.8%, moderate: 15.2%, and mild: 83%). Iron deficiency anemia (IDA) was present in 39.2% (95%CI= 32.7 to 45.7), prevalence of folate deficiency anemia (FDA) was 11.98% (95%CI = 7.6% to 16.3%). Combined anemia (IDA and FDA) occurred in 11.52% (95%CI= 7.27% to 15.7%). Multivariate analysis showed that multiparous (odds ratio -OR-: 1.95, 95%CI= 1.28 to 2.97,  $p = .002$ ) and supplement use of iron (OR: .55 (95%CI= .33 to .91,  $p = .02$ ) are associated with IDA. The factors associated with FDA were: supplement use of folic acid (OR: .37 (95%CI=.19 to .71,  $p = .003$ ) and appropriate prenatal control (OR: .51 95%CI= .27 to .96,  $p = .04$ ). Prevalence of anemia during pregnancy was found to be high. Educational efforts should be stressed in order to encourage improvements in the prenatal care visits.

**Key words:** Anemia, pregnancy, prevalence, Venezuela, third trimester.

**RESUMEN. Prevalencia de anemia durante el embarazo: Resultados del grupo de estudio de anemia durante el embarazo en Valencia, Venezuela.** El objetivo fue determinar la prevalencia de anemia durante el embarazo. Se utilizó un diseño de corte transversal. El estudio fue realizado en la Maternidad " Dr. J.L. Facchín de Boni", principal hospital obstétrico y ginecológico de Valencia, Venezuela. Se estudiaron 630 embarazadas durante el tercer trimestre gestacional, en trabajo de parto. Anemia durante el embarazo fue definida como hemoglobina menor de 11g/dl (OMS). Deficiencia de hierro fue considerada cuando el nivel de ferritina sérica era menor de 12 ng/ml y se diagnosticó deficiencia de folatos cuando el nivel era menor de 3ng/ml. La edad promedio de las pacientes fue 24 $\pm$ 6.4 años, siendo la media de la Hb de 11.38 $\pm$ 1.47 g/dl [IC 95% = 11.27 a 11.50]. Ninguna paciente tenía anemia hemolítica o infección clínica. Casi todas provienen de estratos socioeconómicos bajo o muy bajo. La prevalencia de anemia fue 34.44% (severa: 1,8%, moderada: 15,2% y leve: 83%). La anemia por deficiencia de hierro (ADFe) estuvo presente en 39.2% (IC95% = 32.7 a 45.7), mientras que la prevalencia de anemia por deficiencia de folatos (ADFo) fue 11.98% (IC95% = 7.6% a 16.3%). La anemia combinada (ADFe y ADFo) se diagnóstico en 11.52% (IC95%=7.27% a 15.7%). El análisis multivariable mostró que la multiparidad (odds ratio -OR-: 1.95, IC95%= 1.28 a 2.97,  $p = .002$ ) y el aporte de hierro (OR: .55 (IC95%= .33 a .9,  $p = .02$ ) están asociados con ADFe. Los factores asociados con ADFo fueron el aporte de ácido fólico (OR: .37 (IC95%=.19 a .71,  $p = .003$ ) y adecuado control prenatal (OR: .51 IC95% = .27 a .96,  $p = .04$ ). Se concluye que la prevalencia de anemia durante el embarazo es alta. Esfuerzos educacionales deben ser realizados para incrementar el control prenatal.

**Palabras clave:** Anemia, embarazo, prevalencia, Venezuela, tercer trimestre.

### INTRODUCTION

Anemia during pregnancy is a worldwide problem (1). The nutritional anemia is the most important cause of maternal anemia. Iron deficiency (ID) and folate deficiency (FD) are considered as the first two causes of nutritional anemia. Furthermore, iron deficiency anemia (IDA) is the most important public health problem in hematology in the developing countries (2). During pregnancy there is an

increase of iron and folate requirements, therefore the likelihood of presenting ID and FD is high if there is not supplementation during the pregnancy. Diagnosing both deficiencies in pregnant women is critical because several evidences relate IDA to increased risk of maternal and fetal morbidity and mortality and premature delivery and low birth weight.

To our knowledge, there are no investigators in Latin América who have evaluated a hospital – based sample of

subjects performing both serum ferritin and serum folate simultaneously with a sample calculated prior to research. The Valencia Anemia during Pregnancy Study (VAPS) was established in 1996 in order to carry out epidemiological researches in the main industrial city of Venezuela with two goals: determine the true prevalence of anemia during pregnancy and determine the association and its magnitude between prematurity and low birth weight with maternal anemia.

This cross-sectional study was performed in pregnant women during the third trimester at labor in order to evaluate the prevalence of anemia during pregnancy in Valencia, Venezuela.

## METHODS

From May to December 1996, we examined 630 consecutive Venezuelan pregnant women in their third trimester at labor. No patients had clinical infections, hemoglobinopathies, or chronic inflammatory diseases. Almost all patients were from low or very low income families and live in Valencia, Estado Carabobo.

The research was conducted at the Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera" in Valencia, Venezuela, a tertiary hospital of 900 beds, center of reference for a population of 3.000.000 in the north central region of Venezuela. The Department of Obstetrics and Gynecology is very busy with over 18000 deliveries yearly.

An electronic counter performed complete blood count, anemia was defined according to WHO guidelines (Hb < 11 g/dl), and it was classified as severe (Hb < 7g/dl), moderate (7 g/dl to 9 g/dl), and mild (10 g/dl to < 11 g/dl). Serum ferritin was performed using Spectro Ferritin™ (Ramco Laboratories, Houston, TX, USA). ID was defined as a serum ferritin level < 12 ng/ml. Only serum folate was measured in this research, the kit to measure erythrocyte folate level was not available. We used a Folate Radioassay Kit [<sup>125</sup>I] (ICN Pharmaceuticals, Orangeburg, N.Y, USA). FD was defined when serum folate level was lower than 3 ng/mL according to Wagner (3). Microcytosis was defined as mean corpuscular volume (MCV) lesser than 76fL and macrocytosis was considered when MCV was greater than 96fL.

This research was approved by the Ethical Committee of the Ciudad Hospitalaria "Dr. Enrique Tejera", and free informed consent was obtained from all patients enrolled into the study.

**Sample size:** Sample size was calculated assuming an estimated prevalence of maternal anemia of 37%, a significance level of 5% and sampling error of 10%. To satisfy these conditions, the number of subjects needed for the study was 630 pregnant women.

**Statistical analysis:** Data is presented as mean±SD unless otherwise noted. Medians, percentiles and range are presented since most of the biological variables are not normally distributed. Categorical variables were compared by using chi-square test or Fisher's exact test when appropriate. Continuous variables were analyzed by using the Student's *t*-test for unpaired data. To compare means between 3 or more groups, One-way ANOVA procedure was used. To evaluate equal variances, Bartlett's test was used. To compare all pairs of means after ANOVA (multiple comparison post test), the Bonferroni test was used. All variables that showed a statistically significant association ( $\alpha < .1$ ) with anemia in univariate analysis were included in the multivariate analysis. Multivariate analysis was applied using stepwise backward logistic regression. All statistical tests were two-tailed, and *p* value < 0.05 was considered to indicate statistical significance. Stata software (version 6.0, Stata, College Station, Texas) was used for statistical analyses.

## RESULTS

During the study period, data from 630 Venezuelan pregnant women were studied having an average age of 24±6.40 ranging from 14 to 48 years. In this group, 179 of the 630 pregnant women (28%) were teenagers. Two hundred and seventeen pregnant women (34.44%) had not appropriate prenatal control (less than 5 visit), and seventy-four subjects (11.75%) had no prenatal care visits at all. One-hundred forty eight pregnant women showed pregnancy -induced hypertension or eclampsia (23.5%). The general and obstetric characteristics of the patients are summarized in Table 1.

TABLE 1  
General characteristics of pregnant women (n = 630)

Variable	Mean (±SD)	95%CI	Median	Range	n (%)
Age	24 (±6.4)	23.6 to 24.6	23	14 - 48	
Parity			1	0 - 10	
Gestation			2	1 - 15	
Interval pregnancy φ week	40.8(±32.8)	37.4 to 44.2	24	0 - 192	
Prenatal Care Visit	5.27 (±2.78)	5.05 to 5.49	6	0 - 17	
Multiparous					214/630 (34)
Multigesta					364/630 (58)
Uterine Bleeding					
None					514/630 (82)
I trimester					39/630 (6.1)
II trimester					25/630 (3.9)
III trimester					35/630 (5.5)
more than one					17/630 (2.7)
Total bleeding					116/630 (18)
Iron supplementation					525/630 (83)
Folate supplementation					512/630 (81)

φ= 364 pregnant women

The values of Hb, ferritin and serum folate levels and as well as MCV are shown in Table 2. The values of Hb ranged from 5.6 to 15.4 g/dl. The median of Hb, ferritin, serum folate and MCV was 11.5 g/dl (95%CI = 11.3 to 11.6), 16.9 ng/ml (95%CI=15.6 to 18.5), 6.4 mg/ml (95%CI = 6 to 7) and 86 fL (95%CI = 86 to 87), respectively.

TABLE 2  
Hematological characteristics of pregnant women  
(n = 630)

Variable	Mean ( $\pm$ SD)	95%CI	Median	Range
Hb (g/dl)	11.9 ( $\pm$ 1.4)	11.2 to 11.5	11.5	5.6 to 15.4
Serum Ferritin (ng/ml)	30.5 ( $\pm$ 2.1)	26.8 to 34.7	16.9	0.9 to 781
Serum Folate (mg/ml)	8.2 ( $\pm$ 6.3)	7.7 to 8.7	6.4	0.44 to 44
MCV (fL)	86.4 ( $\pm$ 6.2)	85.9 to 86.8	86	64 to 111

The mean concentration of serum ferritin in women with toxemia ( $43.5 \pm 95.6$  ng/ml, 95%CI= 28 to 59.1) was significantly higher than that of healthy pregnant women ( $26.5 \pm 31.2$  ng/ml, 95%CI = 23.7 to 29.3) ( $p = 0.0008$ ). The hematocrit values were not significantly different among the two groups. Indeed, the mean concentration of hematocrit in hypertension group was  $35.8 \pm 4.1$  (95%CI = 35.1 to 36.4), while in the healthy group, it was  $35.5 \pm 4.2$  (95%CI = 35.2 to 35.9) ( $p = .57$ ).

Twenty-six patients (4%) had microcytosis, while thirty-three pregnant women (5%) presented macrocytosis.

From the 630 study participants, 217 had anemia (34.44%, 95% CI= 30.7 to 38.1). The three stages of anemia prevalence were as follow: 1.8% (4/217) severe, 15.2%(33/217) moderate and 83% (180/217) mild. The prevalence of IDA was 39.2% (95% CI = 32.7 to 45.7), FDA was present in 11.98% (95% CI= 7.6 to 16.3), combined anemia (IDA and FDA) occurred in 11.52% (95% CI =7.27 to 15.7) and other types of anemia were found in 37.33% (95% CI = 30.8 to 43.7). Twenty percent had folate deficiency (125/630). Of them, forty-one percent (51/125) had FDA. Thirty-four percent had iron deficiency (217/630), and in this cohort with ID, 51% of the subjects (110/217) had IDA.

Table 3 shows the mean of Hb by type of anemia. Analysis with one-way ANOVA indicated a non statistically significant difference among the groups ( $F_{3,216} = 0.23$ ;  $p = 0.87$ ).

TABLE 3  
Mean of hemoglobin according to type of anemia

TYPE (n = 217)	%	Mean ( $\pm$ SD)	95%CI	Range
IDA (85)	39.2	9.7 ( $\pm$ 1)	9.5 to 9.9	5.6 to 10.9
FDA (26)	11.98	9.7 ( $\pm$ .98)	9.3 to 10.1	7.5 to 10.9
MDA (25)	11.52	9.7 ( $\pm$ .79)	9.4 to 10.1	7.9 to 10.9
Others Anemia (81)	37.33	9.8 ( $\pm$ .1)	9.6 to 10.1	5.9 to 10.9

IDA = Iron Deficiency Anemia  
FDA = Folate Deficiency Anemia  
MDA = Mixed Deficiency Anemia

One-way Analysis of variance analysis showed a non statistically significant difference among the groups of anemic patients according their ages. Indeed, the mean of ages is as follow: IDA ( $24.9 \pm 6.1$ ), FDA ( $24.8 \pm 7.6$ ), Mixed Anemia ( $23.4 \pm 6$ ), and Other types of Anemia ( $24.1 \pm 6.3$ ) ( $F_{3,216} = 0.47$ ;  $p = 0.70$ ).

The mean of MCV was different according to the type of anemia ( $F_{3,216} = 5.55$ ;  $p = 0.001$ ) (Table 4). For each of the six possible pairwise tests, Bonferroni's correction is as follow: IDA vs FDA ( $p = 0.003$ ), IDA vs mixed anemia ( $p = 1$ ), IDA vs others anemia ( $p = 0.04$ ), FDA vs mixed anemia ( $p = 0.047$ ), FDA vs others anemia ( $p = 0.59$ ), and mixed anemia vs others anemia ( $p = 0.59$ ).

TABLE 4  
MCV among fourth type groups of anemic pregnant women(n =217)

Anemia TYPE	MCV (fL)	n(%)
	Mean ( $\pm$ SD) 95%CI	
Iron Deficiency Anemia	83.3( $\pm$ 7) 69 to 102	85(39.2)
Folate Deficiency Anemia	88.5( $\pm$ 6.4) 76 to 101	26(11.9)
Mixed Anemia	83.6( $\pm$ 6) 70 to 99	25(11.5)
Others Anemia	86.1( $\pm$ 6.3) 72 to 101	81(37.3)

In the teenagers group (179 patients), 59 of them (33%) had anemia. However, teenager pregnant women did not have an increased risk of anemia (Table 5).

TABLE 5  
Anemia in pregnant women teenagers

Variable	n	%	OR	95%CI	P
Anemia	59	32.9	.91	.63 to 1.3	.62
Iron Deficiency	53	29.6	.73	.50 to 1.06	.10
Folate Deficiency	35	19.5	.97	.63 to 1.5	.90
Iron Deficiency Anemia	18	30.5	.64	.37 to 1.1	.11
Folate Deficiency Anemia	10	16.9	1.6	.72 to 3.5	.24
Mixed Anemia	7	11.8	.97	.41 to 2.3	.96
Other Anemia	24	40.6	1.07	.64 to 1.7	.79

The odds ratio and 95% confidence intervals of the variables that were found to have a statistically significant association with FDA and IDA in the univariate analysis are as follow: For FDA, multiparous (OR: 1.9, 95%CI = 1.3 to 2.8,  $p=0.001$ ), inappropriate prenatal control (OR: 1.8, 95%CI = 1.2 to 3.0,  $p=0.001$ ), supplement use (OR: 0.33, 95%CI = 0.21 to 0.51,  $p=0.001$ ), and for IDA, multiparous (OR: 1.8, 95%CI = 1.3 to 2.6,  $p=0.001$ ), inappropriate prenatal control (OR: 1.59, 95%CI = 1.1 to 2.4,  $p=0.007$ ), supplement use (OR: 0.53, 95%CI = 0.35 to 0.82,  $p=0.001$ )

Primigravid women had protection against ID (OR = 0.52, 95%CI = 0.37 to 0.73  $p=0.0002$ ) and FD (OR = 0.48, 95%CI = 0.32 to 0.73  $p=0.0006$ )

Associated factors with IDA and FDA in the multivariate analysis are shown in Table 6.

TABLE 6  
Multivariate analysis of risk factors for maternal nutritional anemia

Anemia Type	Odds Ratio	95%CI	P
Folate Deficiency Anemia			
Supplement Use	.37	.19 to .71	.003
Appropriate Prenatal Control	.51	.27 to .96	.04
Iron Deficiency Anemia			
Multiparous	1.95	1.28 to 2.97	.002
Supplement Use	.55	.33 to .91	.02
Mixed Anemia			
Multiparous	2.6	1.12 to 5.8	.024
Bleeding	.33	.07 to 1.8	.15
Inappropriate Prenatal Control	1.9	.82 to 4.2	.13

Supplement use of folic acid and appropriate prenatal control (>5 visits) were independently associated with FDA, both factors had protector effect against FDA. While multiparity and supplement use of iron were associated with IDA. Multiparity had deleterious effects on pregnant women.

## DISCUSSION

In this study population, the prevalence of maternal anemia was 34.44%. This level is as high as others seen in developing countries (1,4-7). Although the burden of this problem is higher in some other countries, such as West Africa (66%) (4), Singapore (81%) (8), or Perú (70%) (9).

Anemia during gestation is an indicator of the precarious nutritional status of any country and it remains as a world wide public health problem. WHO defends that ID is the most common deficiency disease of the world (10). The main cause of anemia in pregnancy is nutritional, being ID and FD its most important responsible factors (11,12).

According to what is mentioned above, we will introduce the discussion in two sections: first, iron deficiency anemia, and second, folate deficiency anemia.

As a result of ID, it is considered that more than half a billion people of the world have deleterious effects (13). So, Ogbeide et al (14) recommend a regular review of factors which may contribute to prevent the maternal anemia. However, there is still controversy surrounding the impact of the anemia on outcome of pregnancy, at least in developed countries (15,16). Nevertheless, Scholl et al point out that the relationship between inadequate iron intake and increased likelihood of preterm delivery is kept during the third trimester (17,18).

Independently of its impact on fetal health, maternal anemia increases the risk of maternal morbidity (19). Therefore, it is very important to prevent and to treat maternal anemia.

Looker et al (20) report 2% to 5% of American teenagers with iron deficiency. In a recent study in Brasil (21), in São Paulo, the prevalence of anemia in pregnant adolescents was 14.2%, nevertheless the frequency of ID was high (48.4%). Regarding Looker's results (20), our study showed a prevalence four times higher and in comparison with Brasil (21) it was twice as high.

Although the pregnant adolescent was not our central objective, we should mention that the adolescent didn't have a statistically significant association with anemia in general or anyone of its types. Similar results are shown in a review and Meta-analysis by Scholl et al (22). Contrary to Beard (23) that points out that adolescence is a risk factor for maternal anemia. We considered that the rational approach to IDA in this group is not different to the other pregnant woman. The evaluation of anemia during pregnancy is not very different than that of any anemic adult.

Serum ferritin concentration is currently the gold standard to detect iron deficiency, however it is also known that ferritin is an acute-phase reactant associated with acute and chronic disorders. We found high levels of serum ferritin in patients

with toxemia; this has also been reported by Tamura (24), Entman (25) and Maymon (26). The exact mechanisms that induce an increase of ferritin levels in toxemic pregnant women are not known. This fact is very important because our prevalence of ID and IDA could be higher. Therefore, it is necessary to use a more sensitive and specific indicator of body iron stores such as serum transferrin receptors (27-29).

Many and Duffy (11) point out that an increase of ferritin in the third trimester may rarely be found associated with inflammatory or autoimmune disorders and toxemia of gestation. It has pointed out that high serum ferritin concentration in the third trimester, resulting from a failure of ferritin to decline, is associated with very preterm delivery and markers of maternal infection (30).

Two aspects deserve a comment: First, comparing the healthy group with the toxemia group using the results of hematocrit, we found that those results permitted to discard the possibility of insufficient blood volume expansion among both groups. Second, in connection with the MCV, it must be kept in mind that its value is limited because there exists a physiologic increase of the red cell size during pregnancy. We find that the mean MCV for the patients with IDA is somewhat lower than the mean for the patients with FDA.

¿What would be the reasons to explain the high prevalence of maternal anemia in our region? The main factors are ID and FD which are associated with multiparity, low socioeconomic status, low rate of prenatal control and iron and folic acid supplementation. The same factors are reported by others researchers (4,14,31,32). Of course, worldwide, the main cause of ID in adults is gastrointestinal blood loss, however, in premenopausal women with IDA the most important cause is excessive menstrual blood loss or pregnancy (20). In the tropical area, hookworm is also a very common cause. We think that in our region another associated factor for IDA could be the increase of vegetable consumption. The low bioavailability of iron in vegetables is well known. Calcium intake during pregnancy could impair iron absorption (33), even though we can only suggest it since our study does not include this issue.

Meda et al (4) report hemolysis due to hemoglobinopathies and malaria as factor responsible for high prevalence of maternal anemia, none of our pregnant women showed hemolytic disorders.

Folate deficiency is considered as the second cause of nutritional anemia (34). In our city, 20% was the prevalence of FD but in the pregnant women with FD the magnitude of the FDA was 51%.

Folate deficiency (FD) is the main cause of megaloblastic anemia (MA) during pregnancy. But, the majority of MA in pregnant women are seen during the third trimester and postpartum period (35). This could be explained by the

existence of an appropriate folate's storage for up to 20 weeks. The associated factors with FD and FDA in our pregnant women were multiparity and inappropriate prenatal control, which could hide an inadequate diet. It is well established the effectiveness of periconceptional folate supplementation to prevent neural tube defects, nevertheless, controversy exists surrounding the effectiveness of folic acid to prevent low birth weight (LBW), duration of gestation (36), and other obstetric complications. None of our pregnant women had newborn with malformations. It has been described that lower concentrations of serum folate at week 28 are associated with a greater risk of preterm delivery and low birth weight (37). To the moment, this paper was written, we are analyzing the association between maternal anemia, FDA, IDA, LBW and prematurity.

Despite the significant body of evidence about the various aspects of ID and FD, why do ID and FD remain as a major public health problem throughout the world, specially in developing countries? Are the health policy makers doing all efforts to reduce the magnitude of the problem? Do health programs have enough effectiveness to reduce it? All data indicate lack of effectiveness and poor efficiency. Without any doubts, the programs remain poorly implemented. What is the main etiologic fraction of the cause that does not allow reducing the problem? Why do not we globalize the health all over the world?

In order to reduce the burden of the problem, we propose some strategies for preventing IDA and FDA during pregnancy: 1.- Use of quality assurance methods (QA) such as those proposed by Abubaker et al (38). They authors demonstrated that QA has been effective in reducing iron deficiency anemia in a rural population from Egypt, 2.- We consider that, at least in those developing countries with high or very high rate of maternal anemia, it must be mandatory guarantee free iron and folic acid supplementation to pregnant woman, even six month postpartum. This must be all associated with food fortification. This last issue has been proved useful by Layrisse et al (39). 3.- Practitioners should take decisions related to the strategies "daily versus intermittent" iron supplementation based on economic, cultural, personal aspects of the pregnant woman, and side effects of drug.

In an elegant review, Walker (40) asks himself "what priority should it have? in relation to the remedying of iron deficiency". He recommends iron supplementation associated with food fortification. Suggestions about how to do prophylactic iron administration in pregnancy and management of IDA and FDA appears in many reviews (11,13,31,41). 4.- Medical Societies of Hematologists and Obstetricians must use their position in society to influence public opinion and government health planners.

To have carried out this study might have contributed to give an idea of the magnitude of the problem in this city and in Venezuela. These results can be the tip of the iceberg that is the national situation.

One limitation of this study was that red blood cell folate levels, which reflect tissue levels, could not be measured. Despite that limitation, however, this factor does not obscure the basic message that pregnant women in this city have a significant FD, and it is very important to supply this micronutrient to this population. Also, these results have contributed, in Venezuela, to improve the knowledge of the epidemiology of this very important public health problem in hematology.

In summary, in the conditions studied, there is a high prevalence of nutritional anemia in pregnancy in Valencia, main industrial city, in Venezuela. Strategies must be carried out to reduce the burden of the problem.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to Professor Miguel Layrisse for critical reading of the manuscript and helpful suggestions.

We want to express our deep gratefulness to the Dra. Liseti Solano, Director of the Centro de Investigaciones en Nutrición (CEINUT), Universidad de Carabobo and IVSS. Likewise to the Lic. Gloria El Khoury to carry out the determinations of serum ferritin. Finally, to the Lic. Mariana Lucco and to the technical personnel of the Laboratory of Hormones of the "Centro Policlínico Valencia" for the technical attendance in the determination of the folic acid. But overall, for the human support that they gave us. Thank you.

This research was supported by a grant # CDCHT-UC-742-97 from Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico of Universidad de Carabobo, Venezuela.

*Conflicts of interest:* None.

#### REFERENCES

- World Health Organization: The prevalence of anaemia in women. Geneva: World Health Organization;1992.
- Chandy M. Management of Hematological Diseases: Socio-Economic Aspects. In Hematology 1999: Educational Book, American Society of Hematology, New Orleans, Dec 1999, pp 73-76.
- Wagner C. Folic acid. In: present Knowledge in Nutrition. Fifth edition. The Nutrition Foundation Inc., Washington, D.C., pp332-346, 1984.
- Meda N, Mandelbrot L, Cartoux M, Dao B, Ouangre A, Dabis F. Anaemia during pregnancy in Burkina Faso, West Africa, 1995-96: prevalence and associated factors. Bull World Health Organ. 1999;77:916-22.
- Dop MC, Blot I, Dyck JL, Assismadi K, Hodonou AKS, Doh A. L'anémie á l'accouchement á Lomé (Togo): Prevalence, facteurs de risqué et repercussions chez le nouveau-né. Rev Epidemiol Santé Publique 1992; 40:259-67.
- Fleming AF. Anaemia in pregnancy in tropical Africa. Trans R Soc Trop Med Hyg 1989;83:441-48.
- Hercberg S, Chauliac M, Devalay M, Galan P, Christides JP, Potier de Courcy C et al. Evaluation of the iron status of a rural population in South Benin. Nutr Res 1986;6:627-34.
- Singh K, Fong YF, Arulkumaran S. Anaemia in pregnancy - a cross-sectional study in Singapore. Eur J Clin Nutr 1998;52:65-70.
- Becerra C, Gonzales GF, Villena A, de la Cruz D, Florián A. Prevalencia de anemia en gestantes Hospital regional de Pucallpa, Perú. Rev Panam Salud Publica / Pan Am J Public Health 1998;3: 285-92.
- DeMaeyer EM, Dallman P, Gurney JM, Hallberg L, Sood SK, Srikantia SG. Preventing and controlling iron deficiency anemia through primary health care. Geneva: WHO. 1989.
- Mani S, Duffy TP. Anemia of Pregnancy. Clin Perinatol 1995;22:593-07.
- Hercberg S, Galan P. Nutritional anaemia. Bailliere's Clin Haematol 1992;5: 143-68.
- Andrews NC. Disorders of iron. N Engl J Med 1999;341:1986-95.
- Ogbeide O, Wagbatsoma V, Orhue A. Anaemia in Pregnancy. E Afr Med J 1994;71:671-73.
- Mahomed K. Routine iron supplementation during pregnancy [Cochrane review]. In: Neilson JP, Crowter CA, Hodnet ED, Hofmeyr GJ, Keirse MJNC, editors. Pregnancy and childbirth module of the Cochrane Database of Systematic Reviews. In: The Cochrane Library, Issue 2, 1998. Oxford: Update Software.
- Kramer MS. Maternal nutrition, pregnancy outcome and public health policy. CMAJ 1998;159:663-65.
- Scholl TO, Hediger ML. Anemia and iron-deficiency anemia: compilation of data on pregnancy outcome. Am J Clin Nutr 1994;59(suppl):492S-01S.
- Scholl TO, Hediger ML, Fisher RL, Shearer JW. Anemia vs iron deficiency: increased risk of preterm delivery in a prospective study. Am J Clin Nutr 1992;55:985-88.
- Oppenheimer S, Hendrickse R. The clinical effects of iron deficiency and iron supplementation. Nutrition Abstracts and Reviews in Clinical Nutrition. Serie A.1983;53:585-98.
- Looker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Johnson CL. Prevalence of iron deficiency in the United States. JAMA 1997;277:973-76.
- Fujimori E, Oliveira IMV, Nuñez de Cassana LM, Szarfarc SC. Estado Nutricional del hierro de gestantes adolescentes, São Paulo, Brasil. Arch Latinoamer Nutr 1999;49:8-12.
- Scholl TO, Hediger ML, Belsky DH. Prenatal Care and Maternal Health During Adolescent Pregnancy: A review and Meta-analysis. J Adolesc Health. 1994;15:444-56.
- Beard L. Iron Deficiency assessment during pregnancy and its importance in pregnant adolescents. Am J Clin Nutr 1994; 59:502S-10S.
- Tamura T, Goldenberg RL, Johnston KE, Cliver SP, Hickey CA. Serum Ferritin: A predictor of early spontaneous preterm delivery. Obstet Gynecol 1996; 360-65.

25. Entman SS, Richardson LD, Killiam AP. Elevated serum ferritin in the altered ferrokinetics of toxemia of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1982;144:418-22.
26. Maymon R, Bahari C, Moroz C. Placental iso-ferritin: A new serum marker in toxemia of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:681-84.
27. Ferguson BJ, Skikne BS, Simpson KM, Baynes RD, Cook JD. Serum transferrin receptors distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med* 1992; 119:385-90.
28. Ahluwalia N. Diagnostic utility of serum transferrin receptors measurements in assessing iron status. *Nutr Rev* 1998;56:133-41.
29. Åkesson A, Bjerlerup P, Berglund M, Bremme K, Vahter M. Serum transferrin receptor: a specific marker of iron deficiency in pregnancy. *Am J Clin Nutr* 1998;68:1241-46.
30. Scholl TO. High third-trimester ferritin concentration: associations with very preterm delivery, infection, and maternal nutritional status. *Obstet Gynecol* 1998;92:161-66
31. Schwartz WJ, Thurnau GR. Iron Deficiency Anemia in Pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1995;38:443-54.
32. Blot I, Diallo D, Tchernai G. Iron deficiency in pregnancy: effects on the newborn. *Curr Opin Hematol* 1999;6:65-70.
33. Robinson S, Godfrey K, Denne J, Cox V. The determinants of iron status in early pregnancy. *Br J Nutr* 1998;79:249-55.
34. Baker SJ, DeMaeyer EM. Nutritional anemia. Its understanding and control with special reference to the work of the World Health Organization. *Am J Clin Nutr* 1979;32:368-17.
35. Campbell B. Megaloblastic anemia in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 1995;38:455-62.
36. Mahomed K. Routine folate supplementation during pregnancy [Cochrane review]. In: Neilson JP, Crowter CA, Hodnet ED, Hofmeyr GJ, Keirse MJNC, editors. *Pregnancy and childbirth module of the Cochrane Database of Systematic Reviews*. In: *The Cochrane Library, Issue 2, 1998*. Oxford: Update Software.
37. Scholl TO, Hediger ML, Schall JI, Khoo CS, Fischer RL. Dietary and serum folate: their influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 1996 63:520-5
38. Abubaker WA Al-Assaf AF, Cleaver VL. Quality assurance and iron deficiency in Egypt. *Intern J Qual Health Care* 1999;11:163-68
39. Layrisse M, Chaves JF, Mendez-Castellano H, Bosh V, Tropper E, Bastardo B, Gonzalez E. Early response to the effect of iron fortification in the Venezuelan population. *Am J Clin Nutr* 1996; 64: 903-07.
40. Walker ARP. The remedying of iron deficiency: what priority should it have? *Br J Nutr* 1998;79:227-35.
41. Viteri FE. Iron supplementation for the control of iron deficiency in population at risk. *Nutr Rev* 1997;55:195-09.

Recibido: 14-08-2000

Aceptado: 19-11-2001

## Indicadores de riesgo para la deficiencia de vitamina A en menores de 15 años de una comunidad marginal de Valencia, Venezuela

*María Concepción Páez Valery, Liseti Solano R., Sara Del Real*

Centro de Investigaciones en Nutrición. Universidad de Carabobo, Valencia-Venezuela

**RESUMEN.** La deficiencia subclínica de vitamina A (VA) es difícil de evaluar pues no existe un único indicador apropiado para todas las situaciones. Con el objeto de conocer el estado de VA en grupos vulnerables, se estudiaron 590 niños menores de 15 años, aparentemente sanos de una comunidad marginal de Valencia, Venezuela. Se evaluó ingesta de VA por recordatorio de 24 horas, riesgo por consumo deficiente según metodología IVACG, estado de VA por niveles séricos de retinol (HPLCr) y Citología de Impresión Conjuntival (CIC) según metodología ICEPO. Se clasificó el grupo por edad en menores de 7 años, entre 7 y 10 años y 11 años o más. Se calcularon estadísticos descriptivos y pruebas no paramétricas (Mann Whitney,  $\chi^2$ ). Según IVACG se encontró 0,6% a riesgo alto de déficit, 8,8% moderado y 90,6% leve. Según retinol sérico se detectó 0,7% de déficit (<20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) y 25,1% de niveles marginales (20-30  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) y por CIC 11,1% de déficit, sin encontrarse asociación con la edad ni sexo. Estas prevalencias, identifican la deficiencia de VA como un problema leve de salud pública en el grupo. A pesar de no detectarse déficit franco (<10  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) un porcentaje importante (25,1%) presentaba niveles séricos marginales y 11,1% mostraban alteraciones en sus epitelios.

**Palabras clave:** Estado de vitamina A, citología de impresión conjuntival, población infantil, deficiencia de vitamina A, Venezuela.

**SUMMARY.** Risk indicators of vitamin A deficiency in children from slum area of Valencia, Venezuela. Subclinical vitamin A (VA) deficiency is difficult to assess since there is not a single suitable indicator for every situation. With the objective of assessing VA status in a vulnerable group, 590 healthy children (<15 years of age) from a low-income community of Valencia, Venezuela, were studied. VA intake was assessed through 24 hour dietary recalls, risk of VA intake deficiency was assessed following the IVACG methodology, VA status was assessed through serum retinol levels (HPLCr) and Conjuntival Impression Cytology (CIC) according to ICEPO methodology. The sample was characterized by age (less than 7 years old, from 7 to 10 years old, and 11 years old or older). Descriptive statistics and non-parametric tests (Mann Whitney,  $X^2$ ) were performed. According to IVACG, 0,6% were at high risk of deficiency, 8,8% had moderate risk and 90,6% had low risk. Results from serum retinol showed 0,7% of deficiency (<20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ), and 25,1% of low levels (20-30  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ); according to CIC, 11,1% of the sample was deficient. No relationship was found by age or sex. These prevalences identify the VA deficiency as a mild public health problem. Although there was no deficiency per se (<10  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ), this group has a higher vulnerability to infectious diseases since 25% of the sample showed low levels of serum retinol and 11,1% showed abnormalities in its epithelial cells.

**Key words:** Vitamin A status, conjuntival impression cytology, children, vitamin A deficiency, Venezuela.

### INTRODUCCION

Hasta hace poco tiempo, la hipovitaminosis A, como problema de salud pública, se definía por la prevalencia de síntomas y signos clínicos tales como ceguera nocturna, y xeroftalmia en sus distintos grados, que a veces se corroboraban con el registro de concentraciones sanguíneas muy bajas de esa vitamina. Actualmente, debido a que numerosos trabajos han encontrado que algunas infecciones son más graves y generan un mayor riesgo de mortalidad cuando las reservas de vitamina A del organismo son bajas, se consideran poblaciones con deficiencias de vitamina A, no sólo aquellas que presentan manifestaciones clínicas sino también aquellas donde las reservas hepáticas se encuentran

disminuidas, aun cuando no se presenten manifestaciones clínicas (1-7).

En el ámbito poblacional, la hipovitaminosis A subclínica, llamada a veces marginal, es difícil de determinar porque no existe un solo indicador definitivo apropiado para todas las situaciones. Se han desarrollado distintos métodos para determinar el estado corporal de vitamina A, sin embargo todos presentan ciertas limitaciones, por lo que el uso de uno solo de ellos es inadecuado (3,8).

Los indicadores comúnmente usados incluyen ingesta dietaria de vitamina A, niveles de retinol sérico y adaptación nocturna, los cuales tienen sus limitaciones en precisión, especialmente cuando se aplican en estudios clínicos o en niños pequeños (generalmente los más vulnerables). Nuevos

indicadores se han venido desarrollando entre los que se encuentran la prueba de Dosis Respuesta Relativa (DRR) o la Dosis Respuesta relativa Modificada, la Citología de Impresión Conjuntival (CIC) y la Dilución Isotópica para estimar las reservas corporales totales. Todos estos métodos según Underwood son muy prometedores, pero requieren trabajo adicional para verificar su sensibilidad, especificidad y valor predictivo como indicadores tanto al nivel individual como de comunidad (3,8,9).

La prueba de Citología de Impresión Conjuntival (CIC) ha sido propuesta como indicador precoz de la deficiencia de vitamina A y evalúa microscópicamente los cambios histológicos en los tejidos epiteliales antes de que ocurra la manifestación clínica (8-11). Es un indicador logísticamente factible a nivel de campo por su simplicidad en el manejo y transporte de las muestras debido a que no requieren refrigeración, sin embargo tiene la limitación de que se requiere la colaboración del paciente para la toma de muestra, lo que hace su uso poco factible en niños menores de 3 años (12,13).

En Venezuela, si bien las hojas de Balance de Alimentos para la década 1980-1990 reflejaban una baja disponibilidad de vitamina A (530 ER/persona/día para el año 1990, lo que representa un 78,7% de los requerimientos del venezolano), a partir de 1993 la disponibilidad mejoró notablemente al fortificar la harina de maíz con este nutriente, siendo para el año 1997 de 1371 ER/persona/día lo que representará un 171% de los requerimientos promedios de la población (14-16).

Poco se conoce sin embargo, sobre el estado de la vitamina A del venezolano, medido éste como reservas corporales de retinol. En los últimos años algunos grupos de investigación han aportado resultados de niveles plasmáticos de retinol en distintos grupos etarios de pequeñas poblaciones: Gerardi y col reportan una prevalencia de déficit de 78,8% en un grupo de niños de 2 a 12 años de dos comunidades de la Isla de Coche (17); Yépez y col en un estudio realizado en 86 niños en edad preescolar de una comunidad suburbana de Valencia reportan 10,6% de deficiencia y 35,3% de valores marginales para el año 1992 y 16,5% con valores marginales para el año 1993 (18,19); Solano y col. en dos estudios poblacionales realizados, uno en un grupo de 460 escolares y otro en 523 preescolares de una zona marginal de Valencia, en los años 1994 y 1995, respectivamente, reportan una prevalencia de deficiencia de vitamina A (<20 µg/dl) de 2% para escolares y 11% para preescolares y con niveles marginales (20-30 µg/dl) en 10,7% de los escolares y 21% de preescolares (20,21). Estos datos demuestran que aunque la prevalencia de deficiencia de vitamina A según los niveles séricos varía notablemente entre los grupos, está presente y es en algunos casos importante.

Con el objeto de hacer una aproximación más adecuada al diagnóstico de Vitamina A en grupos vulnerables, en este

estudio se evaluó la deficiencia de vitamina A por tres indicadores, en un grupo de niños menores de 15 años a riesgo de deficiencia por su bajo nivel socioeconómico.

## METODOLOGIA

**Población y muestra:** La muestra estudiada estuvo conformada por 590 niños aparentemente sanos de ambos sexos, en edades comprendidas entre 2 y 14 años, integrantes de una comunidad marginal de la ciudad de Valencia, sin enfermedades agudas y a riesgo de deficiencia de vitamina A por su precaria situación económica. Estos niños fueron captados de una Escuela Nacional y de un preescolar localizados en la misma comunidad, y fueron evaluados durante el período Marzo-Mayo de 1998.

Para el cálculo del tamaño de esta muestra se consideró la prevalencia de valores inadecuados de vitamina A en escolares y preescolares de la misma comunidad (12,7% en escolares y 33,5% en preescolares), y un nivel de confianza del 95%. La muestra seleccionada fue de 607 niños los cuales se escogieron aleatoriamente del total de la matrícula de la Escuela Nacional Bárbula y del Preescolar Bárbula (N = 1.832). Se explicó a los representantes en que consistía el estudio y de los 607 niños seleccionados, los representantes de 590 dieron consentimiento por escrito.

## MÉTODOS

A los niños seleccionados se les realizó una evaluación integral que incluyó: una evaluación socioeconómica; una historia clínica donde se registró fecha de nacimiento, el sexo, el peso, la talla, los antecedentes de enfermedades infecciosas y el consumo de suplementos vitamínicos; una evaluación antropométrica; una evaluación de la ingesta de calorías, proteínas, grasas y vitamina A y una evaluación del estado de vitamina A por dos indicadores que fueron niveles séricos de retinol y citología de impresión conjuntival.

El estrato socioeconómico se midió según el método de Graffar modificado para Venezuela por Méndez Castellano (22). La edad se estimó basándose en la fecha de nacimiento y fecha del examen, para el peso y la talla se utilizó una balanza con tallímetro marca HealthoMeter.

Se evaluó el estado nutricional antropométrico mediante el Índice de Masa Corporal utilizando como valores de referencia Frisancho (23) y los indicadores Peso/Talla y Talla/Edad, utilizando valores de referencias NCHS/WHO. Los puntos de cortes según OMS fueron: IMC en déficit menor o igual al percentil 10, normal entre Percentil 10 y 90, y exceso por encima del percentil 90. Para los indicadores Peso/Talla y Talla/Edad se consideró déficit por debajo de -2DS, riesgo entre -2DS y -1 DS; normal entre -1DS y 2 DS y exceso mayor de +2 DS (24).

Las mediciones de peso y talla fueron realizadas por personal debidamente entrenado y estandarizado según la metodología descrita por Gibson, R (25).

Se consultó a la madre la presencia de enfermedades infecciosas (diarrea, sarampión y enfermedades respiratorias del tracto inferior y superior), en los dos meses previos a la toma de muestra de sangre y a la evaluación antropométrica.

Para determinar el riesgo por consumo deficiente de Vitamina A, en los niños menores de 7 años, se utilizó una frecuencia de consumo dirigida específicamente a la evaluación de alimentos ricos en vitamina A, que fue estructurada y analizada según la metodología desarrollada por IVACG para este grupo etario, la cual permite medir el riesgo de deficiencia de vitamina A a nivel comunitario. La encuesta de frecuencia de consumo de alimentos se elaboró con base en los alimentos ricos en vitamina A de consumo usual de esta comunidad. Los alimentos seleccionados fueron clasificados según su contenido de vitamina A (Equivalentes de Retinol (ER) en una ración básica de alimento) en las categorías de bajo, moderado o alto, y se registró el tamaño de cada ración y su frecuencia de consumo. Se asignó un puntaje a cada alimento consumido que dependía de su contenido de vitamina A y se calculó el puntaje UPF (Usual Pattern of Food Consumption). El cálculo de este puntaje permite, según la metodología IVACG, clasificar el riesgo por consumo en alto (UPF < 120), moderado (UPF entre 120 y 210) y bajo (UPF > 210) (26).

Se estimó el consumo diario de calorías, proteínas, lípidos, carotenos y vitamina A total a través de tres recordatorios de 24 horas no consecutivos, utilizando los valores de la Tabla de Composición de Alimentos para Venezuela (27). Los recordatorios fueron realizados por nutricionistas entrenadas y estandarizadas, pertenecientes al Centro de Investigaciones en Nutrición. Se calculó el consumo promedio de los tres recordatorios para los distintos nutrientes y se compararon los valores promedio con las Recomendaciones de Energía y Nutrientes para la población venezolana (28), lo cual permitió determinar la adecuación al consumo de estos nutrientes.

Se registró el uso de suplementos de vitaminas y minerales clasificando los mismos en tres grupos: suplementos sin vitamina A, polivitamínicos que contenían vitamina A y suplementos de vitamina A. Esta información fue recogida de forma cualitativa (uso, tipo de suplemento y frecuencia) y no se incluyó en la estimación del consumo de vitamina A por los métodos cuantitativos ya mencionados.

Para determinar los niveles séricos de retinol se tomó una muestra de sangre (5 ml) del paciente en ayunas, en penumbras, y se colocó en un tubo sin anticoagulante, protegido de la luz solar para obtener la muestra de suero. Una vez en el laboratorio se separó el suero y este se guardó en un tubo ámbar a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su

análisis. Se determinó la concentración de retinol sérico utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), según el método desarrollado por el International Vitamin A Consultative Group (29). Se utilizó para ello un cromatógrafo líquido marca Hewlett-Packard modelo 1050 utilizando como fase estacionaria una columna de fase reversa (25 cm de largo x 4 mm de diámetro interno) (C18) tipo Spherisorb OD2, con un tamaño de poro de 80Å y un tamaño de partícula de 5mm, y como fase móvil Metanol:Agua en proporciones 95:5.

Para la Citología de Impresión Conjuntival se utilizó la metodología descrita en el «Manual de Entrenamiento para Determinación del Estado de Vitamina A por Impresión Citológica de la ICEPO» (30). Para el diagnóstico se consideró la presencia o ausencia de mucina y células caliciformes en la impresión conjuntival y las características del tejido epitelial, estableciéndose los siguientes criterios de diagnóstico: *Normal*: Extendido laminar continuo de pequeñas células epiteliales, con abundante células caliciformes y puntos de mucina; *Marginal*: Muy pocas células caliciformes o puntos de mucina y células epiteliales agrandadas que comienzan a perder continuidad dentro del extendido; *Anormal*: Ausencia de células caliciformes o puntos de mucina y un marcado agrandamiento de las células epiteliales que se presentan claramente separadas.

Se agrupó la población en tres categorías de edad: menores de 7 años; entre 7 y 10 años; e iguales o mayores a 11 años. Se calcularon los estadísticos descriptivos básicos para las distintas variables y se utilizó la prueba  $\chi^2$  para buscar asociación entre los distintos indicadores del estado de vitamina A y entre ellos y las variables sexo y edad. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann Whitney para comparar el consumo de vitamina A, la adecuación y los niveles séricos de retinol por grupos de edad. Se realizó un análisis de regresión múltiple tomando como variable dependiente los niveles séricos de retinol y como independientes las variables previamente mencionadas. Para el diagnóstico antropométrico se utilizó el programa Epi-Info versión 6.04 y para el análisis estadístico el paquete estadísticos SPSS versión 8.0.

## RESULTADOS

La muestra seleccionada estuvo conformada por 139 preescolares y 451 escolares cuya distribución por sexo y grupo de edad se presenta en la Tabla 1. El 91,6% de las familias de estos niños se encontraban en situación de pobreza (estratos IV y V) y de ellos el 20,4% en pobreza crítica (estrato V).

TABLE 1  
Distribucion del grupo estudiado por sexo y grupo de edad

Sexo	Grupo de edad			Total
	< 7 años	7-10,99 años	> 11 años	
Masculino	100 (34,1%)	144 (49,1%)	49 (16,7%)	293 (100%)
Femenino	86 (29,0%)	168 (56,6%)	43 (14,5%)	297 (100%)
Total	186 (31,5%)	312 (52,9%)	92 (15,6%)	590 (100%)

En cuanto al estado nutricional antropométrico se encontró que un 12,9% presentaban déficit nutricional según el Índice de Masa Corporal y 7,3% exceso, 6,4% presentaron talla baja y 27,6% riesgo de talla baja. Según el indicador peso para la talla 0,6% estaba en déficit (menor a -2DS) y 10,2% estaban a riesgo de desnutrición (entre -2DS y -1DS) sin detectarse ningún caso de desnutrición moderada o grave (por debajo de -3DS). No se encontró asociación significativa entre estos indicadores y el sexo. Sin embargo la prevalencia de desnutrición según el IMC fue significativamente más alta en los mayores de 11 años (23,9%) que en los menores de 11 años (10,8%).

Se encontró que el 17% de los niños habían tenido al

menos un episodio de diarrea en los dos meses previos al estudio, un 37% habían presentado enfermedades respiratorias del tracto superior y 28% del tracto inferior, pero no se reportaron casos de sarampión.

La ingesta energética osciló entre 517 y 3.998 kcal/día con una mediana de 1.587 kcal/día que representa una adecuación mediana de 87% de acuerdo a las recomendaciones por edad y sexo venezolanas (28). La ingesta proteica osciló entre 8 y 183 g/día con una ingesta mediana de 53 g/día lo que significa una adecuación mediana igual a 94%. La ingesta total de grasas presentó un rango entre 1,3 y 143 g/día con una mediana de 44 g/día, representando el 25,5% de las calorías totales, valor que se encuentra dentro del rango recomendado para menores de 16 años (25% a 30% de las calorías totales) (28).

El aporte dietético de retinol fue sumamente variable y osciló entre 44 y 10.813 ER con una mediana de 765 ER, lo que representó una adecuación mediana de 124%, sin embargo el 23% de los niños mostraron un consumo inferior al 80% de sus requerimientos. No se encontró asociación entre la adecuación al consumo por sexo pero sí por grupos de edad (Tabla 2).

TABLE 2  
Prevalencias de déficit según adecuación al consumo de VA, niveles séricos de retinol y citología de impresión conjuntival del grupo total y por grupos de sexo y edad

	Adecuacion al consumo de vitamina A		Retinol sérico			CIC	
	<80% RDA	≥80% RDA	<20µg/dl	20-30µg/dl	> 30µg/dl	Anormal	Normal
Sexo							
Varones	63 (23%)	211 (77%)	2 (0,7%)	70 (25%)	209 (74,4%)	27 (11,7%)	204 (88,3%)
Hembras	63(23%)	211(77%)	2 (0,7%)	75 (26%)	213 (73,4%)	24 (10,5%)	204 (89,5%)
	$\chi^2$ p:NS		$\chi^2$ p:NS			$\chi^2$ p:NS	
Edad							
< 7 años	9 (5,2%)	163 (94,8%)	1 (0,6%)	53 (30,1%)	122 (69,3%)	16 (10,5%)	137 (89,5%)
7 a 10,9 años	74(25,9%)	213(74,1%)	2 (0,7%)	81 (26,6%)	221 (72,7%)	24 (10,4%)	206 (89,6%)
≥ 11 años	43(47,8%)	47 (52,2%)	1(1,1%)	11(12,1%)	79 (86,8%)	11(14,5%)	65(85,5%)
	$\chi^2$ p: 0,000		$\chi^2$ p:NS			$\chi^2$ p:NS	
TOTAL	126 (23%)	422 (77%)	4 (0,7%)	145 (25,4%)	422 (73,9%)	51 (11,1%)	408 (88,9%)

Alrededor del 33% del aporte dietético de este nutriente fue suministrado como carotenoides mientras que un porcentaje importante del mismo (66%) provenía de la vitamina A preformada de alta biodisponibilidad. Los alimentos con el mayor aporte de esta vitamina A en la dieta fueron el hígado de pollo y res, el mango, la zanahoria, la guayaba, la lechosa, la leche y derivados, los huevos, la harina de maíz enriquecida y de otros cereales enriquecidos.

Se encontró un uso elevado de suplementos vitamínicos:

el 43% de los niños recibían algún tipo de suplemento, y de estos, el 70% recibían suplementos que contenían vitamina A. En el 95% de los casos este suplemento era suministrado diariamente.

Al evaluar el riesgo de los preescolares (< 7 años), por consumo deficiente de vitamina A según la metodología IVACG, se encontró que sólo 0,6% presentaban riesgo alto, 8,8% se encontraban en riesgo moderado y que el 90,6% se encontraban dentro de la categoría de riesgo leve.

En cuanto al estado de vitamina A del grupo (Tabla 2) según el indicador retinol sérico no se detectó ningún caso de déficit franco (niveles séricos menores a 10µg/dl) y solamente un 0,7% de la población presentó niveles séricos deficientes (<20 µg/dl), sin embargo un porcentaje importante del grupo (25,4%) mostró concentraciones séricas de retinol marginales (entre 20 µg/dl a 30 µg/dl). Mediante el indicador citología de impresión conjuntival se detectó 11,1% de deficiencia representados por 3,3% marginales y 7,8% anormales. No fue posible obtener la impresión conjuntival en el 12,7% (n=75) de los niños debido a que por ser de corta edad la colaboración no fue adecuada y del total de impresiones realizadas (n=515) en el 11% de las muestras no se pudo realizar diagnóstico por muestra insuficiente, por lo que el número de citologías diagnosticadas fue de 459.

No se encontró asociación significativa entre la CIC y los niveles plasmáticos de retinol. ( $\chi^2$ : 1,3; p = 0,52). Tampoco se encontró asociación significativa entre la adecuación al consumo y los diagnósticos realizados por CIC ( $\chi^2$ : 0,64; p = 0,80), ni los niveles séricos de retinol. ( $\chi^2$ : 3,03; p = 0,22).

En la Tabla 2 se presentan las prevalencias de déficit por sexo y por grupos de edad, los porcentajes de déficit fueron similares entre los sexos para los tres indicadores, sin encontrarse asociación entre los diagnósticos y el sexo. Si existió asociación significativa para la edad con la adecuación del consumo ( $\chi^2$ : 56,8 p<0,000) pero no para la Citología de impresión Conjuntival. Siendo el porcentaje de déficit mayor en los mayores de 11 años.

En la Tabla 3 se presentan los estadísticos descriptivos del consumo de vitamina A, la adecuación al consumo y los niveles de retinol sérico por grupos de edad y del grupo total. La adecuación del consumo de vitamina A disminuyó con la edad, siendo los niños mayores de 11 años los que presentaron la menor adecuación, sin embargo los niveles séricos se comportaron diferente, aumentando significativamente con la edad, reportándose el valor más alto en el grupo mayor de 11 años.

TABLA 3

Valores medios del consumo de vitamina A, adecuación al consumo y niveles de retinol sérico por grupos de edad

Edad	Consumo de vitamina A (ER)		Adecuación al consumo (%)		Retinol sérico (µg/dl)	
	X ± DS	Mediana	Mediana	X ± DS	Mediana	
< 7 años	805 ± 445	729 <sup>a</sup>	182% <sup>a</sup>	34,0 ± 7,98	32,8 <sup>a</sup>	
7 a 10,9 años	843 ± 490	764 <sup>a</sup>	109% <sup>b</sup>	36,8 ± 9,15	35,3 <sup>b</sup>	
≥ 11 años	1177 ± 1529	797 <sup>a</sup>	83% <sup>c</sup>	41,3 ± 11,61	39,9 <sup>c</sup>	
TOTAL	886 ± 767	765	124%	36,3 ± 9,34	35,1	

Mann Whitney letras diferentes indican medianas diferentes p<0.05

Al realizar el análisis de regresión múltiple por pasos fueron seleccionados la edad, el estado nutricional como Índice de Masa Corporal y el estrato socioeconómico como predictores de los niveles séricos de retinol (R = 0,265) excluyéndose del análisis el sexo, el consumo de calorías, proteínas, grasas y retinol, y la Citología de Impresión Conjuntival.

## DISCUSION

En la muestra seleccionada para este estudio, las prevalencias de desnutrición según el indicador peso/talla fueron muy bajas (<1%), no detectándose casos de desnutrición moderada ni severa, mientras que la talla baja se detectó en el 6,4% del grupo. Estos porcentajes están por debajo de las prevalencias nacionales reportándose para el año 1996 un porcentaje de déficit de 11,9% para menores de 15 años según el indicador peso/talla y un déficit de talla de 29,3% para menores de 7 años y 33,4% para el grupo de 7 a 14 años (31). Las prevalencias de déficit encontradas en este estudio según los indicadores peso/talla y talla/edad son bajas y permiten descartar a la desnutrición como un factor de riesgo para el déficit de vitamina A en el grupo estudiado (32).

El consumo de proteínas fue adecuado en el 70% de la muestra. El aporte promedio de los lípidos a las calorías totales (25,5%) también se ubicó dentro del rango esperado, aún cuando se encontraba cerca del límite inferior, si se toma en cuenta las recomendaciones venezolanas para menores de 16 años que sugiere que la energía en forma de grasa aporte entre 25 y 30% del total consumido (33).

Un 23% de los niños presentaban un consumo de vitamina A inferior al 80% de sus requerimientos, estas prevalencias de riesgo por consumo deficiente son similares (24,3%) a las reportadas por otros estudios realizados en comunidades de la misma región y de condiciones socioeconómicas similares (34).

Los porcentajes de déficit según los niveles séricos de retinol (0,7%) son más bajos que los reportados por Solano y col. (20,21) quienes encontraron para una comunidad de la misma región y de condiciones socioeconómicas similares, una prevalencia de deficiencia de vitamina A de 2% para escolares y 11% para preescolares, sin embargo las prevalencias de niveles marginales (20-30µg/dl) encontradas en el presente trabajo son más altas (25,4%) que las reportadas por Solano y col para ambas poblaciones (10,7% de los escolares y 21% de preescolares). Estas prevalencias sin embargo clasifican un mismo nivel de riesgo para la deficiencia de vitamina A como problema de salud pública, es decir "leve" (35).

El análisis de consumo según la metodología IVACG

también identifica el riesgo de deficiencia de vitamina A por consumo, en el grupo de menores de 7 años, como un problema leve. En general las prevalencias de déficit encontradas en este trabajo para vitamina A son más bajas que las reportadas para el resto de Latinoamérica (6,36).

Según Underwood, la pobreza no es una causa fundamental de la xeroftalmía, pero puede llevar a una alimentación inadecuada para atender las necesidades de vitamina A de los grupos vulnerables, particularmente en los niños en edad preescolar (4). En el grupo estudiado se pudo comprobar que a pesar de su alto índice de pobreza (92%), el consumo fue adecuado en un 77% de la muestra, el riesgo según la metodología IVACG fue leve y las prevalencias de déficit según los indicadores retinol sérico y CIC clasificaron a la población como de bajo riesgo de hipovitaminosis A.

El hecho de que los distintos indicadores mostraron distintas prevalencias de déficit e identificaron a distintos individuos como deficientes, es un hallazgo reportado también por otros investigadores. Gadowski y col y Makdani y col, encontraron, al correlacionar los diagnósticos de CIC con los niveles plasmáticos que los resultados por CIC no mostraban asociación clara con los niveles plasmáticos de retinol en grupos donde la deficiencia de vitamina A no era severa y concluyeron que la CIC no era un buen indicador para los estados de deficiencia marginal (37,38), sin embargo Reddy y col al comparar los métodos en 246 niños menores de 10 años encontró que los niveles séricos de retinol eran significativamente más bajos en el grupo que presentaba CIC anormal y que este grupo respondían al tratamiento con vitamina A mostrando una CIC normal después del tratamiento (39). Esto parece indicar que a nivel individual los diferentes indicadores identifican distintos estadios de la deficiencia de vitamina A. Sin embargo a nivel poblacional parecen identificar un mismo nivel de riesgo.

El sexo no se identificó como un factor de riesgo adicional ya que las prevalencias de déficit por los distintos indicadores fueron similares en varones y hembras. De acuerdo con los resultados obtenidos por otros investigadores (4), la ausencia de diferencias entre sexos confirma la falta de un riesgo fisiológico determinado por género.

El comportamiento de los indicadores por grupos de edad fue contradictorio. Si bien el consumo de vitamina A no fue diferente entre los tres grupos de edad, al corregir por los requerimientos según edad y sexo, se encontró que el riesgo por consumo deficiente aumentaba con la edad, y que los niños mayores de 11 años presentaban la más baja adecuación (83%) y por ende el mayor riesgo. Esta tendencia se encontró también para la CIC, siendo la prevalencia de déficit más alta en estos mismos niños. Sin embargo, los niveles séricos de retinol no siguieron el mismo comportamiento, siendo

significativamente más altos en el grupo de mayor de 11 años (35,1ug/dl) lo que coincide con reportes de que la edad, el sexo y la etnia son factores que pueden afectar la concentración plasmática de retinol independientemente de las reservas hepáticas de vitamina A. (9,40). De hecho, al realizar el análisis de regresión múltiple para la vitamina A sérica, la edad fue seleccionada como variable predictora, no ocurriendo lo mismo para el sexo ni los otros indicadores del estado de vitamina A (consumo de vitamina A y CIC).

Se puede asumir que aquellos niños que tienen al menos dos indicadores del estado de vitamina A normales tienen una mayor probabilidad de presentar un estado de vitamina A adecuado. Al seleccionar todos aquellos niños que presentan un adecuado consumo de vitamina A y una citología de impresión conjuntival normal (n=292) y realizar la distribución percentilar de los niveles séricos de vitamina A en esta muestra por grupos de edad, se encontró que los niveles séricos del percentil 10 eran similares entre los menores de 7 años (25,3 ug/dl) y entre 7 y 11 años (25,1 ug/dl) pero que estos eran más altos en los niños mayores de 11 años (27,2 ug/dl). Aún tomando en cuenta el tamaño muestral como una limitación, estos resultados pudieran sugerir la necesidad de ajustar los puntos de corte para el diagnóstico de "marginal" según la edad.

## CONCLUSIONES

Todos los indicadores utilizados en este trabajo diagnosticaron un mismo nivel de riesgo al problema de déficit de vitamina A en esta población, es decir, "leve". Sin embargo no hubo correlación entre los resultados obtenidos por los niveles séricos de retinol y los otros dos indicadores (CIC y consumo). Los diagnósticos por los distintos indicadores de acuerdo a la edad fueron paradójicos, pero parecían indicar que existe una mayor vulnerabilidad a déficit de vitamina A en los mayores de 11 años. Aún cuando no hubo deficiencias francas de vitamina A (niveles séricos <10 µg/dl), no se puede descartar el riesgo de hipovitaminosis A en este grupo ya que un 25% presentó niveles séricos marginales y un 11% mostró alteraciones en sus tejidos epiteliales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores quisieran agradecer a los alumnos y al personal profesoral de la Escuela Nacional de Bárbula y del Preescolar Bárbula.

A la licenciada Zuleida Fajardo por colaborar en el procesamiento de los datos de consumo.

## REFERENCIAS

1. Beaton G, Martorell R, Aronson KA, Edmoston B, McCabe G, Ross C, Harvey B. La suplementación con vitamina A y la morbilidad y mortalidad infantil en los países en desarrollo. *Bol Oficina Sanit Panam* 1994;117(6):506-517.
2. Sommer A. La carencia de vitamina A y sus consecuencias: Guía práctica para la detección y el tratamiento. Tercera edición. OMS, Ginebra 1995.
3. Underwood B. Vitamin A deficiency as a public health problem & assessment methods. *Arch Latinoamer Nutr* 1992;42 (3S):117-122.
4. Underwood B. Hipovitaminosis A: epidemiología de un problema de salud pública y estrategias para su prevención y control. *Bol Oficina Sanit Panam* 1994;117(6):496-505.
5. Underwood B, Arthur P. The contribution of vitamin A to public health. *FASEB J* 1996; 10:1040-1048.
6. Mora JO. Situación actual de la deficiencia de vitamina A en América Latina y el Caribe. *Arch Latinoamer Nutr* 1992; 42(3S):108-116.
7. Mora JO y Dary O. Deficiencia de vitamina A y acciones para su prevención y control en América Latina y el Caribe. *Bol Oficina Sanit Panam* 1994;117(6): 519-527.
8. Underwood B. Methods for assessment of vitamin A status. *J Nutr* 1990;120: 1459-1463.
9. Gibson R. Assessment of the status of vitamins A, D and E. En: *Principles of Nutritional Assessment*. Oxford University Press. 1990.
10. Nelson JD. Impression Cytology. *Cornea* 1988;7(1):71-81.
11. Rahman MM, Mahalanabis D, Wahed MA, Islam M, Habte D, Khaled M, Alvarez J. Conjuntival impression cytology fails to detect subclinical vitamin A deficiency in young children. *J Nutr* 1995;125:1869-1874.
12. Natadisastra G, Wittpenn JR, Muhilal, West K, Mele L, Sommer A. Impression cytology: a practical index of vitamin A status. *Am J Clin Nutr* 1988;48:695-701.
13. Kjolhede CL, Gadomski AM, Wittpenn J, Bulux J, Ross AR, Solomons NW, Brown KH, Forman MR. Conjuntival impression cytology: feasibility of a field trial to detect subclinical vitamin A deficiency. *Am J Clin Nutr* 1989;49:490-4.
14. Jaffe W, Entrena A. La situación de la vitamina A en Venezuela. *An Venez Nutr* 1993;6:19-24.
15. Instituto Nacional de Nutrición-Universidad de los Andes. Hojas de Balance de Alimentos 1989-1994. Venezuela.
16. Instituto Nacional de Nutrición-Universidad de los Andes. Hojas de Balance de Alimentos 1996-1997. Venezuela. 1998.
17. Gerardi A, Rivera CJ, Rivera CM, Infante B, De la Torre BM, Lynch M, Di Prisco M, Hagel I, Sanabria I, Palenque M. Determinación de retinol sérico en niños de 2-12 años de ambos sexos de la población de Guanina, Isla de Coche, Estado Nueva Esparta. Octubre 1994. *Acta Científica Venezolana* 1995; 46 (S):139.
18. Yépez CE, Ludovic I, Naranjo RS, Solano Rodríguez L. Niveles séricos de Vitaminas A, C, y E en una población preescolar del Municipio Los Guayos, Edo. Carabobo. *Arch Latinoamer Nutr* 1994; 44(3S):42-43.
19. Yépez CE, Naranjo RS, Márquez M, Sermer S, Portillo Z, Peña E, Solano L. Niveles séricos y consumo de vitamina A en preescolares de un área suburbana del estado Carabobo. *Arch Latinoamer Nutr* 1994; 44(3S):88.
20. Solano RL., Peña E., Portillo Z., Yépez CE., Sutil R. Del Real S., Márquez M., Díaz N., Rodríguez L. Vitamin A status in three age groups of a Venezuelan population. XVII IVACG Meeting. 18-22 Marzo. Guatemala. 1996:22.
21. Solano L, Meertens L, Peña E, Arguello F. Deficiencia de micronutrientes. Situación actual. *An Venez Nutr* 1998; 11(1): 48-54
22. Méndez Castellano H, Méndez MC. Sociedad y Estratificación. Método Graffar-Méndez Castellano. Fundacredesa. 1994.
23. Frisancho R. Anthropometric standard for the assessment of growth and nutritional status. Ann Arbor. The University of Michigan Press. 1990.
24. WHO. Physical Status: The use and Interpretation of anthropometry. Technical Report Series 854. Geneva. 1995.
25. Gibson R. Nutritional Assessment. A Laboratory Manual. Oxford University Press. 1993.
26. International Vitamin A Consultative Group (IVACG). Guidelines for the development of a simplified dietary assessment to identify groups at risk for inadequate intake of Vitamin A. A Report to the International Vitamin A Consultative Group. 1989.
27. Instituto Nacional de Nutrición. Tabla de composición de alimentos para uso práctico. Serie Cuadernos Azules. N° 52. Caracas. Venezuela. Revisión 1999.
28. Fundación Cavendes/Instituto Nacional de Nutrición. Valores de referencia de energía y nutrientes para la población venezolana. Versión preliminar. Caracas: Fundación Cavendes. 2000.
29. International Vitamin A Consultative Group. (IVACG). Biochemical Methodology for the assessment of vitamin A status. IVACG Editor. 1982.
30. Wittpenn JR, West KP, Keenum D, Farazdaghi M, Humphrey J, Howard GR, Sommer A, Natadisastra G, Santos E, Gadomski A, Kjolhede C. ICEPO Training manual: assessment of vitamin A status by impression cytology. ICEPO, Dana Center for Preventive Ophthalmology, The Wilmer Institute and School of Hygiene and Public Health of Johns Hopkins University, Baltimore, MD, 1988.
31. López de Blanco M, Landaeta M, Sifontes Y, Evans R, Machin T. Situación alimentaria y nutricional de Venezuela. Serie de Fascículos Nutrición Base del Desarrollo. Ediciones Cavendes, 1996.
32. Mc Laren D, Frigg M. Assessment of vitamin A status.. En: *Sight and Life Manual on Vitamin A Deficiency Disorders (VADD)*. Chapter 4. First Edition. Task Forces Sight and Life. 1997:31-42.
33. Instituto Nacional de Nutrición/Fundación Cavendes. Necesidades de energía y nutrientes. Recomendaciones para la población venezolana. Publicación N° 48, Serie Cuadernos Azules. Caracas: Imprenta INN, 1993.
34. Portillo Z. Riesgo de deficiencia de macronutrientes y micronutrientes por determinación del consumo en

- diagnóstico de hambre oculta en preescolares de una zona marginal. Valencia. Carabobo. Tesis para optar al título de Maestría en Nutrición. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. 1999.
35. WHO. Indicators for Assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluation intervention programmes. WHO, Geneva. 1996.
  36. Dary O. Avances en el proceso de fortificación de azúcar con vitamina A en Centroamérica. Bol Oficina Sanit Panam 1994; 117(6):529-536.
  37. Makdani D, Sowel A, Nelson D, Apgar J, Gunter E, Hegar A, Potts W, Rao D, Wilcox A, Smith C. Comparison of methods of assessing vitamin A status in children. J Am Coll Nutr 1996;15(5):439-449.
  38. Gadomski AM, Kjolhede CL, Wittpenn J, Bulux J, Rosas A, Forman M. Conjuntival impresión cytology (CIC) to detect subclinical vitamin A deficiency: comparison of CIC with biochemical assessments. Am J Clin Nutr 1989;49:495-500.
  39. Reddy V, Rao V, Arunjyoti, Reddy M. Conjuntival impresión cytology for assessment of vitamin A status. Am J Clin Nutr 1989;50:814-817.
  40. Pilch SM (ed). Assessment of the vitamin A nutritional status of the US population based on data collected in the Health and Nutritional Examination Surveys. Life Science Research Office. Federation of American Biology Societies, Bethesda, Maryland. 1985.

Recibido: 19-12-2000

Aceptado: 20-11-2001

## Efectos de la diarrea secretora y osmótica sobre la función y morfología del intestino en ratas

*Margarita de Lima de Mon, Anna M. Cioccia, Eduardo González y Patricio Hevia*

Escuela de Medicina «Luis Razetti», Universidad Central de Venezuela (UCV). Laboratorio de Nutrición  
Universidad Simón Bolívar. Venezuela

**RESUMEN.** Para comparar la morfología intestinal con la función absorbiva se produjo diarrea en ratas agregando laxantes en la dieta. El estudio de 14 días, incluyó dos grupos de ratas con diarrea (osmótica o secretora), dos grupos sin diarrea pero con desnutrición equivalente a la observada en las ratas con diarrea (desnutridas sin diarrea) y un grupo bien nutrido (control). La inclusión de los laxantes (lactosa o bisoxatin acetato) en la dieta, produjo una reducción de la ingesta, diarrea y desnutrición. Además, disminuyó la digestibilidad de la proteína y la grasa dietarias. Esta disminución en la función absorbiva fue proporcional a la severidad de la diarrea y más severa en las ratas con diarrea secretora. En las ratas desnutridas sin diarrea, la desnutrición no afectó la capacidad absorbiva. En las ratas con diarrea osmótica o secretora se produjo una hipertrofia del intestino delgado cuya magnitud fue proporcional a la severidad de la diarrea e independiente de su etiología. En los intestinos de las ratas con ambos tipos de diarrea hubo evidencias de inflamación, un mayor número de figuras mitóticas y no se observó el aplanamiento de las vellosidades observado en las ratas desnutridas sin diarrea. En la diarrea osmótica, se detectó además zonas de rompimiento de la chapa estriada y aumento de células caliciformes, indicando un mayor deterioro de la mucosa. Como estas ratas absorbieron más proteína y grasa, se concluyó que los cambios morfológicos no fueron predictivos de la función absorbiva intestinal. Este estudio mostró además que la diarrea tuvo un efecto trófico sobre el intestino que no se vio en la desnutrición sin diarrea.  
**Palabras clave:** Diarrea, osmótica, secretora, ratas, morfología intestinal, morfometría, función.

**SUMMARY.** Effect of osmotic or secretory diarrhea on rat intestinal function and morphology. In order to compare intestinal morphology and function, diarrhea was produced in rats using laxatives in the diet. The 14 day study included two groups of rats with diarrhea (osmotic or secretory), two groups without diarrhea but with a degree of malnutrition which was similar to that seen in the rats with diarrhea (malnourished without diarrhea) and a well-nourished group (control). The inclusion of laxatives (lactose or bisoxatin acetate) cause a reduction in food intake, diarrhea and malnutrition. It also caused a reduction in dietary protein and fat digestibility which was proportional to the severity of diarrhea and more pronounced in secretory diarrhea. In the malnourished rats without diarrhea, malnutrition did not affect their absorptive function. Both in the rats with secretory and osmotic diarrhea an intestinal hypertrophy was observed. This hypertrophy was proportional to the severity of diarrhea and independent of its aetiology. In the intestines of the rats with both types of diarrhea there was inflammation, a greater number of mitotic figures but the flattening of the villi seen in the malnourished rats without diarrhea was not seen. In osmotic diarrhea there was, in addition, a patchy damage of the surface of the jejunal mucosa and an increment in the number of goblet cells, indicating a more severe intestinal deterioration. Since despite this greater deterioration, these rats absorbed more protein and fat we concluded that the alterations in intestinal morphology seen in this study was not predictive of intestinal function. The study also showed that diarrhea had a trophic effect on the intestine which did not occur in malnourished rats without diarrhea.

**Key words:** Diarrhea, osmotic, secretory, rats, intestinal morphology, morphometry,

### INTRODUCCION

La diarrea, un problema de salud pública debido a la alta morbilidad y mortalidad (1-4), está vinculada estrechamente a la nutrición. Así, la evidencia existente indica que la diarrea es la principal causa de la desnutrición infantil (5) y a su vez, la desnutrición predispone a episodios más prolongados de diarrea, que son justamente los que están asociados con una mayor mortalidad (6). De acuerdo con esto, las estadísticas disponibles indican que al menos la mitad de los casos de mortalidad por diarrea, ocurren en niños desnutridos (1).

La desnutrición asociada a la diarrea se produce por una serie de factores, entre los que destaca en primer lugar la anorexia propia del que tiene diarrea (7). Sin embargo, hay otros que también contribuyen, como es la disminución de la capacidad absorbiva que afecta a todos los nutrientes pero que incide principalmente en la absorción de las proteínas (7) y algunos micronutrientes (8). Los factores responsables de esta reducción, son un aumento en la velocidad de tránsito intestinal, que reduce el tiempo de contacto entre los nutrientes y sus sitios de absorción en el intestino y además cambios estructurales de la mucosa intestinal que reducen

su capacidad absorbente. En la práctica, durante la diarrea estos dos factores, que afectan la función intestinal, actúan al mismo tiempo y es difícil decidir cual de los dos es más importante. Esto se debe a que la diarrea produce desnutrición y la desnutrición se afecta la morfología del intestino ya que este es uno de los órganos que tiene una de las más altas tasas de recambio en el organismo (9). Así, es difícil saber cuales son los cambios morfológicos asignables a la diarrea y cuales a la desnutrición.

Dentro de este marco de referencia, el objetivo de este estudio fue comparar la absorción de proteína y grasa como indicadores de la función intestinal con los cambios morfométricos y morfológicos del intestino, producidos por dos promotores de diarrea en ratas. Vale la pena agregar aquí que de acuerdo a los expertos (10) la digestibilidad proteica medida en ratas es la mejor forma de predecir la digestibilidad proteica en humanos y que la digestibilidad de la grasa medida en ratas y humanos también son semejantes (11).

Los agentes utilizados para producir la diarrea fueron la lactosa (7) y el bisoxatin acetato (7). El primero produce una diarrea de tipo osmótico mientras que el segundo produce una diarrea secretora (7). La lactosa ya ha sido usada para producir una diarrea experimental en ratas (8,12) y el bisoxatin acetato es el compuesto activo del laxante comercial conocido como Regoxal que distribuyen en Venezuela los Laboratorios Vargas.

En estudios preliminares, se observó que estos dos laxantes producen, además de diarrea, una reducción voluntaria importante del consumo de alimento. Esto hace que en estos animales se produzca diarrea y desnutrición. Por esta razón, en el experimento que se reporta aquí, se incluyeron, además de las ratas que recibieron los laxantes, grupos de ratas a las que se les ofreció la dieta sin laxante, pero al mismo nivel de consumo registrado en los grupos con laxante. Esta restricción del consumo, introducida aquí como parte del protocolo experimental, produjo desnutrición pero no diarrea. Así, en este experimento se pudo comparar la función y morfología intestinal en animales con el mismo grado de desnutrición pero con y sin diarrea. Este tipo de manejo experimental se pueden hacer sólo con modelos animales y fueron los que motivaron la búsqueda de estos modelos no infecciosos de diarrea.

## MATERIALES Y METODOS

**Diseño experimental:** Para este estudio se utilizaron 35 ratas *Sprague-Dawley* machos con un peso inicial de aproximadamente 60g. Se sometieron previamente a un período de acondicionamiento de dos días con dieta control (Tabla 1), la cual cubre los requerimientos de la rata en crecimiento (13). Luego, las ratas fueron distribuidas al azar en cinco grupos de siete ratas cada uno. El grupo 1, (Control)

consumió ad libitum la dieta definida como control en la Tabla 1. Los grupos 2 y 3 fueron los grupos con diarrea. Al grupo 2 (Diarrea Secretora) se le suministró una dieta que contenía 3.84% de Bisoxatin Acetato agregado a expensas del almidón. El grupo 3 (Diarrea Osmótica) recibió una dieta en la que la Lactosa reemplazó al 60% del almidón (Tabla 1). Los dos grupos con diarrea consumieron las dietas asignadas ad libitum.

TABLA 1  
Composición de las dietas control y con laxantes (Bisoxatin Acetato y Lactosa) ofrecidas a las ratas durante el experimento

Ingrediente (%)	Dieta		
	Control	Con Laxante Bisoxatin acetato	Lactosa
Caseína	16.2	16.2	16.2
Aceite de maíz	5.0	5.0	5.0
Minerales AIN-76	3.5	3.5	3.5
Vitaminas AIN-76	1.0	1.0	1.0
Bitartrato de colina	0.2	0.2	0.2
Metionina	0.3	0.3	0.3
Almidón de maíz	73.8	70.0	29.8
Laxante	0	3.8	44.0
Total	100	100	100

Como en experimentos preliminares, se observó que las ratas a las cuales se les ofrecieron dietas, con lactosa o con Bisoxatin Acetato, presentaban diarrea, anorexia y desnutrición, en este experimento se incluyeron grupos de ratas que recibieron la dieta control, sin laxantes, pero restringiendo su consumo al nivel medido en las ratas que recibieron los laxantes. Así, al grupo 4 se le ofreció diariamente una cantidad de dieta control similar a la que habían consumido las asignadas a la dieta que contenía bisoxatin acetato el día anterior. Asimismo, el grupo 5 recibió dieta control al nivel medido en las ratas que consumían la dieta con lactosa. Así, en estos grupos se pudo reproducir el bajo consumo y la desnutrición observada en las ratas con diarrea pero sin producirles diarrea. Resumiendo, este experimento incluyó 5 grupos de ratas de los cuales los tres primeros recibieron las dietas asignadas (Dieta control, dieta con Bisoxatin Acetato y dieta con Lactosa) ad libitum y dos grupos adicionales a los que se les restringió la oferta de alimento, para que consumieran la misma cantidad de dieta medida en los grupos con bisoxatin acetato o lactosa. El consumo de agua en todos los animales fue ad libitum.

Las ratas se alimentaron con las dietas asignadas por un período de 14 días. Durante este período de tiempo se llevó un control de la ingesta de alimento y peso corporal para determinar consumo de alimento, eficiencia y crecimiento.

Durante los días 11-13 del período experimental se hicieron colecciones de heces sobre mallas de acero inoxidable (8) para determinar la absorción de la dieta, del nitrógeno y de la grasa.

Al finalizar el experimento se sacrificaron la totalidad de los animales, se disecaron los intestinos, se midieron y anotaron las observaciones macroscópicas y se procesaron para su observación microscópica utilizando la técnica de inclusión en parafina y coloración de Hematoxilina-Eosina.

**Determinaciones químicas en dietas y heces:** Se determinó el contenido de agua, secando las muestras hasta peso constante en una estufa a 105°C. El contenido de nitrógeno se determinó por el método colorimétrico de Hevia & Cioccia, 1988 (14) y el de grasa por el método modificado de Blight & Dyer, 1959 (15).

**Determinación de la absorción aparente de la dieta, nitrógeno y grasa:** La absorción aparente de la dieta, nitrógeno y grasa se obtuvo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Absorción aparente (\%)} = \frac{\text{Consumo} - \text{Pérdida en heces}}{\text{Consumo}} \times 100$$

**Procesamiento de los tejidos para el análisis microscópico:** El intestino delgado fue removido desde el píloro hasta la válvula ileocecal, se pesó e inmediatamente se midió y se tomó una sección de 2 cm en la sección del yeyuno. El intestino grueso fue igualmente removido desde el ciego hasta la porción terminal del colon descendente en su unión con el recto y se tomó una sección de 2 centímetros a nivel del colon transversal. Tanto las muestras de intestino delgado como de intestino grueso se fijaron en formol (90%) para ser procesadas para microscopía de luz. Las muestras de 2 cm de intestino delgado e intestino grueso de cada rata, se embebieron en parafina utilizando el Autotechnicon y de cada una se prepararon 18 cortes histológicos que luego se colorearon con Hematoxilina-eosina.

**Evaluación histológica y estudios morfométricos:** En cada uno de los cortes histológicos bajo el microscopio, se inspeccionó el aspecto de la mucosa y de las células del epitelio de revestimiento, además se realizaron mediciones morfométricas en las vellosidades y criptas. Para estas mediciones, se seleccionaron 10 campos en cada una de las preparaciones histológicas y en estos, se midió el grosor de la pared, la altura de las vellosidades, la profundidad de las criptas, y se contaron las figuras mitóticas y células caliciformes en la región de las criptas. Estas mediciones se realizaron al azar usando códigos que se identificaron con los grupos a los que pertenecían las muestras sólo una vez terminada la inspección total.

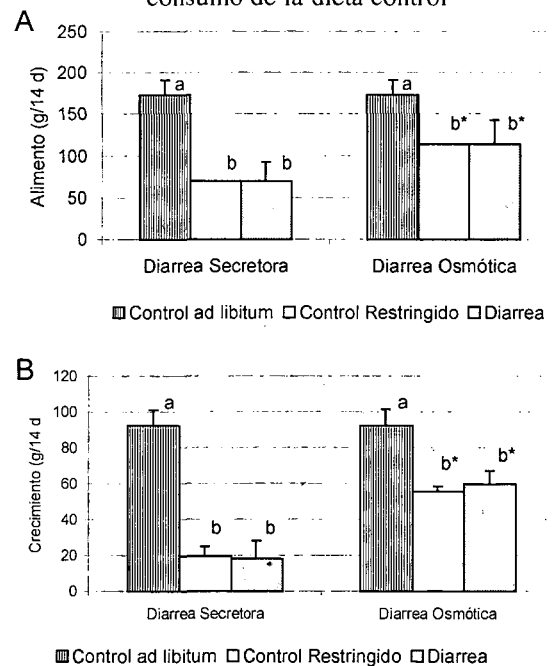
**Análisis estadístico:** Los resultados obtenidos se analizaron usando análisis de Varianza de Una Vía (16). Luego, las medias de cada grupo se compararon usando como prueba a posteriori los Rangos Múltiples de Duncan (17). En ambas pruebas, el nivel de significancia se fijó en un 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Diarrea, crecimiento y consumo.** La Figura 1 muestra que tanto la diarrea osmótica como la secretora estuvo asociada con una reducción del consumo de alimento, lo cual coincide con la disminución del consumo observada en niños con diarreas de diferentes etiologías (7,18,19). Esta reducción fue del 59.7% en el caso de la diarrea secretora y de 34.1% en el caso de la diarrea osmótica.

FIGURA 1

Consumo de alimento (A) y crecimiento (B) de ratas sin diarrea que recibieron la dieta control ad libitum, de ratas con diarrea secretora u osmótica producida con laxantes (1) y de ratas sin diarrea a las que se les restringió (2) el consumo de la dieta control



Las barras muestran la media  $\pm$  la desviación típica de 7 ratas.

1. La diarrea secretora fue producida con 3.8 % de bisoxatin acetato en la dieta y la diarrea osmótica fue inducida con un 44 % de lactosa en la dieta.
2. En ambos paneles, los controles restringidos consumieron la misma cantidad de dieta sin laxante que las medidas en las ratas con diarrea mientras que las controles ad libitum tuvieron libre acceso a esta misma dieta.

a-b. En cada variable (consumo o crecimiento), barras con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ )

\* Diferencia significativa entre tratamientos

Al inicio del experimento, ambos laxantes produjeron reducciones semejantes del consumo que se detectaron de inmediato. Sin embargo, las ratas que consumían lactosa, de acuerdo con observaciones anteriores (8) con el transcurso del tiempo, se adaptaron parcialmente al consumo de este carbohidrato y aumentaron su ingesta. En contraste, las ratas expuestas al bisoxatin acetato no mostraron este comportamiento y la reducción de consumo, detectada al inicio, se mantuvo constante durante todo el experimento.

La Figura 1 muestra además que los dos grupos de ratas con diarrea crecieron menos. Sin embargo, el retardo en el crecimiento en las ratas con diarrea secretora fue mayor que el observado en las ratas con diarrea osmótica, pero en ambos casos la desnutrición producida por la diarrea fue evidente. Estos resultados también concuerdan con los efectos de la diarrea sobre el estado nutricional en niños (7).

Finalmente, la Figura 1 señala que la restricción del consumo produjo reducciones del crecimiento similares a las observadas en las ratas con diarrea. Lo cual, permitió disponer de ratas con y sin diarrea con los mismos niveles de desnutrición. Estos resultados también indican que en este caso, tal como se ha sugerido en niños (7), los efectos negativos de la diarrea sobre la nutrición, están asociados principalmente con la anorexia que produce.

**Laxantes y masa fecal.** La Figura 2 muestra el efecto que tuvieron los laxantes utilizados para producir diarrea, secretora u osmótica, sobre la masa fecal. Se observa que con ambos laxantes, la producción de heces aumentó con respecto a las ratas que consumieron la dieta control. Este aumento se detectó tanto en las heces húmedas como en las heces secas, indicando que la diarrea no sólo produce un aumento en el contenido de agua sino también en el contenido de sólidos de las heces.

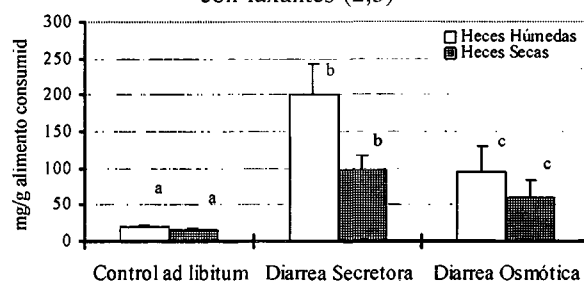
La idea de expresar la masa fecal en función del alimento consumido, la motivó el hecho de que la producción de heces depende de la cantidad de alimento consumido. Así, la excreción fecal de las ratas que recibieron la dieta control ad libitum, o restringida a los niveles de la diarrea secretora y osmótica, sin corregir por la cantidad de alimento consumido, fue de 0.9, 0.28 y 0.56 g/3d respectivamente. Sin embargo, estas diferencias se deben exclusivamente a las diferencias de consumo ya que después de corregidas, estos mismos valores fueron muy similares y alcanzaron 19.9, 18.8 y 20.2 mg de heces húmedas por gramo de alimento consumido. Esto, justifica la corrección utilizada aquí, para poder comparar la excreción fecal en animales con consumos de alimento tan diferentes como los mostrados en la Figura 1.

Algo que destaca en la Figura 2, es que la masa fecal de las ratas con diarrea secretora fue mayor que la de las ratas con diarrea osmótica. Esto, resulta de la adaptación de las ratas al consumo de lactosa y no al consumo de bisoxatin

acetato. La adaptación de las ratas al consumo de lactosa, ya se ha reportado (8) y resulta en una mejora progresiva en el consumo y crecimiento y en una disminución en la severidad de la diarrea. Esta adaptación depende del tiempo de exposición a la lactosa y se expresó aquí, debido a que, con el fin de dar mayor oportunidad a que estos laxantes produjeran cambios en la estructura del intestino, el experimento se prolongó por 14 días. Es posible que si las variables recién discutidas se hubieran medido durante los primeros días del experimento, el efecto de los dos laxantes hubiera sido similar en magnitud.

FIGURA 2

Masa fecal (1) de ratas controles y con diarrea producida con laxantes (2,3)



1. La masa fecal húmeda se refiere a la suma del peso de las heces diarias recolectadas durante los días 11-13 del experimento.
2. La masa fecal seca se refiere al peso de las heces luego de secadas a 105 grados C en sus rejillas de recolección. En ambos casos, el peso de las heces se expresó en función del alimento consumido para uniformar los resultados obtenidos.
3. La diarrea secretora fue producida con 3.8 % de bisoxatin acetato en la dieta y la diarrea osmótica fue inducida con un 44 % de lactosa en la dieta.
4. No se incluyeron las masas fecales de los controles cuyo consumo se restringió ya que su excreción fecal corregida por el consumo de alimento fue idéntico al observado en las ratas que consumieron la dieta control ad libitum.

**Función intestinal.** La principal función del intestino es permitir la absorción de los nutrientes dietarios. Con el fin de evaluar esta función, en este estudio se determinó la absorción aparente de la dieta, de la grasa y del nitrógeno consumidos por las ratas a las que se les ofreció la dieta control ad libitum o en forma restringida y en las ratas a las que se les indujo diarrea secretora o diarrea osmótica. Los resultados de estas determinaciones se muestran en la Tabla 2 en la que de acuerdo con la discusión anterior, las ratas que consumieron la dieta control ad libitum son ratas bien nutridas, las ratas a las que se les restringió el consumo de esta misma dieta, son ratas desnutridas sin diarrea, mientras que las ratas que recibieron las dietas con laxantes tenían, además de desnutrición, diarrea.

TABLA 2  
Absorción Aparente de la dieta, la grasa y el nitrógeno en ratas que consumieron la dieta control ad libitum y restringida y en ratas con diarrea producida con laxantes

Absorción aparente (%)	Consumo ad libitum	Dieta Control		Dieta con Laxantes	
		Consumo restringido según DS (1)	Consumo restringido según DO (2)	Diarrea secretora DS (3)	Diarrea osmótica DO (4)
Dieta	98.5±0.21a	98.1±1.24 a	98.3±0.39 a	88.2±4.44b	92.5±3.5 a
Grasa	96.6±0.64 a	95.2±2.23 a	96.3±1.30 a	84.6±7.84 b	86.7±6.56 b
Nitrógeno	97.8±0.47 a	97.3±2.25 a	97.5±0.77 a	83.3±6.59c	88.3±5.86 b

La Tabla muestra la media ± la desviación típica de 7 ratas (a-c). Medias con letras diferentes son diferentes ( $P < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de los rangos múltiples de Duncan.

1. A estas ratas se les ofreció la misma cantidad de alimento que consumieron las ratas con diarrea secretora.
2. Recibieron la misma cantidad de alimento que las ratas con diarrea osmótica.
3. La diarrea secretora se produjo incorporando bisoxatin acetato al 3.8% en la dieta a expensas del almidón.
4. La diarrea osmótica se produjo reemplazando el 44% del almidón dietario por lactosa.

La Tabla 2 señala que la desnutrición sin diarrea no tuvo ningún efecto sobre la digestibilidad de la dieta, la grasa dietaria o el nitrógeno dietario. Así, a pesar de que el crecimiento de las ratas asignadas a los grupos restringidos fue sustancialmente menor que el de las ratas que consumieron la misma dieta ad libitum, la función intestinal determinada en la forma en que se la midió aquí, no se afectó. Estos resultados están de acuerdo con observaciones anteriores (20) que indican que desnutriciones calórico-proteicas de una duración similar a la observada en este experimento, no afectan la capacidad del intestino de absorber los macronutrientes dietarios.

En contraste con lo observado en las ratas desnutridas sin diarrea, la desnutrición con diarrea sí afectó la función intestinal. Así, las ratas con diarrea secretora mostraron una menor capacidad de absorber la dieta en su totalidad, la grasa y el nitrógeno dietario. En el caso de la diarrea osmótica, aun cuando, no se afectó la capacidad de absorber la dieta como tal, sí se redujo la capacidad de absorber componentes específicos presentes en ella, como fueron la grasa y el nitrógeno. Como los niveles de desnutrición detectados en las ratas con diarrea secretora u osmótica fueron idénticas a las impuestas aquí, a sus respectivos grupos restringidos, se puede concluir que los efectos sobre la función intestinal observados en las ratas con diarrea osmótica o secretora, estuvieron asociados con la diarrea y no con la desnutrición que esta les produjo.

Adicionalmente a estas observaciones, los datos de la Tabla 2 señalan que la diarrea secretora tuvo un efecto más negativo sobre la digestibilidad de la dieta, la grasa y el nitrógeno o en general sobre la función intestinal, que la diarrea osmótica. Estos resultados no indican necesariamente que la naturaleza de la diarrea tenga un efecto específico sobre la función intestinal ya que en estudios anteriores tanto en niños con diarreas de diferentes etiologías (19) como en

ratas (7), la capacidad de absorber los macronutrientes, es inversamente proporcional a la severidad de la diarrea. De acuerdo con esas observaciones, en el presente estudio, coincidió que la diarrea más severa estuvo asociada con las absorciones más bajas y esto se observó en las ratas con diarrea secretora.

**Morfometría intestinal.** La Tabla 3 muestra el peso, el largo del intestino delgado, así como el grosor de la capa muscular de este intestino en las ratas estudiadas. Comparando estas medidas en las ratas que consumieron la dieta control, se aprecia que la restricción del consumo de esta dieta y la desnutrición que esta restricción produjo, estuvo asociada con intestinos más livianos y cortos y con una reducción en el grosor de la pared muscular. Estos cambios fueron más aparentes en las ratas asignadas al grupo cuyo consumo de alimento se restringió más y que en consecuencia eran también las más desnutridas. En contraste con este efecto de la desnutrición, la Tabla 3 muestra que las ratas con desnutrición y diarrea ya sea osmótica o secretora tenían intestinos más pesados, más largos y con una pared más gruesa que los desnutridos sin diarrea. Estas ratas, aunque pesaban sustancialmente menos que las bien nutridas (controles ad libitum) tenían, en general, dimensiones intestinales iguales o mayores, indicando que la diarrea causa una hipertrofia de este órgano. Aunque los datos anteriores demuestran que la diarrea aumenta el peso, la longitud y el grosor del intestino delgado, la magnitud de este aumento es difícil de apreciar ya que los animales bien nutridos eran mucho más pesados que los desnutridos con o sin diarrea por lo que naturalmente tenían intestinos mayores. Por esta razón, se corrigieron las medidas anteriores por el peso de los animales. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 3 como peso, longitud y grosores intestinales relativos al peso corporal de cada grupo. Expresando los

valores en esta forma, se puede concluir que la desnutrición no afecta ni el peso ni el grosor del intestino, pero en casos de desnutriciones severas, como ocurrió en el grupo en que

la oferta de dieta se redujo a lo medido en las ratas con diarrea secretora, la desnutrición estuvo asociada con un aumento en la longitud del intestino delgado.

TABLA 3

Morfometría del intestino delgado de ratas que consumieron la dieta control ad libitum y restringida y de ratas con diarrea producida con laxantes

Intestino delgado	Consumo ad libitum	Dieta Control		Dieta con Laxantes	
		Consumo restringido según DS (1)	Consumo restringido según DO (2)	Diarrea secretora DS (3)	Diarrea osmótica DO (4)
Peso (g)	5.8 ± 1.75 a	2.7 ± 0.27 b	4.2 ± 0.26 c	7.4 ± 1.87 d	7.7 ± 1.73 d
Largo (cm)	100.3 ± 8.31 a	74.8 ± 3.29 b	77.0 ± 10.76 b	98.8 ± 8.64 ab	105.8 ± 8.14 a
Grosor de la pared (mm)	5.1 ± 1.17 a	2.6 ± 0.62 b	4.7 ± 1.11 a	4.7 ± 0.88 a	5.2 ± 0.95 a
Peso relativo 5 (mg/g)	36.1 ± 8.57 a	34.3 ± 1.13 a	36.7 ± 2.09 a	112.2 ± 12.9 b	66.1 ± 9.61 c
Largo relativo 5 (cm/g)	0.6 ± 0.05 a	1.1 ± 0.06 b	0.7 ± 0.09 a	1.5 ± 0.28 c	1.2 ± 0.23 bc
Grosor de la pared relativo 5 (µm/g)	30.0 ± 10.25 a	30.1 ± 10.11 a	40.5 ± 10.2 a	80.2 ± 20.5 b	40.1 ± 10.2 a

La Tabla muestra la media ± la desviación típica de 7 ratas (a-c). Medias con letras diferentes son diferentes ( $P < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de los rangos múltiples de Duncan.

1. A estas ratas se les ofreció la misma cantidad de alimento que consumieron las ratas con diarrea secretora.
2. Recibieron la misma cantidad de alimento que las ratas con diarrea osmótica.
3. La diarrea secretora se produjo incorporando bisoxatin acetato al 3.8% en la dieta a expensas del almidón.
4. La diarrea osmótica se produjo reemplazando el 44% del almidón dietario por lactosa.
5. Magnitud de variable dividido por el peso de la rata de la que se obtuvo el intestino.

En contraste con el escaso efecto de la desnutrición sobre estas medidas intestinales, la diarrea produjo un aumento notable en todas estas medidas. Este aumento fue proporcional a la severidad de la diarrea ya que las ratas con diarrea secretora, que fue la más severa de las diarreas inducidas aquí con laxantes, fueron las que mostraron una mayor hipertrofia del intestino delgado. De acuerdo con esto los coeficientes de correlación entre la masa fecal excretada y el peso, longitud y grosor del intestino delgado en todas las ratas estudiadas fue de  $r = 0.99$ ,  $r = 0.94$  y  $r = 0.85$  respectivamente. Estos altos coeficientes de correlación indican que las medidas intestinales de todas las ratas estudiadas, independientemente de si tenían diarrea o no o del tipo de diarrea que se les indujo, se ordenaron bien en líneas rectas, de acuerdo, exclusivamente, a la magnitud de la masa fecal excretada.

La dependencia del tamaño del intestino delgado de la masa fecal, descrito aquí, está de acuerdo con las observaciones de Elsenhans y colaboradores (21), que detectaron un aumento en la longitud del intestino en respuesta a consumos de carbohidratos no digeribles. Estos autores, atribuyeron estos cambios al estímulo mecánico ejercido por el volumen y flujo peristáltico sobre la mucosa intestinal y sus capas musculares subyacentes. Sin embargo, el aumento en la longitud del intestino delgado, detectado en las ratas sin diarrea pero con un consumo de alimento

restringido al nivel medido en las ratas con diarrea secretora, sugiere que parte de este aumento, pudiera reflejar una respuesta compensatoria que se manifiesta en desnutriciones severas y que pudiera contribuir a aumentar la capacidad de absorber los nutrientes consumidos.

Los tratamientos estudiados, también afectaron el tamaño del intestino grueso. Sin embargo, en esta región del intestino, los cambios morfométricos observados, fueron lo opuesto de lo descrito en relación con el intestino delgado. Así, mientras en el intestino delgado la mayor hipertrofia se detectó en las ratas con diarrea secretora, las ratas con diarrea osmótica tenían intestinos gruesos notablemente más voluminosos que aquellas con diarrea secretora. Esto, se reflejó especialmente en el peso relativo del intestino grueso que, aunque fue siempre mayor en las ratas con diarrea que en las controles nutridas o desnutridas, en las ratas con diarrea secretora se duplicó mientras que en aquellas con diarrea osmótica fue cuatro veces mayor a el observado en las ratas bien nutridas.

**Morfología del yeyuno.** La Tabla 4 muestra el efecto de los tratamientos estudiados sobre algunos aspectos de la morfología del yeyuno, observados bajo el microscopio de luz, en cortes coloreados con hematoxilina-eosina. Comparando, el tamaño de las vellosidades y criptas, se observa que los cambios más notables, ocurrieron en las ratas

sin diarrea pero desnutridas a los niveles observados en la diarrea secretora. Estas ratas junto con las ratas con diarrea secretora fueron las que mostraron las desnutriciones más severas del experimento pero sólo las desnutridas mostraron una notable disminución en la altura de las vellosidades, en

la profundidad de las criptas y en el cociente entre estas dos medidas. Estos resultados no sorprenden ya que tradicionalmente estos cambios, se han asociado con problemas de desnutrición (22) o de la inactividad del intestino que resulta de la alimentación parenteral total (23).

TABLA 4

Medidas morfológicas del intestino delgado de ratas que consumieron la dieta control ad libitum y restringida y de ratas con diarrea producida con laxantes

Intestino delgado	Consumo ad libitum	Dieta Control		Dieta con Laxantes	
		Consumo restringido según DS (1)	Consumo restringido según DO(2)	Diarrea secretora DS (3)	Diarrea osmótica DO (4)
Altura de las vellosidades ( $\mu\text{m}$ )	4.4 $\pm$ 1.20 a	2.2 $\pm$ 0.39 b	4.2 $\pm$ 0.93 a	4.2 $\pm$ 0.81 a	4.0 $\pm$ 1.02 a
Profundidad de las criptas ( $\mu\text{m}$ )	1.3 $\pm$ 0.31 a	0.90 $\pm$ 0.15 b	1.3 $\pm$ 0.30 a	1.3 $\pm$ 0.14 a	1.2 $\pm$ 0.15 ab
Altura vellosidades	3.7 $\pm$ 0.81 a	2.4 $\pm$ 0.34 b	3.4 $\pm$ 0.51 a	3.4 $\pm$ 0.56 a	3.4 $\pm$ 1.01 a
Número de mitosis	1.93 $\pm$ 1.21 a	1.30 $\pm$ 1.22 b	1.82 $\pm$ 1.07 ab	3.27 $\pm$ 1.53d	3.10 $\pm$ 1.71 d
Número células caliciformes	6.1 $\pm$ 2.47 a	5.7 $\pm$ 2.41 b	6.7 $\pm$ 3.36 a	5.6 $\pm$ 3.14 b	8.9 $\pm$ 2.83 c

La Tabla muestra la media  $\pm$  la desviación típica de 7 ratas (a-c). Medias con letras diferentes son diferentes ( $P < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de los rangos múltiples de Duncan.

1. A estas ratas se les ofreció la misma cantidad de alimento que consumieron las ratas con diarrea secretora.
2. Recibieron la misma cantidad de alimento que las ratas con diarrea osmótica.
3. La diarrea secretora se produjo incorporando bisoxatin acetato al 3.8% en la dieta a expensas del almidón.
4. La diarrea osmótica se produjo reemplazando el 44% del almidón dietario por lactosa.

La Tabla 4 indica además que estos cambios morfológicos de la mucosa, requieren de una desnutrición severa ya que las ratas a las que se les restringió el consumo al nivel de las que tenían diarrea osmótica y que no estaban tan desnutridas como las anteriores, tenían vellosidades y criptas similares a las ratas que consumieron la dieta control ad libitum y que estaban bien nutridas.

En contraste con los resultados recién descritos, lo que sorprende en la Tabla 4 es que la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas de las ratas con diarrea eran idénticas a las medidas en las ratas controles bien nutridas. Esto, a pesar de que las ratas con diarrea osmótica tenían cierto grado de desnutrición y que las ratas con diarrea secretora estaban severamente desnutridas. Por esta razón, se concluye que el aplanamiento de las vellosidades y criptas debe ser resultado de la desnutrición y no de la diarrea. La diarrea más bien, evitó este aplanamiento, tal como lo demuestra la comparación de la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas en las ratas con diarrea secretora y sus controles restringidos. Estos dos grupos estaban igualmente desnutridos pero sólo los que recibieron el laxante tenían diarrea con vellosidades y criptas normales.

Adicionalmente a los cambios en el tamaño de las vellosidades y criptas asociados con la desnutrición y la diarrea, el estudio histológico del yeyuno, reveló que el

número de figuras mitóticas presentes en las criptas se redujo ligeramente en los grupos desnutridos sin diarrea mientras que en los grupos desnutridos con diarrea, independientemente de si era secretora u osmótica, el número de células en esta condición, aumentó substancialmente. Esto, indica que los dos tipos de laxantes utilizados en este estudio, a pesar de la desnutrición que produjeron, estimularon los procesos de división celular en esta región del intestino (24) y probablemente, esto justifica la hipertrofia del intestino delgado que se observó aquí, exclusivamente en las ratas desnutridas con diarrea.

Así como, la capacidad de absorber la grasa y proteína de la dieta, el tamaño del intestino delgado, la altura de las vellosidades, la profundidad de las criptas y el número de figuras mitóticas respondieron al hecho de tener diarrea o a la severidad de la misma, sin diferencias sustanciales entre el tipo de diarrea, la Tabla 4 indica que el número de células caliciformes aumentó considerablemente, sólo en el caso de la diarrea osmótica. En este tipo de diarrea, se observó además un daño al nivel de la mucosa intestinal caracterizado por un aspecto vesiculoso del citoplasma supranuclear de los enterocitos y la presencia de zonas de discontinuidad de la chapa estriada en la superficie apical de las células absorptivas. El aumento en las células caliciformes en este tipo de diarrea, posiblemente represente un mecanismo de

adaptación para aumentar la producción de moco y así, reducir el efecto de la lactosa que se utilizó para producir la diarrea osmótica. Una situación similar se ha observado por la acción de sustancias irritantes (25) y también en dietas con exceso de lactosa (12).

El daño del borde estriado, observado aquí en las ratas con diarrea osmótica, también se ha observado en caso de diarreas producidas por infecciones con *Giardia* y *Yersinia Enterocolítica* (26) y se le ha asociado con una disminución en las disacaridasas. Estas observaciones también coinciden con las de Bueno y col. (12) que observaron en los enterocitos de ratas con diarrea producida por lactosa, extensas regiones con daño de las microvellosidades y pérdida de la delimitación del área celular.

Además de estos profundos cambios en la morfología del yeyuno observados en las ratas con diarrea osmótica, los dos tipos de diarrea estudiados aquí, produjeron una reacción inflamatoria al nivel de la mucosa de esta región del intestino, caracterizada por una infiltración celular, principalmente por linfocitos que se detectaron tanto en la mucosa como en la submucosa y el epitelio de revestimiento. Es posible que el deterioro del estado nutricional de la vitamina E, observado en ratas con diarrea osmótica inducida con lactosa, (8) esté asociado con este proceso inflamatorio.

Las observaciones microscópicas realizadas a nivel del colon, mostraron también un aumento en el número de células caliciformes hacia el fondo de las criptas, exclusivamente en el caso de la diarrea osmótica. Asimismo, en este tipo de diarrea, se observaron formaciones saculares en la pared con aspecto de vesículas llenas de un líquido seroso. En contraste, en las ratas con diarrea secretora, la morfología del colon fue muy similar a la observada en las ratas controles.

Es posible que los cambios morfológicos, observados aquí en el colon de las ratas con diarrea osmótica, sean en parte responsables por la aparente hipertrofia y distensión del colon que se detectó durante la autopsia de esta ratas.

## CONCLUSION

El diseño experimental utilizado, permitió diferenciar los efectos de la diarrea de los asociados con la desnutrición que esta patología produce, en relación con la función y la estructura del aparato gastrointestinal. A diferencia de lo esperado, los dos efectos no fueron aditivos, sino que la diarrea modificó completamente los efectos producidos por la desnutrición. Así, la desnutrición aislada, no tuvo mayores consecuencias en relación con las medidas intestinales y cuando fue severa produjo un aplanamiento de las vellosidades que no tuvo efectos en su función absorbiva. En contraste, la diarrea tuvo un marcado efecto trófico sobre todas las medidas intestinales y evitó la atrofia de las

vellosidades causada por la desnutrición. Sin embargo, esto no fue suficiente para compensar completamente la capacidad de absorber los nutrientes dietarios.

La inclusión de dos tipos de laxantes, que produjeron diarreas de diferente severidad y efectos distintos sobre la morfología intestinal permitió establecer la importancia de estos cambios morfológicos sobre la función intestinal. Así, aunque la diarrea osmótica produjo las alteraciones morfológicas más severas tanto a nivel del yeyuno como en colon, fue mayor la absorción de la proteína y la grasa dietaria. Esto indica que, los cambios morfológicos producidos por los laxantes no fueron determinantes en relación con la función intestinal. Parece más bien, que lo que determinó la capacidad de absorber fue la severidad de la diarrea producida, ya que las ratas con diarrea secretora presentaron menos alteraciones morfológicas, pero diarreas más severas. Quizás lo que determine la capacidad de absorber los macronutrientes, sea el tiempo de contacto entre los nutrientes y la mucosa más que la integridad de la mucosa.

Este estudio, permitió establecer que, en ratas, la diarrea, provoca un efecto trófico en el intestino proporcional a su severidad. Es posible que este aumento en el tamaño del intestino así como en la altura de las vellosidades, sea un factor adaptativo estimulado por la diarrea que evita mayor pérdida de la función absorbiva en una situación en la cual el tiempo de tránsito intestinal disminuye y la morfología del intestino sufre alteraciones importantes.

## REFERENCIAS

1. WHO. The World Health Report. Bridging the Gaps. Report of the Director General, Ginebra, Suiza, 1995.
2. Gracey M. Diarrheal Disease in Perspective. En: Workshop, Series Vol 38. Nestlé Ltda., Vevey/Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, 1997.
3. OPS. Venezuela. En: La salud en las Américas. Oficina Sanitaria Panamericana. Vol II. Pub. No. 569. Washington, D.C, 1998:581-586.
4. Ministerio de Salud y Asistencia Social. Dirección de Epidemiología y Programas de Salud. Departamento de Vigilancia Epidemiológica. Caracas, 1998.
5. Mata LJ, Kronma RA, Urrutia JJ y García B. Effect of infection on food intake and the nutritional state: perspectives as viewed from a village. Am J Clin Nutr 1977;30:1215-1227.
6. Bahan MK y Bhandari N. Epidemiology of Persistent Diarrhea. En Workshop, Series Vol 38. Nestlé Ltda., Vevey/Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, 1997.
7. Hevia P, Carías D, Cioccia AM y González E. Diarrea y Desnutrición: Experiencia en niños y ratas. Anales Venezolanos de Nutrición 1998;11:28-36.
8. Liuzzi J P, Cioccia AM y Hevia P. In well-fed young rats, Lactose-induced Chronic reduces the apparent absorption of vitamins A and E and affects preferentially vitamin E status. J Nutr 1998;128:2467-2472.

9. Greene HL y Morán R. The Gastrointestinal Tract: Regulator of Nutrient Absorption. En: Shils ME, Olson JA y Shike M, edit. *Modern Nutrition in Health and Disease*. 8th Edition. Vol 1. Philadelphia, 1994:549- 568.
10. FAO. Protein Quality Evaluation. Food and Nutrition Paper No 51. Rome, 1991.
11. Wisker E, Bach Knudsen KE, Daniel M, Feldheim W y Eggum BO. Digestibilities of Energy, Fat and nonstarch polysaccharides in a low fiber diet and diets containing coarse or fine whole meal rye are comparable in rats and humans. *J Nutr* 1996;126:481-488.
12. Bueno J, Torres M, Almendros A, Carmona R, Nuñez MC, Ríos A y Gil A. Effect of dietary nucleotides on small intestinal repair after diarrhoea: Histological and ultrastructural changes. *Gut*. 1994;33:926-933.
13. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on standards for nutritional studies. *J Nutr*, 1977; 107:1340-8.
14. Hevia P y Cioccia A. Application of a colorimetric method to the determination of the nitrogen in nutritional studies with rats and humans. *Nutr Rep Int* 1988;38(6):1129-1136.
15. Blight E y Dyer W. A rapid method of total lipids extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1958;37:911.
16. Steel RG y Torrie JH. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. 2ª ed. McGraw Hill, México, 1998.
17. Duncan DB. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 1955;11:1-6.
18. Cioccia AM, González E, Pérez M, Mora JA, Römer H, Molina E y Hevia P. Application of a colorimetric method to the determination of the protein content of commercial foods, mixed human diets and nitrogen losses in infantile diarrhoea. *Int J Food Sci Nutr* 1995;46(1):21-29.
19. Römer H, Páez M, Hevia P, Piña JM, Urrustera MI, Perez-Schael I. Estudio comparativo de las pérdidas en las heces de nitrógeno, lípidos y energía en niños deshidratados por diarrea aguda debido a rotavirus y otros agentes. *GEN* 1989;43(1):23-7.
20. Arciniegas EL, Cioccia AM y Hevia P. Efecto de la diarrea inducida con lactosa sobre la disponibilidad de los macronutrientes y la función inmune en ratas nutridas y desnutridas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2000;50(1):48-54.
21. Elsenhans B, Blume R y Caspary W. Long-term feeding of unavailable carbohydrate gelling agents. Influence of dietary concentration and microbiological degradation on adaptive response in the rat. *Am J Clin Nutr* 1981;34:1837-48.
22. Altman G. Influence of starvation and refeeding on mucosal size and epithelial renewal in the rat small intestine. *Am J Anat* 1972;133:391-400.
23. Levine G, Deren J y Steiger E. Role of oral intake in maintenance of gut mass and disaccharidase activity. *Gastroenterology* 1974;67:975-82.
24. Wong WM y Wright NA. Epidermal growth factor, epidermal growth factor receptors, intestinal growth and adaptation. *J Parenteral and Enteral Nutrition* 1999;23:S83-S88.
25. Neutra MR, O'Malley LJ y Specian RD. Regulation of intestinal goblet cell secretion. II. A survey of potential secretagogues. *Am J Physiol* 1982;242(4):G380-7.
26. O'Loughlin E, Scott R y Gall D. Pathophysiology of Infectious Diarrhea: Changes in Intestinal Structure and Function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991;12: 5-20.

Recibido: 19-09-2000

Aceptado: 13-11-2001

## El estado nutricional modifica la efectividad de un suplemento dietario de bacterias lácticas sobre la aparición de patologías de vías respiratorias en niños

María Esther Río, Liliana Beatriz Zago, Hugo García y Luis Winter

Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Departamento de Pediatría. Hospital Prof. Dr. Alejandro Posadas. Provincia de Buenos Aires

**RESUMEN.** Se estudiaron 100 niños de alto riesgo social entre 6 y 24 meses de edad, clasificados como normales o desnutridos, según el indicador antropométrico Peso/Talla %, que recibieron a ciegas durante 3 meses, entre el otoño y el invierno, un suplemento de *L. acidophilus* y *L. casei* vivos, en una concentración de  $10^7$ - $10^8$ /ml de leche fermentada (Grupo LB) o una cantidad equivalente de leche fluida pasteurizada (Grupo L), utilizada como control para descartar posibles efectos inespecíficos del vehículo. Los niños fueron controlados en los consultorios externos del Hospital Prof. Dr. A. Posadas (Gran Buenos Aires), registrándose todos los episodios de patologías de vías respiratorias (PVR). La severidad se cuantificó de acuerdo al código de enfermedades de la OMS como: catarro de vías aéreas superiores (CVAS), bronquitis (B), bronquitis obstructiva recurrente (BOR) y neumonía (N). De los 58 niños que completaron el estudio, 22 pertenecían al grupo LB y 36 al grupo L; 21 fueron clasificados como desnutridos y 37 presentaron un valor de P/T% dentro de los límites normales. Durante el período del estudio no se registraron muertes. Se registraron 103 episodios de patologías de vías respiratorias, 34 en el Grupo LB y 69 en el control, con una frecuencia de 1,55 y 1,92 episodios/niño respectivamente. En el grupo LB se registró un máximo de 3, mientras que en el L se llegó a 7 episodios/niño ( $p=0,0373$ ). El análisis de las patologías por gravedad mostró mayor severidad en el grupo L que en el LB: 0,06 vs 0 para neumonías; 0,69 vs 0,45 para B+BOR y 1,17 vs 1,09 para CVAS. En los desnutridos que consumieron leche control, la frecuencia de las patologías de mayor severidad duplicó la de los normales: 0,08 vs 0,04 para las neumonías, 1,08 vs 0,50 para las bronquitis, sin diferencias para el CVAS. El suplemento de lactobacilos previno las neumonías y disminuyó la frecuencia de las bronquitis en normales y desnutridos. En este estudio la presencia de desnutrición incrementó la predisposición hacia las patologías de mayor severidad y limitó la efectividad del suplemento para morigerar la gravedad, probablemente por limitar la capacidad del organismo para llevar a cabo la respuesta inmune.

**Palabras clave:** Patologías de vías respiratorias, desnutrición, probióticos, probióticos en desnutrición, niños.

**SUMMARY.** Undernutrition affect live lactobacillus effect on respiratory tract infections in children from social risk areas. One hundred children 6 to 24 month old, normal or undernourished according to weight for height index, received during three months -autumn to winter- a dietary supplement of live *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus Casei*,  $10^7$ - $10^8$ /ml in fermented milk (LB) or an equivalent amount of fluid milk (L) as control. Children's follow-up was performed as outpatients in the Hospital Posadas (Great Buenos Aires). Episodes of respiratory tract infections were recorded and classified according to severity as: Pneumonia (N); Bronchitis (B), Recurrent Obstructive Bronchitis (BOR) and upper respiratory tract infections (CVAS). 58% of children fitted the study protocol, 22 in the LB and 36 in the L group; 21 were undernourished and 37 presented normal weight/height. No deaths were recorded. Total episodes were 103: 34 in LB and 69 in L, that means a frequency of 1.55 and 1.92 episodes/children respectively. In LB a maximum of 3 episodes/children was recorded, meanwhile the number reached 7 in L ( $p=0.0373$ ). Severity was higher in L than LB: 0.06 vs. 0 for N; 0.69 vs. 0.45 for B+BOR and 1.17 vs. 1.09 for CVAS. In the control group frequency of severe pathologies was about twice in undernourished than in normal: 0.08 vs. 0.04 for N; 1.08 vs. 0.50 for B+BOR; no difference was found for CVAS. Live lactobacillus supplement suppressed pneumonia and decreased bronchitis in undernourished as well as in normal. In this study undernutrition not only increased the chance of suffering severe acute respiratory tract infections but also impaired the effectiveness of the supplement to decrease severity. The effect is explained on the basis of the immunocompetence depression linked to an inadequate nutritional status.

**Key words:** Probiotics, undernutrition, acute respiratory tract infection, probiotics and undernutrition, children.

## INTRODUCCION

El intestino grueso había sido considerado de escasa importancia fisiológica, fundamentalmente para la eliminación de desechos, hasta que en la década del '80 adquirió gran interés al reconocérsele funciones importantes para la salud, a partir de la composición de su microbiota (1-4). La modulación de la flora colónica por los alimentos, destinada a exaltar las propiedades benéficas y controlar los microorganismos patógenos, se convirtió desde entonces en un importante objetivo a ser alcanzado a través de desarrollos tecnológicos que involucran a materias primas alimenticias (5-9).

Múltiples investigaciones realizadas sobre el tema nos permiten saber hoy que el intestino grueso es la región más altamente colonizada de todo el tracto digestivo, alcanzándose recuentos de más de  $10^{12}$  bacterias/g de contenido intestinal. A través de procesos fermentativos las bacterias colónicas son capaces de producir un amplio espectro de compuestos con actividad biológica, local o sistémica, favorables o desfavorables para la salud; la mayoría de los microorganismos presentes en el colon son anaerobios estrictos y entre los numéricamente predominantes se encuentran las bifido-bacterias y los lactobacilos; éstos presentan una serie de efectos benéficos que pueden deberse tanto a la inhibición del crecimiento de los patógenos cuanto a la estimulación de la función inmune, mejora de la digestión y absorción de nutrientes, síntesis de vitaminas, etc. (8-10). Dichos efectos dieron origen al concepto de «Probiótico», el que se ha definido como: "Un suplemento de microbios vivos que produzca efectos benéficos sobre la salud del huésped y que mejore el balance microbiano intestinal" (11). Entre los alimentos que presentan mayor posibilidad de ser utilizados como vehículos de probióticos se encuentran los productos lácteos fermentados con diversas cepas de lactobacilos (12-16).

En este trabajo, realizado en niños de alto riesgo social, menores de 2 años, se analizó el efecto producido por la ingestión de un suplemento de bacterias vivas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* sobre la aparición de cuadros de patologías de vías respiratorias habituales en esa etapa de la vida (17). También se evaluó la influencia de la presencia de desnutrición, como factor modificador del riesgo de sufrir diferentes cuadros de patologías de vías respiratorias y la efectividad del suplemento para prevenir dichos cuadros.

## MATERIALES Y METODOS

**Sujetos:** El estudio se llevó a cabo en 100 niños, entre 6 y 24 m de edad, seleccionados según el siguiente esquema: niños antropométricamente normales y clínicamente sanos,

o desnutridos de grados I o II según el parámetro Peso/Talla% de acuerdo a la clasificación de Ariza Macías (18), sin otra patología clínica diagnosticada al inicio del estudio; los fueron asignados al azar a grupos que recibieron diariamente durante los meses de otoño e invierno, de abril a septiembre, a ciegas y durante un mínimo de 90 días, un suplemento dietario de *L. acidophilus* y *L. casei* viables en 250-300 mL de una leche cultiyada hasta una concentración de  $10^7$ - $10^8$ /mL (Grupo LB, n=50), o una cantidad equivalente de leche fluida pasterizada (Grupo L, n=50), utilizada como control para descartar posibles efectos inespecíficos del vehículo. El protocolo fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación del Hospital Prof. Dr. A. Posadas y por el Comité de Docencia en Nutrición de la Sociedad Argentina de Pediatría. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los padres o tutores.

**Métodos:** El estudio se realizó en forma ambulatoria excepto cuando se presentaron casos de neumonía que hicieron necesaria la internación. Los niños fueron controlados durante el seguimiento en los consultorios externos del Hospital Prof. Dr. A. Posadas localizado en el Partido de Morón, Gran Buenos Aires.

Durante el estudio se registraron todos los episodios de patologías de vías respiratorias (PVR) y la severidad se cuantificó de acuerdo al código de enfermedades de la OMS como: catarro de vías aéreas superiores (CVAS), bronquitis (B), bronquitis obstructiva recurrente (BOR), y neumonía (N). Para los análisis estadísticos se utilizó el test de Fisher para estudios de casos y controles mediante el programa Instat.

## RESULTADOS

Los resultados que se analizan corresponden a los niños que permanecieron en el proyecto y tuvieron seguimiento satisfactorio; el número final de casos analizados fue de 58, con una retención aproximada del 60%, cifra muy elevada para este tipo de estudios (17). La distribución final de los niños en los grupos según la leche que recibieran fue: 22 niños recibieron leche suplementada con lactobacilos (Grupo LB) y 36 solo leche fluida pasterizada (Grupo L). Durante el período del estudio no se registró ninguna muerte.

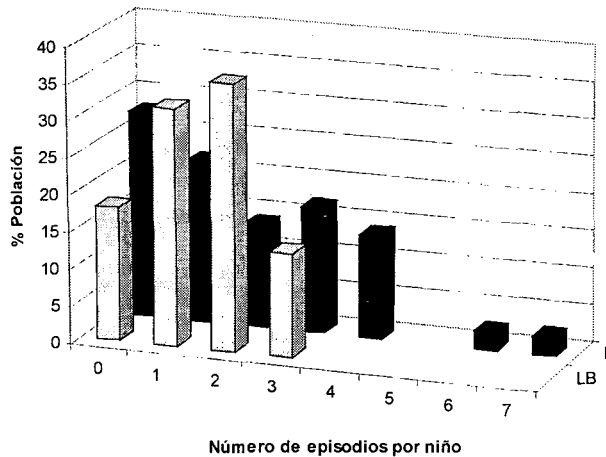
### Frecuencia y gravedad de patologías de vías respiratorias

El análisis del número de episodios de PVR registrados durante el período del estudio arrojó un total de 103 episodios, de los que 34 correspondieron al grupo LB y 69 al grupo L o control. Ésto hace una frecuencia de aparición de PVR de 1,55 y 1,92 episodios/niño para los grupos LB y L respectivamente.

Cuando los resultados se expresaron como el número de veces que los niños presentaron alguna de las patologías consideradas, se obtuvo la distribución porcentual para los grupos experimental y control que se muestra en la Figura 1. Como puede apreciarse, los niños que recibieron el suplemento de lactobacilos acumularon el 100% de los casos entre 0 y 3 episodios, con el máximo de frecuencia en 1 y 2. En el grupo control L, si bien la mayor frecuencia estuvo en 0 y 1 episodio, hubo casos en los que se presentaron más de 4 episodios, alcanzándose la cifra máxima de 7 episodios/niño. Las diferencias entre los grupos experimental y control fueron significativas a nivel de  $p = 0,0373$ .

FIGURA 1

Distribución porcentual de los grupos estudiados según el número de episodios de patologías de vías respiratorias por niño

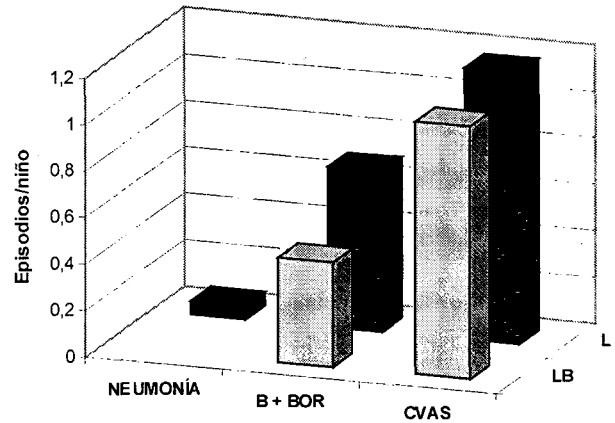


Se presenta el porcentaje de población según el número de episodios de patologías de vías respiratorias por niño, en el grupo que recibió leche suplementada (LB) y en el grupo control que recibió leche fluida pasterizada (L).

También se analizó la gravedad de los episodios de PVR que tuvieron lugar durante el estudio, dividiéndolos en las categorías establecidas por la OMS ya mencionadas. Se observó un mayor número de episodios para todas las categorías en los niños del grupo L: 2 episodios de Neumonía, 25 de B + BOR y 42 de CVAS. En el grupo LB se registraron: 10 episodios de B + BOR y 24 de CVAS. Esta información, expresada como número de episodios/niño respecto del total de niños del grupo, se muestra en la Figura 2.

FIGURA 2

Frecuencia de aparición de patologías de vías respiratorias en los grupos estudiados



Se presenta el número de episodios/niño de neumonías, bronquitis + bronquitis obstructiva recurrente (B+BOR) y catarros de vías aéreas superiores (CVAS) registradas en el grupo que recibió leche suplementada con lactobacilos (LB) y leche control (L).

**Influencia del estado nutricional**

En la Tabla 1 se presentan los datos de frecuencia media de aparición de PVR en función del estado nutricional, agrupados según el grupo experimental al que habían sido asignados. En la Figura 3a se muestran los datos correspondientes a los niños desnutridos, presentándose la frecuencia de aparición de las patologías según su severidad en los grupos LB y L. En la Figura 3b se muestran los datos correspondientes a los niños antropométricamente normales.

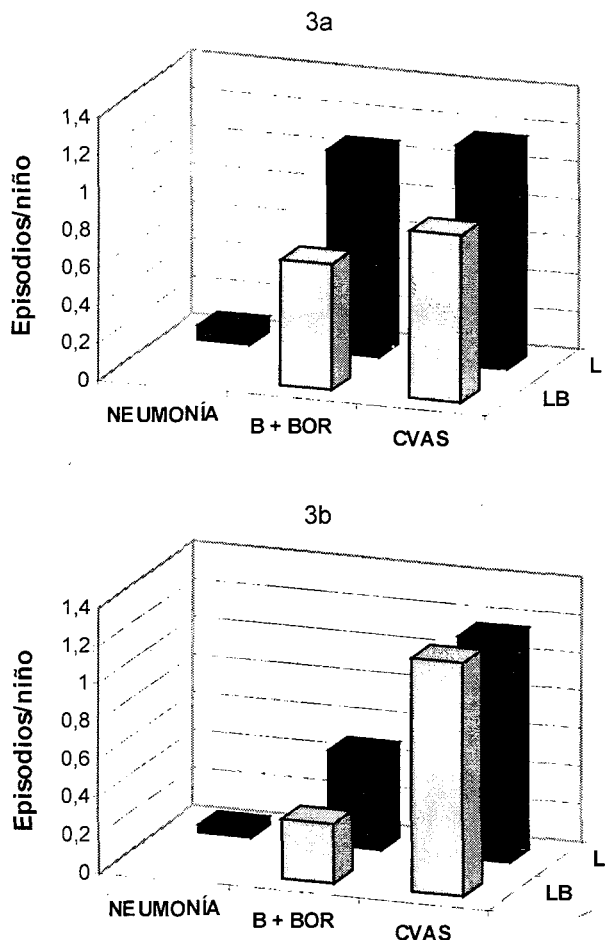
TABLA 1

Frecuencia de patologías de vías respiratorias registradas durante el estudio agrupadas según estado nutricional

Grupo	n	Episodios/niño	
		Desnutridos	Normales
LB	9	1,56	1,54
L	12	2,33	1,71

Se presenta el número de episodios/niño para su grupo  
 n = número de niños  
 LB = leche suplementada con lactobacilos; L = leche fluida pasterizada

FIGURA 3  
Patologías de vías respiratorias en niños desnutridos  
y normales según el producto recibido



Se presenta el número de episodios/niño de neumonías, bronquitis + bronquitis obstructiva crónica (B+BOR) y catarros de vías aéreas superiores (CVAS) registrados en niños desnutridos (3a) y normales (3b) según recibieran leche suplementada con lactobacilos (LB) ó leche control (L).

## DISCUSION

Desde su aislamiento por Tissier en 1899, hace ya 100 años, las bacterias lácticas han sido tratadas con una mezcla de entusiasmo y escepticismo en relación a los beneficios potencialmente derivados de su ingestión en estado viable. El término "probiótico" originalmente aplicado a la guerra biológica de microorganismos en el intestino, es actualmente utilizado para definir el uso de microorganismos vivos como aditivos alimentarios cuyo objetivo es alcanzar un estado de bienestar y salud (9,11). Entre las múltiples funciones

benéficas descritas, tan diversas que van desde el control del nivel del colesterol sanguíneo a la prevención del cáncer (10,15), no hemos hallado referencias en relación a patologías de vías respiratorias.

Como se expuso en la introducción, el uso de productos lácteos fermentados con lactobacilos ha cobrado enorme importancia en el mundo a partir de la década del '80. En nuestro país, el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) desarrolló una leche fermentada con *L. acidophilus* y *L. casei*, que demostró estimular la respuesta inmune (13), ser de utilidad en el control de la diarrea aguda y mejorar la tolerancia a la lactosa (19,20).

En este trabajo, se analizó el efecto de dicho suplemento sobre la prevalencia y/o severidad de las patologías de vías respiratorias, tan frecuentes en el grupo etario estudiado debido a la condición de riesgo social de los niños y la época del año en la que se realizó el estudio.

### Efecto global del suplemento de lactobacilos

El efecto del suplemento de lactobacilos puede apreciarse en la Figura 2, en la que se muestra la distribución de los episodios de PVR que se presentaron durante el estudio, estratificados según su severidad clínica; en este gráfico las bronquitis fueron tratadas como una única entidad (B+BOR) para evitar el excesivo fraccionamiento de la información. Como puede observarse, solo se registraron neumonías en el grupo L, mientras que en el grupo LB las patologías de mayor gravedad fueron las bronquitis, cuya aparición fue, sin embargo, muy inferior que en el grupo L. Es evidente que el suplemento morigeró la aparición de PVR, siendo su efecto mayor sobre las de mayor severidad.

Este análisis complementa las observaciones mostradas en la Figura 1 al demostrar que la introducción del suplemento de lactobacilos no sólo limitó el número de episodios totales sino que modificó la severidad con la que éstos se presentaron. Respecto de este punto es importante destacar la ausencia de neumonías y la disminución de los casos de B + BOR (0,45 vs. 0,69 episodios/niño), con mínimas diferencias en los CVAS (1,09 vs. 1,17). Por consiguiente, el suplemento resultó efectivo tanto para prevenir las patologías de vías respiratorias, tan frecuentes en los dos primeros años de vida que puede llegar a representar el 67% de la morbilidad total (17), cuanto para morigerar la severidad con la que se presentaban.

### Efecto del estado nutricional

Como ya se ha mencionado, y podía esperarse dadas las características de la población estudiada (17), se registró una considerable cantidad de episodios de patologías de vías respiratorias, que se presentaron tanto en los niños desnutridos cuanto en los clínicamente y antropométricamente sanos.

El efecto de la desnutrición puede apreciarse en la Figura 3, en la que se muestra el número de episodios/niño de las PVR que se presentaron durante el estudio, estratificadas según su severidad clínica. Se presenta el comportamiento de los niños desnutridos (Figura 3a) y normales (Figura 3b) en función del producto recibido. En los desnutridos que consumieron leche como control, las patologías de mayor severidad se presentaron con una frecuencia que duplicó la de los normales: 0,08 vs. 0,04 para las neumonías y 1,08 vs. 0,50 para las B + BOR; no se observó el mismo efecto a nivel de CVAS. El panorama puesto de manifiesto en esta figura confirma un hecho conocido desde la década del 60 y más recientemente revisado por Scrimshaw (21): el estado nutricional actúa como factor que predispone a contraer infecciones.

Al analizar la distribución de patologías en los niños que recibieron el suplemento de lactobacilos la primera observación es que no se presentaron casos con neumonía, tanto en los normales cuanto en los desnutridos. En cuanto a las B + BOR el descenso en la frecuencia se produjo tanto en normales como en desnutridos, pero sin alterar la relación entre la frecuencia observada en desnutridos y normales (0,67 vs. 0,31), mostrando la misma duplicación del número de casos que lo observado para el grupo control.

La situación inversa se observó con los CVAS en los que la frecuencia fue mayor en los normales que consumieron LB que en los desnutridos que consumieron LB, y la relación entre normales y desnutridos de 1 en el grupo L aumentó a 1,38 en el grupo LB (1,23 vs. 0,89). Este comportamiento pone de manifiesto que en los niños normales el suplemento de lactobacilos provocó un efecto de acumulación de los episodios en los CVAS, mientras que en los desnutridos el desplazamiento en el sentido de la patología de menor gravedad fue menos efectivo.

En resumen, en este estudio la presencia de desnutrición no solo incrementó la predisposición hacia las patologías de mayor severidad, como ha sido descrito por otros autores (22-24) sino que además limitó la efectividad del suplemento de lactobacilos para producir el desplazamiento en el sentido de las de menor gravedad. El hallazgo es compatible con resultados de la literatura para estudios en animales de laboratorio (13,25,26).

El análisis conjunto del número de casos de PVR observados durante el seguimiento y de su severidad apoya la hipótesis de que la leche cultivada con *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei* tiene efectos preventivos sobre patologías de vías respiratorias en niños pertenecientes a grupos en estado de riesgo social. Sin embargo, debe destacarse que aunque la morigeración de los cuadros más graves se observó tanto en los niños normales cuanto en los desnutridos, la eficacia final del producto, se relacionó con el estado nutricional. Sobre esta base podría inferirse que la

inmunoestimulación asociada a la ingestión de *Lactobacillus acidophilus* y *L. casei* está limitada por la capacidad del organismo para dar una adecuada respuesta inmune, hecho que estaría ligado al comportamiento del suplemento como vacuna oral de lactobacilos vivos (27).

Una extrapolación posible de los hallazgos de este trabajo es que la limitación del efecto del suplemento de lactobacilos para lograr niveles de prevención óptimos y morigeración de la patología de vías respiratorias, pueda también manifestarse en presencia de cuadros de desnutrición sobre otros de los efectos benéficos descritos, en particular las diarreas agudas que, en poblaciones como las incluidas en este estudio, habitualmente se presentan con mayor frecuencia y/o severidad en los niños desnutridos.

Esta hipótesis se sustenta en múltiples publicaciones que relacionan desnutrición con sistema inmune en humanos (21-24) ya que la información disponible sobre las interacciones entre estado nutricional y efecto probiótico de los lactobacilos es escasa, parcial y basada fundamentalmente en resultados de animales de laboratorio (13,25,26), bajo condiciones de dieta y medio ambiente controlados, con las dificultades de interpretación que esta situación conlleva para su extrapolación a los humanos (28). Creemos que este tipo de estudios son otro importante objetivo a cubrir en los países donde la desnutrición sigue siendo un real problema de salud pública.

## REFERENCIAS

1. Clemens ML, Levine MM, Ristaino PA, Daya VE, Hughes TP. Exogenous lactobacilli fed to man: their ability to prevent diarrheal disease. Prog. Fd. Nutr. Sci. Pergamon Press Ltd. Londres 1983; Vol. 7: pp. 29-37.
2. Goldin BR, Gorbach SL. The effect of milk and lactobacillus on the human intestinal bacterial enzyme activity. Am J Clin Nutr 1984;38:756-761.
3. Pedigón G, Nader de Macías ME, Alvarez S, Medici M, Oliver G, Pesce de Ruiz Holgado A. Actividad inmunopotenciadora de bacterias lácticas administradas por vía oral. Su efecto beneficioso en diarreas infantiles. Medicina (Buenos Aires), 1986;46: 351-754.
4. Pedigón G, Nader de Macías ME, Alvarez S, Medici M, Oliver G, Pesce de Ruiz Holgado, A. Effect of a mixture of *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* administered orally on the immune system in mice. J. Food Protection 1986;49: 986-989.
5. Marteau P, Pochart P, Flourit B, Pellier P, Santol L. Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. Am J Clin Nutr 1990;52: 685-688.
6. Gibson GR, MacFarlane GT. Intestinal bacteria and disease. In: Human Health: The contribution of microorganisms.

- (Gibson SAW, ed.) 1994; pp. 53-62. Springer-Verlag, London, U.K.
7. Gibson GR and Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125: 1401-1412.
  8. Roberfroid MB, Bornet F, Bouley C, Commings JH. Colonic microflora: Nutrition and health. *Nutr Rev* 1995; 53: 127-130.
  9. Hoover DG. Bifidobacteria: activity and potential benefits. *Food Tech.* 1993;47: 120-125.
  10. Sanders ME. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J Nutr* 2000;130: 384S-390S
  11. Pardo Sedas VT, Waliszewski Kubiak KN, Robledo López G. Los probióticos y su futuro. *Arch Latinoamer Nutr* 1996;46: 6-10.
  12. Speck ML, Dobrogosz WJ, Casas IA. *Lactobacillus reuteri* in food supplementation. *Food Technol* 1993;47(7): 90-94.
  13. Pedigón G, Alvarez S, Valdez JC. Acción de bacterias lácticas y yogur sobre la respuesta inmune: sistémica, de mucosas y tumoral. *Tec Lac Latinoamer* 1995;2: 26-30.
  14. López L, Wittig E., Sligh A, Horst A. Elaboración de bebidas fermentadas para senescentes sobre la base de suero de quesería. *Tec Lac Latinoamer* 1996;5:20-23.
  15. Manzanares A. Bacterias beneficiosas al hombre. *La Alimentación Latinoamericana* 1997;218:59-65.
  16. Bellavita RO, Guanaja G. Bebidas lácteas refrescantes. *Tec Láctea Latinoamer* 1998;12:48-51.
  17. López Bravo IM, Sepúlveda H, Valdés I. Acute respiratory illness in the first 18 months of life. *Revista Panamericana de Salud Pública* 1997;1: 9-17.
  18. Ariza Macías J. Método para la evaluación del crecimiento de hombres y mujeres desde el nacimiento hasta los veinte años, para uso a nivel nacional e internacional. *Arch Latinoamer Nutr* 1972;22:531-546.
  19. González S, Albarraçín G. Prevention of infantile diarrhoea by fermented milk. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 1990;8:349-354.
  20. Gaon D, Doweck Y, Gómez Zavaglia A, Ruiz Holgado A, Oliver G. Digestión de lactosa por una leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* de origen humano. *Medicina (Buenos Aires)* 1995;55:237-242.
  21. Scrimshaw NS, San Giovanni J. Synergism of nutrition, infection and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:464S-477S.
  22. Suskind R. The immune response in the malnourished child. In «Nutrition, disease resistance and immune function» Watson RR ed. Marcel Dekker Inc, New York. 1984. Chap. 7, pp. 147-163.
  23. Chandra RK. Immunocompetence as a functional index of nutritional Status. *Br. Med Bull* 1981; 37: 89-91.
  24. Dowd PS, Heatley RV. The influence of undernutrition on immunity (Ed. Review). *Clinical Science* 1984;66: 241-250.
  25. Pedigón G, Oliver G. Modulation of the immune response of the immunosuppressed host by probiotics. En: *Probiotics 3. Immunomodulation by the gut microflora and probiotics.* Ed. R Fuller y G Pedigón. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht 2000; Capítulo 6, pp. 148-175.
  26. Pedigón G, Alvarez S, de Ruiz Holgado AP. Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *J Dairy Res* 1991;58: 485-496.
  27. Boersma JA, Shaw M, Claassen E. Probiotic bacteria as live oral vaccines. *Lactobacillus* as the versatile delivery vehicle. In: *Probiotics 3. Immunomodulation by the gut microflora and probiotics.* Ed. R Fuller and G Pedigón. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht 2000; Capítulo 10, pp234-270.
  28. Klaenhammer TR. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *J Nutr* 2000;130:417S-419S.

Recibido: 14-09-2000

Aceptado: 13-11-2001

## Expresión génica de interleucina 1 en la deficiencia de proteínas y vitamina A

*Vivian Sánchez Alvarez, Manuel Hernández Triana, Mario Abreu Peñate, Ada de las Cagigas Reig, Miguel Tam Hurtado, José Rebozo Pérez, Miriam Noa Puig, José Arias Verdé, Rebeca Fernández Carriera, Soraya González Calderín, Antonio Sigarrosa González*

Departamento de Bioquímica y Fisiología Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos-Cuba

**RESUMEN.** Tomando como referencia los niveles de ingestión de proteínas y vitamina A informados en los estudios de la población cubana durante la epidemia de neuropatía de 1993, se ejecutó un biomodelo en ratas, con el objetivo de evaluar la incidencia de estos niveles sobre algunos indicadores del estado nutricional y de la respuesta inmune. Para ello se ensayaron 4 dietas: control, deficiente en proteínas, deficiente en vitamina A y deficiente en proteínas y vitamina A. La Interleucina 1 (IL-1) se evaluó a partir de su expresión en las placas de Peyer y los resultados obtenidos se relacionaron con indicadores del estado nutricional como peso, ingesta, recambio proteico, proteínas plasmáticas y vitamina A, con indicadores inmunológicos (conteo celular y complemento hemolítico total) y con el estudio histológico realizado en timo, bazo e hígado. La deficiencia de proteínas disminuyó la expresión génica de IL-1, la cual se asoció con lesiones degenerativas y de atrofia en los órganos estudiados. La deficiencia de proteínas y vitamina A provocó una estimulación de la expresión génica de IL-1, asociada además con indicadores sensibles del estado inflamatorio, que pudiera ser el resultado de una movilización deficiente de retinol hacia los tejidos. Los resultados obtenidos en el biomodelo abren la posibilidad de utilización de las citocinas en la detección de afectaciones subclínicas del sistema inmune provocadas por deficiencias nutricionales.

**Palabras clave:** Citocinas, interleucina 1, malnutrición proteico-energética, hipovitaminosis A, inflamación.

**SUMMARY.** Gene expression of Interleukin 1 in vitamin A and protein deficiency. The influence of low levels of protein and vitamin A on indicators of the immune response was assayed in rats. The levels of protein and vitamin A intake of the Cuban population affected by epidemic neuropathy in 1993 was reproduced in 4 diets: control, protein deficiency (DP), vitamin A deficiency (DA), protein and vitamin A deficiency (DAP). The Peyer's patches evaluated the Interleukin 1 expression gene and was related with corporal weight, food intake, serum protein, vitamin A, immunology indicators and histology evaluation (spleen, thymus and liver). Protein deficiency generated a significant decrease of the expression gene of Interleukin 1. Atrophy signs in lymphoid tissues and morphologic changes in the liver were associated with the dietary protein utilization. Protein and vitamin A deficiency generated significant stimulation of the Interleukin 1 expression gene with increase of the level of the inflammatory state indicators as serum  $\alpha$  protein, total complement and neutrophils. This stimulation could be generated by a deficient retinol mobilization to tissues. These results support the hypothesis of the function of cytokines as mediators of subclinical symptoms of the immune system during the nutritional affectations.

**Keywords:** Cytokines, Interleukin 1, protein energetic malnutrition, vitamin A deficiency, inflammatory state.

### INTRODUCCION

La malnutrición por defecto es la causa más frecuente de inmunodeficiencias en el mundo actual. Dentro de las deficiencias nutricionales sobresalen la Malnutrición Proteico-Energética (MPE) por defecto y la hipovitaminosis A (1,2). La coincidencia de ambas, agudiza enfermedades crónicas transmisibles y no transmisibles (3).

La MPE es considerada la causa más frecuente de afectación del sistema inmune y la deficiencia de vitamina A se ha relacionado con procesos inflamatorios previos a enfermedades infecciosas. Ambas deficiencias afectan mayormente la inmunidad mediada por células, y causan

atrofia de los tejidos linfoides primarios y periféricos, fundamentalmente los regiones de linfocitos T. Los retinoides modulan la proliferación y diferenciación celular, de células epiteliales y el descubrimiento de sus receptores nucleares ha puesto en evidencia su papel inmunomodulador sobre células del sistema inmune, especializadas y más recientemente sobre células mononucleares, como típicos mensajeros intracelulares de los mecanismos de señales (4,5).

En las últimas décadas se ha profundizado en el estudio de las citocinas, teniendo en cuenta su importante papel como mediadores, involucrados en los mecanismos de transducción de señales entre las células del sistema inmune y otras células especializadas en tejidos, a través de las cuales regulan y

activan la respuesta inmune aferente y eferente (6,7). Recientemente se ha reconocido el término malnutrición inducida por citocinas, teniendo en cuenta no sólo que la síntesis y la actividad biológica de las citocinas se afectan por cambios en la disponibilidad de macro y micronutrientes, sino porque pueden ser responsables del desgaste metabólico que a su vez, puede incidir negativamente sobre el estado nutricional (8). Este término se ha asociado particularmente con las citocinas proinflamatorias (Interleucina 1, Interleucina 6 y Factor de Necrosis Tumoral) (9,10), que por su actividad pleiotrópica y reguladora actúan de forma intensa y duradera ocasionando un desgaste severo al organismo, alterando el metabolismo y con ello, el estado nutricional (11). Los aspectos relacionados con la respuesta inflamatoria requieren de un buen control que garantice el proceso de homeostasis que permita la continuidad de las funciones vitales del huésped (12).

Estudios clínicos y modelos experimentales han descrito afectaciones en la síntesis y capacidad de respuesta de Interleucina 1 (IL-1) en la MPE (13-16). Muñoz y col. (17) describieron una disminución de la producción de Factor de Necrosis Tumoral (FNT) en niños marásmicos y Schattner y col. (18) observaron esta misma afectación en jóvenes con anorexia nerviosa.

Investigaciones recientes han mostrado que la deficiencia de vitamina A sólo incide negativamente en la liberación de citocinas tipo 1 (Interferón  $\gamma$ , Interleucina 2) a través de la inhibición de la actividad de la Protein Kinasa C (19).

A partir de 1989, la disponibilidad de alimentos y la situación alimentaria de Cuba generó afectaciones del estado nutricional de la población con relación a varios nutrientes, entre ellos proteínas y vitamina A. Los resultados de los estudios realizados durante la epidemia de neuropatía epidémica en 1993 reflejaron niveles de ingestión de estos nutrientes inferiores al 50% de las recomendaciones nutricionales vigentes en el país (20).

Fue objetivo de este trabajo, estudiar los niveles de expresión génica de Interleucina 1 y relacionarlos con indicadores del estado nutricional y de la respuesta inmune en un biomodelo diseñado con niveles de ingestión de proteínas y vitamina A semejantes a los encontrados en la población cubana durante la neuropatía epidémica.

## MATERIALES Y METODOS

Para la realización del biomodelo se diseñaron y prepararon las dietas tomando una concentración de proteínas en las dietas deficientes inferior a la recomendación de la AOAC (21) (3%) y en el caso de la vitamina A se seleccionaron como referencia los niveles de ingestión registrados en el estudio de casos y controles de neuropatía

epidémica en la Isla de la Juventud por Gay y col. (20), los cuales representan sólo la tercera parte de los niveles requeridos para este indicador. Las dietas fueron preparadas isocalóricas, de acuerdo a las recomendaciones de la AOAC (21) (Tabla 1).

TABLA 1  
Resultados de la composición centesimal  
y de vitamina A de las dietas experimentales

Composición	Dieta Control	Dieta DP	Dieta DA	Dieta DAP
Proteínas (%) (21)	17,03	3,23	16,85	3,31
Grasas (%) (21)	7,8	8,02	8,04	7,94
Humedad (%) (22)	11,4	12,4	11,59	11,55
Cenizas (%) (21)	4,48	3,07	4,32	3,64
Fibra dietética (%) (21)	6,2	6,9	5,7	6,0
Carbohidratos (%)*	53,07	66,38	53,5	67,56
Energía bruta (23) kcal/g	4,3	4,1	4,4	4,2
Energía metabolizable (kcal/g)	3,70	3,68	3,73	3,73
Vitamina A (UI/g) (24)	20,4	20,2	7,2	8,6

\* Los carbohidratos se calcularon por diferencia del resto de los componentes determinados según las recomendaciones vigentes

DIETA DP- Dieta deficiente en proteínas

DIETA DA- Dieta deficiente en vitamina A

DIETA DAP- Dieta deficiente en proteínas y vitamina A

El diseño del biomodelo se realizó de acuerdo a las indicaciones de la Universidad de las Naciones Unidas (UNU) para las investigaciones con animales de laboratorio. Se utilizaron ratas Sprague Dowley macho, en desarrollo, de un peso corporal inicial de  $241 \pm 11$  g obtenidas del Centro para Animales de Laboratorio (CENPALAB) de un mismo día de parición, procedentes de una colonia bien nutrida y bajo estricta supervisión veterinaria. Los animales fueron distribuidos en 7 grupos experimentales: Control (C), Deficiente en Proteínas (DP), Deficiente en Vitamina A (DA), Deficiente de Proteínas y Vitamina A (DAP), Alimentación Pareada de Deficiente en Proteínas (PP), Alimentación Pareada de Deficiente en Vitamina A (PA), Alimentación Pareada de Deficiente en Proteínas y Vitamina A (PAP).

Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas individuales en un ambiente controlado de temperatura (23-26 °C), con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas y con una humedad relativa controlada entre 50-60%. Bajo estas condiciones fueron sometidas a un proceso de adaptación durante 1 mes antes de iniciar el biomodelo.

El peso de los animales fue controlado al inicio, 2 veces por semana y al inicio y final del balance de nitrógeno. Los grupos de Alimentación Pareada consumieron la dieta

utilizada para el grupo control, pero en las cantidades consumidas por los grupos tratados, teniendo en cuenta las posibles diferencias de ingestión en los grupos con dietas deficientes.

El agua se le suministró ad libitum y la dieta ingerida fue controlada y registrada diariamente durante 28 días. El último día de ensayo, las ratas fueron desangradas por vía femoral, después de 12 horas de ayuno, para la extracción de las muestras biológicas que se describen a continuación.

Para evaluar la expresión de Interleucina 1 $\beta$  a partir de linfocitos de placas de Peyer se extrajo el intestino de las ratas previamente anestesiadas en el momento del sacrificio según el método descrito por Mengheri y col. (25) y conservadas a -70°C hasta el momento de ser procesadas. Las muestras fueron procesadas según Chomozinski y Sacchi (26), con el objetivo de lograr la extracción del ARN. Posteriormente fueron leídas a 260 nm en Espectrofotómetro UNICAM para ajustar su concentración a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y sometidas a un proceso de reverso transcripción de acuerdo a la metodología descrita (27). La reverso transcriptasa utilizada fue obtenida del virus de la leucemia murina Moloney.

La amplificación de los fragmentos de ARNm transcritos se realizó en Minicycler (TM) (MJ Research) y se incubó a 96°C por 1 minuto (desnaturalización), 30 ciclos a 63°C por 1 minuto (hibridización) y 30 ciclos a 73°C por 1 minuto y 30 segundos (polimerización). Finalmente se colocaron a 4°C para su posterior evaluación y cuantificación. Como control interno se utilizó la amplificación de un fragmento de 702 pb del gen que codifica para la enzima Gliceroldehído 3' fosfato deshidrogenasa (GADPH) en ratas. La secuencia de su iniciador es 5'-GCC ATC AAC GAC CCC TTC AT-3'<sub>(S)</sub> y 5'-CGC CTG CTT CAC CAC CTT CT-3'<sub>(A)</sub> (28). La secuencia del iniciador para Interleucina 1 $\beta$  de rata es 5'-GAA GCT GTC GCA GCT ACC TAT GTC T-3'<sub>(S)</sub> y 5'-CTC TGC TTG AGA GGT GCT GAT GTA C-3'<sub>(A)</sub> (25). Para detectar posibles contaminaciones se utilizó como control negativo, una muestra sin ARN. Las muestras amplificadas fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en tampón Tris-Borato, pH=8. Las bandas de interés fueron visualizadas utilizando tinción con plata (Promega). En cada corrida se colocó un patrón de peso molecular (Promega) como referencia de las bandas visualizadas. Este patrón utilizado tiene un rango entre 1500 y 100 pares de bases. El análisis densitométrico de las bandas permitió una cuantificación relativa de la expresión génica de la citocina en estudio, a través del cálculo individual de la relación entre la banda relacionada correspondiente a la Interleucina 1 y su control interno (GADPH). Para lograr este objetivo la lectura de los geles se realizó en un sistema BIO-RAD GS-700 con el programa Imaging Molecular Analysis.

Muestras de sangre fueron utilizadas para realizar el estudio hematológico (29) que incluyó hemoglobina, hematocrito y conteo leucocítico total y diferencial. Los sueros se conservaron a -70°C y fueron utilizados para las determinaciones de: Complemento Hemolítico Total (CH50) por adaptación de la microtécnica del Manual de Laboratorio de Diagnóstico Inmunológico (30) y su automatización en el equipo SUMA pR-521; proteínas totales realizadas por modificación del método Biuret (31) que permitió también automatización en el SUMA pR-521 a través de un micrométodo previamente estandarizado; electroforesis de proteínas en acetato de celulosa (32); y vitamina A por cromatografía líquida de alta resolución según Thurham y col (33).

En el momento del sacrificio fueron extraídos el timo, el bazo y el hígado de cada rata y se pesaron para determinar la relación de cada órgano analizado con el peso corporal del animal (peso relativo). Para la evaluación microscópica se tomaron muestras de los tejidos a evaluar de todos los animales en estudio, las cuales fueron fijadas en formaldehído tamponado al 10%, incluidos en parafina, seccionados a 5  $\mu\text{m}$  y coloreadas con hematoxilina y eosina para luego ser observadas en un microscopio de luz Axiolab (Carl Zeiss).

Todos los indicadores son el resultado del procesamiento de las muestras biológicas por duplicado o triplicado.

El análisis estadístico se realizó a través del programa Tonystat diseñado en la Facultad de Biología, Universidad de la Habana (34). De ellos se obtuvieron medias y desviaciones estándar. Las diferencias encontradas se obtuvieron por la prueba de Kruskal-Wallis y las intergrupos a través de la prueba de Student-Newman-Keuls.

El indicador incremento de peso fue evaluado sometiendo los valores a una transformación previa, teniendo en cuenta que su comportamiento en algunos grupos era decreciente y por tanto sus valores negativos. Se correlacionó este indicador con los pesos iniciales y se comprobó que su distribución era normal y las varianzas de los grupos, homogénea. Con el objetivo de eliminar las posibles diferencias en el peso inicial en los tratamientos realizados se realizó un Análisis de Covarianza de clasificación simple que permitió trabajar con las medias ajustadas y una prueba de comparación múltiple de Duncan con el objetivo de detectar las diferencias intergrupos para este indicador.

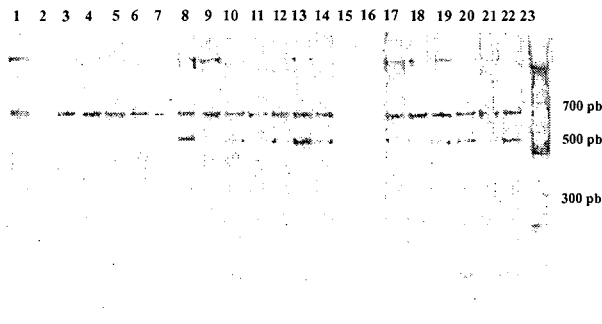
El comportamiento de los grupos en el estudio histológico se evaluó analizando los resultados por la prueba G para tablas de contingencia R x C y en los casos de tablas (2x2) fue utilizada una prueba exacta de Fisher para comprobar las diferencias obtenidas.

El nivel de significación utilizado fue del 95%, con excepción de los indicadores albúmina la fracción  $\alpha$  y vitamina A, en los cuales se obtuvo un nivel de significación del 99%.

## RESULTADOS

La electroforesis visualiza las bandas correspondientes a la expresión génica de GADPH (banda superior) y de la Interleucina 1 (banda inferior) (grupos Control, grupo DP y grupo PP) (Figura 1).

FIGURA 1  
Electroforesis en gel de poliacrilamida para fragmentos amplificados de Interleucina 1



Pocillo 1-7 Grupo DP  
Pocillo 8-14 Grupo PP  
Pocillo 15-16 Control negativo  
Pocillo 17-22 Grupo control  
Pocillo 23 Marcador de peso molecular

La expresión génica de Interleucina 1 se muestra mediante el cálculo de la relación de los resultados densitométricos obtenidos con relación a la banda del control interno (Tabla 2). Es importante destacar que el grupo DP mostró una disminución de su expresión y el grupo DAP por el contrario, la incrementó, siendo en ambos casos de forma significativa.

TABLA 2  
Resultados del análisis densitométrico de la expresión génica de interleucina 1 realizada por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa ( $X \pm DS$ )

Grupos (n=7)	Indice
Control (n=6)	0,77 $\pm$ 0,19b
DP	0,57 $\pm$ 0,08c
DA	0,80 $\pm$ 0,16 b
DAP	1,07 $\pm$ 0,06 a
PP	0,76 $\pm$ 0,14 b
PA	0,81 $\pm$ 0,10 b
PAP	0,78 $\pm$ 0,18 b

Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente; las letras se encuentran ordenadas de forma decreciente. Las diferencias encontradas son para  $p < 0,05$ .

Los niveles de ingestión de los grupos DP y DAP mostraron una disminución significativa, que se correspondió con sus respectivos de alimentación pareada. El grupo DA no mostró alteraciones en sus ingestas promedio (Tabla 3).

TABLA 3  
Niveles de ingestión diaria corporal de dieta e incremento de peso en ratas alimentadas durante 28 días con dietas deficientes en proteínas y vitamina A ( $X \pm DS$ )

Grupos (n=7)	Dieta ingerida (g)	Incremento de peso (g)
Control (n=6)	14,38 $\pm$ 0,88a	93,0 $\pm$ 14,5 a b
DP	11,67 $\pm$ 0,96b	-24,5 $\pm$ 4,38 c
DA	14,74 $\pm$ 0,24 a	102,1 $\pm$ 5,75 a
DAP	10,31 $\pm$ 1,33 c	-45,3 $\pm$ 7,45 f
PP	11,79 $\pm$ 1,13 b	48,9 $\pm$ 7,71 c
PA	14,72 $\pm$ 0,25 a	92,9 $\pm$ 11,09 b
PAP	9,86 $\pm$ 1,80 c	39,2 $\pm$ 4,55 d

Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente; las letras se encuentran ordenadas de forma decreciente. Las diferencias encontradas son para  $p < 0,05$ .

En el caso de los grupos DP y DAP existió una relación entre la disminución de la ingestión y el indicador incremento de peso, lo cual fue más evidente en el grupo DAP. Los grupos de alimentación pareada PP y PAP con una ingestión similar a los grupos tratados no mostraron la disminución de peso manifiesta en los grupos DP y DAP, pero su incremento de peso no fue comparable con el grupo control. El grupo DA mostró un comportamiento del peso corporal comparable con el grupo control y con su grupo de alimentación pareada, por lo que la dieta deficiente en vitamina A en los niveles ensayados no provocó afectaciones en el peso corporal. Estos resultados aparecen en la Tabla 3.

Los tejidos evaluados no mostraron macroalteraciones cuando se evaluaron sus pesos relativos, con excepción de los bazo en el grupo DAP, que mostraron diferencias significativas con relación al grupo control y a su grupo de alimentación pareada (PAP). Sin embargo, los resultados de la evaluación microscópica realizada en estos tejidos indican lesiones degenerativas de tipo ligera en hígado, fundamentalmente metamorfosis grasa en los grupos DP y DAP. Es de interés señalar además que en el caso de los órganos linfoides evaluados se observaron señales de atrofia cortical en el bazo y pérdida de células linfoides en bazo y timo, mayormente en el grupo DAP. Las alteraciones microscópicas detectadas en estos tejidos no indicaron afectaciones severas en ninguno de los grupos evaluados.

TABLA 4  
Indicadores bioquímicos relacionados con el metabolismo y niveles de vitamina A sérica en ratas con dietas deficientes en proteínas y vitamina A ( $X \pm DS$ )

Grupos	Proteínas totales (g/L)	Albumina (%)	$\alpha$ (%)	Vitamina A ( $\mu\text{g/mL}$ )
Control	69,26 $\pm$ 5,46 a n=5	52,22 $\pm$ 2,83 a n=5	22,56 $\pm$ 0,60 c n=5	11,4 $\pm$ 0,67b n=5
DP	56,86 $\pm$ 2,41b n=5	46,88 $\pm$ 1,32 b n=5	24,04 $\pm$ 1,73 b n=5	11,6 $\pm$ 0,64 b n=5
DA	66,11 $\pm$ 4,50 b n=7	55,80 $\pm$ 2,99 a n=5	26,16 $\pm$ 2,90 a n=5	13,1 $\pm$ 0,50 a n=5
DAP	58,74 $\pm$ 6,98 b n=5	47,22 $\pm$ 2,52 b n=5	25,54 $\pm$ 1,23 a n=5	8,8 $\pm$ 0,94 c n=4
PP	65,0 $\pm$ 5,15 b n=5	51,64 $\pm$ 5,74 a n=7	23,37 $\pm$ 3,51 c n=7	11,6 $\pm$ 1,6 b n=7
PA	63,22 $\pm$ 6,51b n=6	53,9 $\pm$ 3,81 a n=7	22,17 $\pm$ 3,96 c n=7	11,9 $\pm$ 0,97 b n=6
PAP	75,85 $\pm$ 8,41a n=6	54,36 $\pm$ 1,40 a n=7	22,73 $\pm$ 1,22 c n=7	10,9 $\pm$ 1,44 b n=6

Las letras se encuentran ordenadas de forma decreciente; letras diferentes en la misma columna difieren significativamente. Los indicadores proteínas totales, albúmina, fracción proteica  $\alpha$  y vitamina A se evaluaron para  $p < 0,01$ .

Las proteínas totales manifestaron una disminución significativa en los grupos DP y DAP con relación al grupo control y sólo en el caso del grupo DAP significativamente diferente a su grupo de alimentación pareada, lo que pudiera indicar que las proteínas séricas totales se afectan por la combinación de ambas deficiencias (Tabla 4). La albúmina resultó ser un indicador más sensible en el caso de los grupos tratados DP y DAP, pues mostró diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) al compararse con el grupo control y con los de alimentación pareada respectivamente. La fracción  $\alpha$  de las globulinas séricas mostró un incremento significativo en los grupos DP, DA y DAP con relación al control y a sus grupos de alimentación pareada; las fracciones  $\beta$  y  $\gamma$  no mostraron alteraciones en el modelo realizado. Los resultados obtenidos en las proteínas totales, la albúmina y la fracción  $\alpha$  se obtuvieron con un nivel de significación de 99%.

El grupo DA manifestó un incremento significativo de los niveles de vitamina A sérica, a pesar de estar expuesto a una dieta con deficiencia moderada de esta vitamina por 28 días. Sin embargo el grupo DAP que estuvo expuesto a ambas deficiencias disminuyó sus niveles circulantes de vitamina A.

La Tabla 5 contiene los resultados de indicadores relacionados con la respuesta inmune en los diferentes grupos de ensayo.

TABLA 5  
Indicadores inmunológicos evaluados en ratas alimentadas con dietas deficientes en proteínas y vitamina A ( $X \pm DS$ )

	Leucocitos ( $10^9/L$ )	Linfocitos (%)	PMN (%)	CH50 (U)
Control	6,560 $\pm$ 1,45 a n=5	0,788 $\pm$ 0,04 a n=5	0,178 $\pm$ 0,03 d n=5	17,8 $\pm$ 0,98 c n=5
DP	4,080 $\pm$ 1,07 d n=5	0,62 $\pm$ 0,03 c n=5	0,33 $\pm$ 0,02 c n=5	16,9 $\pm$ 0,73c n=4
DA	4,550 $\pm$ 0,37 d n=6	0,60 $\pm$ 0,03 c n=6	0,378 $\pm$ 0,02 b n=6	21,6 $\pm$ 1,73b n=5
DAP	3,040 $\pm$ 0,68 e n=5	0,514 $\pm$ 0,03 d n=5	0,458 $\pm$ 0,03 a n=5	23,7 $\pm$ 0,75a n=4
PP	5,400 $\pm$ 0,77 c n=6	0,758 $\pm$ 0,04 b n=6	0,202 $\pm$ 0,03 d n=6	19,7 $\pm$ 1,68c n=5
PA	5,633 $\pm$ 0,42 b n=6	0,737 $\pm$ 0,04 b n=6	0,225 $\pm$ 0,05 d n=6	19,8 $\pm$ 1,76c n=6
PAP	5,457 $\pm$ 0,73 c n=7	0,737 $\pm$ 0,04 b n=7	0,236 $\pm$ 0,03 d n=7	19,2 $\pm$ 2,60 c n=6

CH50 Complemento Hemolítico Total; PMN- Leucocitos Polimorfonucleares. Las letras se encuentran ordenadas de forma decreciente; letras diferentes en la misma columna difieren significativamente. Las diferencias encontradas son para  $p < 0,05$ .

El conteo total de leucocitos disminuyó significativamente en los tres grupos tratados, tanto con relación al control como con los grupos pareados, aunque sólo se encuentran en el rango patológico para ratas, los valores encontrados en el grupo DAP. Los grupos de alimentación pareada mostraron diferencias con el grupo control. En el caso del conteo diferencial se observó linfopenia y neutrofilia con variaciones significativas con el grupo control y con los de alimentación pareada, en los tres grupos tratados. Los valores del conteo de linfocitos en los grupos DP y DAP y los neutrófilos en el grupo DAP se encontraron fuera del rango normal para ratas con este tiempo de desarrollo. Los valores de hemoglobina y hematocrito no mostraron afectaciones significativas.

Los grupos DA y DAP mostraron un incremento significativo del CH50 con relación al control y a sus grupos de alimentación pareada, aspecto que puede relacionarse con otros indicadores de la inflamación expuestos anteriormente como los leucocitos polimorfonucleares y la fracción  $\alpha$  de las proteínas plasmáticas. Es válido destacar que el incremento del CH50 es mayor de forma significativa en el grupo DAP que en el grupo DP.

## DISCUSION

La deficiencia de proteínas en los niveles ensayados (grupo DP), provocó una disminución de la expresión génica de IL-1. La afectación de las citocinas y de la IL-1 en

particular frente a cambios en el suministro de macro y micronutrientes se ha descrito previamente (13-16).

Las placas de Peyer, como órganos linfoides periféricos son responsables de la respuesta inmune inicial gastrointestinal y se ha comprobado en biomodelos que la IL-1 juega un papel fundamental en el proceso de diferenciación de células intestinales (25), por lo que los resultados obtenidos en este grupo comprueban que la mucosa intestinal responde de forma sensible a las deficiencias de nutrientes, y de proteínas en particular.

Los resultados obtenidos con la IL-1 en el grupo DP se relacionan en primer lugar con una disminución significativa del peso corporal que a su vez se corresponde con una ingestión deficiente que repercute en indicadores del metabolismo y recambio proteico, así como, en las afectaciones encontradas de forma significativa en hígado, que indican el inicio de un proceso degenerativo típico de malnutrición proteico energética.

Se ha descrito la existencia de una relación entre malnutrición proteica y la inflamación que puede conducir a enfermedades crónicas a través de anorexia y catabolismo generados como consecuencia de la activación de indicadores de la inflamación (35), aspecto que no llega a ocurrir en el grupo DP.

Por otra parte, la deficiencia de vitamina A no provocó afectaciones en la expresión génica de IL-1, pero sin embargo, al combinarse ambas deficiencias en el grupo DAP se produjo una estimulación significativa de la expresión de IL-1 en las placas de Peyer.

La respuesta inflamatoria es el resultado de mecanismos de señales que son capaces de activar células y mediadores distribuidos ampliamente por el organismo (12). La IL-1 y otras citocinas proinflamatorias estimulan centros del hipotálamo y generan la activación de la respuesta inmune. Estos cambios requieren de proteínas, lípidos y micronutrientes en tejidos periféricos, que a su vez son la fuente necesaria para lograr el buen funcionamiento del sistema inmune y la recuperación de los tejidos como consecuencia de la acción de moléculas oxidantes (12,36). Para ello el organismo dispone de una reserva de aminoácidos libres que son los precursores para la síntesis de proteínas en el hígado, dentro de las cuales se encuentran las de transporte como la albúmina, apolipoproteínas, prealbúmina, proteínas de unión al retinol, muchas de las cuales son consideradas como proteínas de fase aguda y reparadoras de tejidos (37).

En el grupo DAP muestra el efecto negativo del consumo de dietas deficientes en proteínas sobre la ingestión de alimentos y su eficiencia de utilización en términos de crecimiento corporal, que si bien es cierto no se manifiesta de forma macroscópica en los tejidos evaluados, si se observa en señales ligeras de atrofia de timo y de bazo y en señales degenerativas del hígado como la metamorfosis grasa, que

se plantea puede tener como causa a la insuficiente movilización de triglicéridos hacia los tejidos por disminución en la síntesis de apolipoproteína B<sup>1</sup>. Estos aspectos pudieran relacionarse además con niveles disminuidos de proteínas séricas y de albúmina en particular, como se observa en el grupo DAP.

En condiciones fisiológicas, el hígado es responsable de sintetizar proteínas plasmáticas en concentraciones normales, pero en la respuesta inflamatoria su perfil anabólico se modifica para priorizar la síntesis de fase aguda (12), sin afectar los niveles de proteínas como hemoglobina que adquiere prioridad de acuerdo con sus funciones en el organismo (1), aspecto que se refleja en el grupo DAP, en el cual no mostró afectaciones significativas de la hemoglobina, pero si un incremento de la fracción  $\alpha$ , dentro de la cual se encuentran la mayor parte de las proteínas de fase aguda de la inflamación.

Los cambios en los niveles plasmáticos de proteínas de fase aguda se deben a modificaciones en la transcripción génica y se encuentran mediados por promotores que se unen a factores nucleares activados por citocinas. Estudios in vitro con citocinas proinflamatorias plantean que a su vez, las citocinas liberadas regulan, estimulan y redistribuyen el metabolismo proteico. En células de hepatoma, la IL-1 y el FNT  $\alpha$  inducen la disminución de albúmina sérica y el incremento de la síntesis de proteínas de fase aguda (38).

La vitamina A y los compuestos con actividad de retinol requieren de la presencia de proteínas transportadoras para poder llevar a cabo sus funciones en el organismo (39). Estas proteínas forman parte de una superfamilia, encargadas de la movilización y transporte de metabolitos relacionados con la vitamina A, a través de receptores celulares (40). Niveles bajos de vitamina A provocan desajustes en la síntesis hepática de proteína de unión al retinol, por lo que una ingestión deficiente puede provocar una disminución de su síntesis que impide su movilización hacia los tejidos (41).

Los valores de vitamina A al finalizar el ensayo muestran un incremento significativo en el grupo DA, que pudiera ser la consecuencia de su movilización hepática. Sin embargo, el grupo DAP mostró una reducción significativa relacionada quizás con la deficiencia proteica, que impide su movilización hacia los tejidos. Ello podría ser la causa de una carencia de vitamina A y compuestos relacionados en la periferia y con ello de su acción antioxidante, que pudiera provocar la estimulación de indicadores de la inflamación. El incremento de la expresión génica de IL-1 puede relacionarse con otros indicadores como el complemento que constituye uno de los mecanismos iniciales estimulados en la fase aguda y con la neutrofilia observada en este grupo que manifiesta una activación de los mecanismos inespecíficos de la respuesta inmune en el hospedero.

La leucopenia y linfopenia en el grupo DAP se

encontraron fuera del rango normal para ratas con este tiempo de desarrollo, lo que pudiera relacionarse con la atrofia observada en órganos linfoides primarios y periféricos, así como con una movilización deficiente de vitamina A hacia los tejidos.

El concepto de inmunoestimulación comprende una cadena de eventos muy bien integrados, que provocan entre otros, la respuesta de fase aguda frente a estímulos bien establecidos (42). Las citocinas proinflamatorias y la Interleucina 1 en particular, dirigen todos los cambios metabólicos que caracterizan el proceso inflamatorio. Modelos experimentales en ratas, a las cuales se les ha administrado IL-1 o TNF  $\alpha$  reproducen la neutrofilia (43).

Los resultados obtenidos en la expresión génica de Interleucina 1 en el grupo DAP, con una estimulación significativa en relación con la neutrofilia, con los valores incrementados de CH50 y con el incremento de la fracción  $\alpha$  de las proteínas séricas, que pudiera ser provocado por el efecto activador de la Interleucina 1, sugieren una posible activación de la inflamación a través de un desajuste entre proteínas y vitamina A en los niveles moderados ensayados, que inciden en la movilización de vitamina A hacia los tejidos. Esto provoca una afectación en tejidos periféricos que pudiera inducir la activación de indicadores relacionados con la inflamación y por lo tanto el incremento del catabolismo a expensas de la movilización de proteínas estructurales como las del músculo esquelético, con una mayor utilización del nitrógeno endógeno y una mayor recirculación de fuentes de nitrógeno como la urea.

Esta posible estimulación inflamatoria ha sido reconocida como infección "inaparente", ante la ausencia evidente de procesos infecciosos y con la elevación de uno o más indicadores de la inflamación como el conteo de leucocitos y proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, en poblaciones de Guatemala con afectaciones en el crecimiento en el estudio de Solomons y col. (44).

Los modelos experimentales en los estudios nutricionales muestran enormes ventajas al permitir el control de una serie de factores como ambiente, tipo de dieta y caracterización exhaustiva de los efectos provocados según el modelo diseñado, pero sus resultados no pueden extrapolarse totalmente al humano, debido a las reconocidas diferencias interespecies. Aunque las deficiencias ensayadas se encuentran dentro de niveles moderados y fueron probadas durante un período corto, estos resultados obligan a profundizar en los mecanismos fisiológicos involucrados, para poder dirigir medidas para la prevención de enfermedades crónicas transmisibles o no, y con ello incrementar la calidad de vida.

Los resultados ofrecen la posibilidad de profundizar y definir los mecanismos involucrados con la deficiencia de ambos nutrientes y la expresión de citocinas, con el fin entre

otros de utilizarlas como posibles marcadores para la detección de afectaciones subclínicas del sistema inmune provocadas por deficiencias nutricionales.

### AGRADECIMIENTOS

A los técnicos Caridad Arocha, Ma. de los Angeles Sánchez, Elsa Alonso y Yeimi Mora, del Dpto. Bioquímica y Fisiología del Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos que participaron en la marcha experimental de este trabajo. Al Lic. Alejandro Silva por su revisión crítica del trabajo y por sus sabios consejos.

### REFERENCIAS

1. Waterloo JC. Malnutrición Proteico-Energética. Edit. Washington D.C.OPS:E.Arnold;1996 Cap. 1:1-10.
2. Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 1997;66(2):460S-63S.
3. Santos JI. Nutrition, infection and immunocompetence. *Infect Dis Clin North* 1994;8:243-67.
4. Bollag W & Holdener EE. Retinoids in cancer prevention and therapy. *Ann Oncol* 1992;3(7):513-26.
5. Vahlquist A. Role of Retinoids in normal and diseased skin. En: *Vitamin A in Health and disease*. Edit R.Blomhoff, Ed.Marcel Dekker Inc, New York. Basel. Hong Kong. 1994: 365-424.
6. Roitt IM, Brostoff J & Male DK. Inmunología. 3a Ed. Ed. L.Gamlin. Edit. Científico Técnica. 1993 Cap. 1, pp 1-12.
7. Meydani SN. Dietary modulation of cytokine production and biologic function. *Nutr Rev* 1990;48:361-69.
8. Grimble RF. Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice. *New Horiz* 1994;2:175-85.
9. Beisel WR. Herman Award Lecture, 1995 : Infection-induced malnutrition-from cholera to cytokines. *Am J Clin Nutr* 1995;62:813-9.
10. Moldawer LL & Copeland EM. Proinflammatory cytokines, nutritional support and the cachexia syndrome: Interactions and therapeutic options. *Cancer* 1997;79:1828-39.
11. Grimble RF. Interaction between nutrients, pro-inflammatory cytokines and inflammation. *Clin Sci* 1996;91:121-30.
12. Steel DM & Whitehead AS. The mayor acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today* 1994; 23(2):81-7.
13. Bhaskaram P & Swakumar B. Interleukin 1 in malnutrition. *Arch Dis Child* 1986;61 (2):182-85.
14. Movat HZ. Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1: Role in acute inflammation and microvascular injury. *J Lab Clin* 1987;110:668-73.
15. Sullivan JS, Kilpatrick L & Costarino AT. Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis. *J Pediatr* 1992;120:510-5.
16. Dinarello CA & Wolf SM. The role of interleukin 1 in disease. *N Engl J Med* 1993;328: 106-15.

17. Muñoz C, Arévalo M, López M & Shlesinger L. Impaired interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor production in protein-calorie malnutrition. *Nutr Res* 1986;14:347-52.
18. Schattner A, Steinbock M, Tepper R, Schonfeld A, Vaisman N & Hahn T. Tumor Necrosis Factor production and cell-mediated immunity in anorexia nervosa. *Clin Exp Immunol* 1990;79:62-6.
19. Frankeuburg S, Wang X & Milner Y. Vitamin A inhibits cytokines produced by type 1 lymphocytes in vitro. *Cell Immunol* 1998;185(1):75-81.
20. Gay J, Porrata C, Hernández M, Clúa AM, Argüelles JM, Cabrera A & Silva LC. Dietary factors in epidemic neuropathy on the Isle of Youth, Cuba. *Bull PAHO* 1995; 29(1):25-36.
21. AOAC. *Methods of the Association of Official Analytical Chemist*, 15 Ed. Ed. Kenneth Helrich. Edit Association of Official Analytical Chemist, Virginia, U.S.A. 92303,1990:777.
22. NC 86-04/ 1989: Productos farináceos. Cereales y sus productos: Determinación del contenido de humedad.
23. Canolty NL & Koong LJ. Evaluating protein quality by estimating energy deposition coefficients. *J Nutr* 1978;108:1555-8.
24. Pino D & García R. Método de cromatografía en fase reversa por HPLC para la determinación de vitamina A en pienso. *Revista CENIC (Supl)*, 1995;45-56.
25. Mengheri E, Ciapponi L, Vignolini F & Nobili F. Cytokine gene expression in intestine of rat during the postnatal development period increased IL-1 expression at weaning. *Life Sci*. 1996;59(15):1227-36.
26. Chomozynski P & Sacci N. Single-step method of RNA Isolation by AGPC. Extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-59.
27. Maniatis (Eds). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Sambrook. Fritsch. Maniatis 2ª Ed. Tomo III, Cap. 7 1989;7.1-7-87
28. Cui L. Induction of nitric oxide synthase in rat intestine by Interleukin 1 $\alpha$  may explain diarrhea associated with zinc deficiency. *J Nutr* 1997;127:1729-36.
29. International Committee for Standardization in Haematology: Recommendation measurement of serum iron in human blood. *Br J Haematol*.1978;38:291.
30. Harbeck RJ & Giclas PC. *Diagnostic Immunology, Laboratory Manual*, Raven Press, 1991:21-27.
31. Gornall AG, Bardawill CS & David MM. *J Biol Chem* 1949;177:751-3.
32. Zukas PA. *Proteinograma electroforético*. Edit. Colmegna. Ed. PA Zukas, Buenos Aires, Argentina 1973:13-27.
33. Thurham DI, Smith E & Flora PS. Concurrent Liquid-Chromatographic Assay of Retinol,  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Carotene,  $\alpha$ -Carotene, Lycopene and  $\beta$ -Cryptoxanthin in plasma with Tocopherol Acetate as Internal Standard. *Clin Chem* 1988;34:377-81.
34. Sigarroa A. *Manual de Clases Prácticas de Biometría y Diseño Experimental*. Programa del Sistema Estadístico TONYSTAT. Ed. Pueblo y Educación, 1987 pp 154 .
35. Cederholm T, Wretling B, Hellström K, Anderson B, Engström L, Brismar K, Scheymus A, Forslund J & Palmblad J. Enhanced generation on interleukin 1  $\beta$  and 6 may contribute to the cachexia of chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1997;65:876-82.
36. Beisel WR. *Nutritional Biochemistry and Metabolism*. 2a. Ed. Edit. M.C. Linder. Edit. Appleton & Lange, 1991 Chap.17, pp 506-42.
37. Kurpad AV , Soares MJ, Sikhar RV , Reeds PJ & Fjeld CR. A study of acute phase and transport protein synthesis in undernourished men using simulated infection and uniformly  $^{15}\text{N}$  labelled spirulina platensis. Co-ordinated research programme in application of stable isotope tracer methods to studies of aminoacid, protein and energy metabolism in malnourished populations of developing countries. Report of the First Research co.ordination meeting, IAEA, Boston, U.S.A. 1993:9-19.
38. Koj A. Initiation of acute response and synthesis of cytokines. *Biochem Biophys Acta* 1996;1317(2):84-94.
39. Blomhoff HK & Smeland EB. Overview of Vitamin A Metabolism and Function. In: *Vitamin A in Health and disease*. Edit R.Blomhoff, Ed.Marcel Dekker Inc, New York, 1994:1-35.
40. Sivaprasadarao A & Findlay JBC. The Retinol-Binding Protein Superfamily En: *Vitamin A in Health and Disease*. Ed. R. Blomhoff. Maecel Dekker Inc., New York. Basel. Hong Kong, 1994: 87-118.
41. Haas DW, Raffanti S, Chytil F, Lakey D & Alls S Impaired hepatic synthesis in AIDS patients with low vitamin A levels. *J Infect Dis* 1995;172(4):1167-8.
42. Klasing KC & Johnstone BJ. Monokines in growth and development. *Foult Sci* 1991; 70:1781-9.
43. Fischer E, Marano MA & Barber AE. Comparison between effects of Il-1 alpha administration and sublethal endotoxemia in primates. *Am J Physiol* 1991;261:442-52.
44. Solomons NW, Mazariegos M, Vettorazzi C, Valdez C, Grazioso C, Romero-Abal ME & B Caballero. Growth faltering, protein metabolism and immunostimulation: new speculations on the nature of the relationship with notes from observations and analysis in Guatemala. Co-ordinated research programme in application of stable isotope tracer methods to studies of aminoacid, protein and energy metabolism in malnourished populations of developing countries. Report of the Firsrt Research co.ordination meeting, IAEA, Boston, U.S.A. 1993,115-26.

Recibido: 12-12-2000

Aceptado: 05-12-2001

## Estimación de proteína potencialmente utilizable en fórmulas infantiles de inicio para neonatos prematuros y de término

María J. Binaghi, Andrea Baroni, Carola Greco, Patricia A. Ronayne de Ferrer, Mirta Valencia

Cátedra de Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires-Argentina

**RESUMEN.** Se analizaron 16 fórmulas de inicio con base en leche de vaca con el objetivo de calcular su aporte de "proteína verdadera" y evaluar la digestibilidad proteica "in vitro" para estimar los niveles de proteína potencialmente utilizable. Diez de ellas estaban destinadas a neonatos nacidos a término: 7 con una relación caseína: proteínas del suero 40: 60 (leches adaptadas) y 3 con una relación 80:20 (no adaptadas); las 6 restantes (adaptadas) eran fórmulas para prematuros. El nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl. La proteína verdadera se calculó como (N total - N no proteico) x 6,25. El NNP se determinó en la fracción soluble, luego de precipitar las proteínas con ácido tricloroacético al 24% y posterior centrifugación. La digestibilidad se evaluó por digestión con pepsina y pancreatina, con base en el incremento del N no proteico después de la acción enzimática. Los límites de proteína verdadera fueron de 1,3 a 2,3 g/dL y el de N no proteico se encontró entre 4,5 y 13,7%. La digestibilidad proteica osciló entre 59,0 y 92,5% observándose una tendencia inversa con el contenido proteico. Considerando el aporte de proteína «verdadera» así como la proporción que sería digerida, la totalidad de las fórmulas destinadas a prematuros y el 60% de las de término contendrían niveles de proteína potencialmente utilizable por debajo de los valores recomendados. Estas observaciones constituyen un llamado de atención, a pesar de que el método «in vitro» representa sólo una aproximación a los procesos fisiológicos; sin embargo, podría resultar útil para evaluar la intensidad de los tratamientos térmicos a los que han sido sometidas estas fórmulas. Por otra parte, dado que el NNP permite estimar la proteína verdadera que aportan las fórmulas, sería aconsejable incluir en el rótulo el % de NNP o el contenido de proteína verdadera.

**Palabras clave:** Fórmulas infantiles, contenido de proteínas, digestibilidad proteica, proteína utilizable, nitrógeno no proteico.

**SUMMARY.** Estimation of potentially available protein in starting formulas for term and preterm infants. Sixteen milk-based starting formulas were analyzed with the aim of calculating their "true protein" content and assessing "in vitro" protein digestibility, in order to estimate levels of potentially available protein. Ten of them were designed for term infants: 7 had a casein:whey protein ratio 40:60 (adapted formulas) and 3 a ratio 80:20 (non-adapted); the 6 remaining formulas (all adapted) were for preterm infants. Nitrogen was determined by the Kjeldahl method. True protein was calculated as (total N- non-protein N) x 6.25. NPN was determined in the soluble fraction, after protein precipitation with 24% trichloroacetic acid and centrifugation. Digestibility was assessed by digestion with pepsin and pancreatin, and defined as the increase in non-protein N after enzymatic digestion. Values for true protein were from 1.3 to 2.3 g/dL and for non protein N, from 4.5 to 13.7%. Digestibility values varied between 59.0 and 92.5%; an inverse trend was observed between protein digestibility and protein content. Considering both the "true protein" levels and their digested proportions, all preterm and 60% of the term formulas would present potentially available amounts below those recommended. These observations constitute an alert, even though this method of assessing "in vitro" protein digestibility represents only an approximation to physiological processes; however, it could be useful in order to evaluate the intensity of the heat treatments to which these formulas were subjected. On the other hand, since NPN allows the estimation of the true protein provided by the formulas, either its percentage or the true protein content could be included on the label.

**Key words:** Infant formulas, protein content, protein digestibility, available protein, non-protein nitrogen.

### INTRODUCCION

El período neonatal es uno de los más vulnerables de la vida, particularmente con respecto a la nutrición. El neonato pasa por etapas de desarrollo y maduración muy rápidas, lo que resulta en una elevada demanda de nutrientes específicos. Ello implica que las necesidades nutricionales son críticas, ya que ciertas deficiencias pueden ocasionar efectos prolongados e incluso irreversibles en el crecimiento y desarrollo del niño y aún en la fisiología del adulto (1).

La lactancia natural es la forma óptima de alimentación del recién nacido. La leche humana constituye una fuente económica e importante de nutrientes esenciales en la etapa neonatal, y es este uno de los motivos por lo que se la considera como el alimento ideal para el bebé (1-4). Sin embargo, en algunos casos la leche materna es reemplazada o suplementada con un sucedáneo. Dado que en los primeros meses de vida el lactante depende para su alimentación de un único alimento que debe necesariamente cubrir todos sus requerimientos, éste debe ser un alimento cuidadosamente

diseñado para tal propósito (5). Existen diversos tipos de fórmulas según la fase de la lactancia; durante los primeros 6 meses se utilizan las de "inicio", las que en su mayoría son «adaptadas», es decir, con una relación caseína/proteínas del suero (CAS/PS) 40:60, mientras que a partir de esa edad se utilizan las de "seguimiento" o "continuación", con una relación CAS/PS 80:20. Por otra parte, existen fórmulas especiales para prematuros, las que habitualmente presentan un mayor contenido de proteínas (relación CAS/PS 40:60) y de minerales y también una mayor densidad energética (6).

Uno de los aspectos fundamentales para lograr un crecimiento y desarrollo normal del niño, está relacionado con un aporte adecuado de proteínas, tanto en cantidad como en calidad. Hasta ahora, no se le ha dado una gran importancia al contenido de nitrógeno no proteico (NNP) de las fórmulas infantiles (FI), el que puede diferir en gran medida según el tipo de fórmula y el método de elaboración (6,7). Existen tres formas diferentes para desmineralizar el suero lácteo bovino: intercambio iónico, electrodiálisis y ultrafiltración. Los sueros obtenidos por ultrafiltración tienen un menor contenido de NNP, ya que una parte se elimina a través de la membrana utilizada para remover los minerales y la lactosa (6). Teniendo en cuenta que el cálculo de la proteína total se realiza habitualmente con base en el contenido de nitrógeno total (NT), sin descontar el NNP, estas diferencias incidirían en el contenido de «proteína verdadera» que es la realmente utilizada por el lactante para su crecimiento y desarrollo. La leche humana tiene un contenido de NNP de alrededor de 25 a 30% del NT. El componente mayoritario es la urea, que representa aproximadamente un 50% del NNP en la leche humana y entre 27 y 56% en las fórmulas infantiles (7). Otra diferencia la constituye el hecho de que la fracción de aminoácidos libres en las fórmulas representa un 10% o menos de la presente en la leche humana (8). En ésta, parte del NNP está representado por componentes que intervienen en distintas funciones biológicas del neonato, como son la taurina, la carnitina y los nucleótidos (9-11). Tanto la taurina como la carnitina están presentes en todas las fórmulas de inicio, mientras que la adición de nucleótidos aún no es generalizada (12).

Publicaciones recientes (13) sugieren que algunas fórmulas con base en leche de vaca (especialmente los concentrados líquidos) podrían ser limitantes en su aporte de aminoácidos esenciales. Sin embargo, debido a que habitualmente las fórmulas infantiles tienen un contenido proteico más elevado que la leche humana, estas deficiencias se compensan y no se traducen en signos clínicos.

Recientemente se ha propuesto una disminución en los niveles proteicos de las fórmulas infantiles (14, 15); sin embargo, debería tenerse en cuenta el posible efecto de los tratamientos térmicos aplicados durante su elaboración sobre la calidad y la digestibilidad proteicas (16-19).

Por lo expuesto, los objetivos del presente trabajo son la medición del contenido de NT y NNP en las fórmulas para lactantes con el fin de calcular los niveles de "proteína verdadera" y la evaluación de la digestibilidad proteica "in vitro" con el fin de estimar los niveles de proteína potencialmente utilizable.

## MATERIALES Y METODOS

Se analizaron 16 FI de inicio existentes en el mercado, elaboradas con leche de vaca. Diez de ellas estaban destinadas a neonatos nacidos a término, de las cuales 7 tenían una relación caseína: proteínas del suero 40: 60 (leches adaptadas) y 3 una relación 80:20 (no adaptadas). Las 6 restantes (todas adaptadas) estaban destinadas a neonatos prematuros. Las muestras fueron adquiridas en supermercados o farmacias. Fueron muestreadas por lo menos dos unidades por marca.

Sobre estas FI se determinaron el NT y NNP por el método de Kjeldahl (20), previa reconstitución según rótulo. El NNP se determinó en la fracción soluble, luego de precipitar las proteínas con igual volumen de ácido tricloroacético (TCA) al 24% y posterior centrifugación a 10000xg durante 20 minutos a 4°C (7). La proteína verdadera se calculó como la diferencia entre el NT y el NNP, multiplicada por 6,25 como factor de conversión. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado.

Para la medición de la digestibilidad «in vitro» se usaron, por duplicado, 10 ml de muestra reconstituida según las instrucciones del rótulo. El pH se ajustó a 4,5 con HCl 1M y se agregaron 0,25 mL de solución de pepsina (36mg/mL de HCl 0.1N) de modo de obtener una relación enzima/sustrato entre 1/15 y 1/20, dependiendo del contenido proteico de las FI. Las muestras se incubaron en baño de agua a 37°C con agitación, protegidas de la luz, durante 30 minutos. Luego el pH se ajustó gradualmente a 7,0 con bicarbonato de sodio 0,5M y se agregaron 2,5 mL de solución de pancreatina (0,4g/100mL de bicarbonato de sodio 0,1M). Se continuó la incubación a 37°C con agitación durante una hora. Las fórmulas digeridas se colocaron luego en un baño de agua hirviendo durante 4 minutos para inactivar las enzimas. Se tomaron dos alícuotas de cada duplicado. La digestibilidad se calculó como el incremento de NNP observado después de la digestión con pepsina y pancreatina (17). Las enzimas utilizadas fueron provistas por Sigma Co. (USA).

El análisis estadístico se realizó por ANOVA; cuando las diferencias fueron significativas, al nivel del 95%, se realizó el test a posteriori de Tukey-Kramer.

## RESULTADOS

Los valores de proteína bruta fueron similares o superiores

a los que figuraban en el rótulo, excepto en 3 fórmulas (2 de ellas de prematuros) (Tabla 1). Los valores de proteína verdadera encontrados fueron de 1,3 a 1,7 g/dL para las FI destinadas a neonatos de término (adaptadas y no adaptadas) y de 1,7 a 2,3 g/dL para las de prematuros.

**TABLA 1**  
Niveles de proteína y nitrógeno no proteico en fórmulas infantiles (media  $\pm$  desvío estándar)<sup>§</sup>

Fórmulas	Proteína rótulo (g/dL)	Proteína bruta* (g/dL)	Proteína verdadera** (g/dL)	% NNP
<b>Prematuros</b>				
1	2,2	1,89 $\pm$ 0,01a	1,69 $\pm$ 0,03a	11,8 $\pm$ 0,5de
2	2,4	2,09 $\pm$ 0,01ab	1,91 $\pm$ 0,02ab	8,8 $\pm$ 0,4bc
3	2,3	2,33 $\pm$ 0,01ab	2,08 $\pm$ 0,02ab	10,9 $\pm$ 0,7cd
4	1,9	2,06 $\pm$ 0,25ab	1,78 $\pm$ 0,25a	13,8 $\pm$ 1,3e
5	2,4	2,41 $\pm$ 0,04b	2,30 $\pm$ 0,03b	4,7 $\pm$ 0,2a
6	2,0	2,16 $\pm$ 0,12ab	1,99 $\pm$ 0,10ab	7,8 $\pm$ 0,1b
<b>Térm. Adaptadas</b>				
1	1,8	1,84 $\pm$ 0,03d	1,64 $\pm$ 0,04cd	10,8 $\pm$ 0,8bc
2	1,5	1,41 $\pm$ 0,01a	1,33 $\pm$ 0,02a	4,9 $\pm$ 0,4a
3	1,5	1,53 $\pm$ 0,01ab	1,42 $\pm$ 0,01ab	7,2 $\pm$ 0,8ab
4	1,5	1,68 $\pm$ 0,06d	1,52 $\pm$ 0,08bc	9,2 $\pm$ 1,1bc
5	1,5	1,61 $\pm$ 0,03bc	1,45 $\pm$ 0,02ab	10,3 $\pm$ 0,8bc
6	1,5	1,72 $\pm$ 0,03d	1,51 $\pm$ 0,04bc	12,2 $\pm$ 1,1c
7	1,4	1,79 $\pm$ 0,03d	1,58 $\pm$ 0,06bc	11,6 $\pm$ 1,6c
<b>Térm. No Adaptadas</b>				
1	1,5	1,53 $\pm$ 0,09a	1,47 $\pm$ 0,09a	4,5 $\pm$ 0,1a
2	1,7	1,84 $\pm$ 0,12a	1,70 $\pm$ 0,14a	7,9 $\pm$ 0,8b
3	1,6	1,66 $\pm$ 0,10a	1,54 $\pm$ 0,01a	7,0 $\pm$ 0,4b

<sup>§</sup> Diferentes superíndices dentro de cada grupo indican diferencias significativas (p<0,05)

\*NT x 6,25

\*\* (NT-NNP) x 6,25

Se encontró una proporción variable de NNP con límites comprendidos entre 4,9 y 12,2 % del NT para las FI adaptadas, entre 4,5 y 7,9 % para las no adaptadas y entre 4,7 y 13,8 % para las FI de prematuros (Tabla 1). Se observaron diferencias significativas tanto en los contenidos de proteína bruta y verdadera como en los porcentajes de NNP entre distintas fórmulas dentro de cada categoría.

Los valores de digestibilidad proteica oscilaron entre 59,0 y 87,5% en las FI de prematuros y entre 69,4 y 92,5% en las de término (Tabla 2), con diferencias significativas dentro de cada subgrupo. Se observó una tendencia inversa con el contenido proteico de las fórmulas. Considerando los niveles de proteína «verdadera» (descontando el NNP inicial de la fórmula), 2 de las 6 fórmulas para prematuros presentaron valores por debajo de los recomendados (2,25 g/100 Kcal) (21) (Tabla 2). Teniendo en cuenta, además, la proporción que sería digerida, ninguna de las fórmulas para prematuros

superaba dicho valor. En las fórmulas para neonatos de término, se observó que 6 de las 10 que se analizaron contendrían menos de 1,80 g/100 Kcal de proteínas utilizables, mínimo recomendado para este tipo de fórmulas (22) (Tabla 2).

**TABLA 2**  
Niveles de proteína verdadera (P.V.), porcentaje de digestibilidad y proteína digerida "in vitro" (P.DIG.) en fórmulas infantiles (media + desvío estándar)<sup>§</sup>

Formulas	P.V. (g/100 Kcal)	Digestibilidad (%)	P.DIG. (g/100 Kcal)
<b>Prematuros</b>			
1	2,12 $\pm$ 0,03a	87,5 $\pm$ 2,5d	1,86 $\pm$ 0,03ab
2	2,34 $\pm$ 0,02ab	74,1 $\pm$ 2,5bc	1,74 $\pm$ 0,02ab
3	2,62 $\pm$ 0,02ab	59,0 $\pm$ 0,1a	1,55 $\pm$ 0,01a
4	2,22 $\pm$ 0,31a	79,5 $\pm$ 1,1cd	1,78 $\pm$ 0,25ab
5	2,84 $\pm$ 0,04b	68,2 $\pm$ 0,8b	1,93 $\pm$ 0,03ab
6	2,86 $\pm$ 0,14b	74,9 $\pm$ 3,3bc	2,14 $\pm$ 0,11b
<b>Térm. Adaptadas</b>			
1	2,22 $\pm$ 0,05bcd	77,6 $\pm$ 0,5abc	1,78 $\pm$ 0,04bc
2	1,94 $\pm$ 0,03a	92,5 $\pm$ 0,4c	1,85 $\pm$ 0,02bc
3	2,09 $\pm$ 0,02abc	90,5 $\pm$ 1,8bc	1,92 $\pm$ 0,02c
4	2,24 $\pm$ 0,11bcd	74,8 $\pm$ 3,5a	1,71 $\pm$ 0,08ab
5	2,00 $\pm$ 0,02ab	75,2 $\pm$ 8,8ab	1,55 $\pm$ 0,02a
6	2,20 $\pm$ 0,06abcd	69,4 $\pm$ 4,9a	1,56 $\pm$ 0,04a
7	2,42 $\pm$ 0,08d	72,0 $\pm$ 2,9a	1,72 $\pm$ 0,06ab
<b>Térm. No Adaptadas</b>			
1	2,20 $\pm$ 0,12a	85,1 $\pm$ 0,1b	1,87 $\pm$ 0,11ab
2	2,54 $\pm$ 0,21a	87,8 $\pm$ 0,8b	2,23 $\pm$ 0,18b
3	2,14 $\pm$ 0,14a	73,7 $\pm$ 2,8a	1,58 $\pm$ 0,11a

<sup>§</sup> Diferentes superíndices dentro de cada grupo indican diferencias significativas (p<0,05).

## DISCUSION

Existen discrepancias en la literatura sobre el grado de utilización del NNP por parte del lactante. Algunos autores incluyen en el cálculo del N disponible una parte de la urea y consideran que el resto del NNP estaría constituido en su totalidad por péptidos y aminoácidos (23), mientras que otros autores recomiendan excluir totalmente el NNP del cálculo de la "proteína verdadera" hasta que se conozca mejor su destino metabólico (7,24). En un informe reciente (25), un Comité de Expertos reunido por el LSRO (Life Sciences Research Office) recomienda referir el contenido mínimo de proteínas de las FI en términos de proteína verdadera calculada como (alfa-amino N x 6,25), y resalta que la inclusión de fuentes de NNP en el cálculo de dicho mínimo podría resultar en una cantidad insuficiente para sostener un crecimiento normal.

Fomon y col. (23) estudiaron los niveles de seguridad en la relación proteínas-energía en lactantes alimentados con

fórmulas elaboradas a base de leche de vaca. Concluyeron que hasta los 55 días de edad los valores de proteína verdadera oscilarían entre 1,56 y 2,14 g/100 Kcal, e irían disminuyendo con la edad. En un estudio más reciente (26), estos autores indicaron que niveles de 1,7 g/100 Kcal parecían resultar adecuados en cuanto a las ingestas proteicas pero no seguros, ya que llevaron a un mayor incremento de peso y, probablemente, a una mayor acumulación de grasa corporal. En el presente estudio, la mayor parte de las fórmulas superaban el nivel de 2,14 g/100 Kcal; los valores hallados para las fórmulas de término estuvieron entre 1,94 y 2,54 g/100 Kcal, mientras que las de prematuros variaron entre 2,12 y 2,86 g/100 Kcal (Tabla 2).

Sin embargo, dado que todas las fórmulas son expuestas a diversos tratamientos térmicos durante su elaboración, pueden producirse interacciones entre las proteínas y otros nutrientes que llevan a una disminución en la disponibilidad de aminoácidos y en la digestibilidad proteica. En experiencias con ratas, Sarwar y col. (13) encontraron valores de digestibilidad entre 87 y 97% para fórmulas a base de leche de vaca. Rudloff y Lönnerdal (17), por su parte, al medir digestibilidad "in vitro", también en fórmulas a base de leche de vaca, encontraron valores más bajos, entre 69 y 84%, un rango similar al observado en este estudio en las FI de término (Tabla 2).

Si se consideran los porcentajes de NNP (Tabla 1) y de digestibilidad (Tabla 2) encontrados en las fórmulas estudiadas, la totalidad de las destinadas a prematuros tendría niveles de proteína utilizable por debajo de los valores recomendados de 2,25 g/100 Kcal y un 60% de las FI para neonatos de término aportarían menos de 1,80 g/100 Kcal de proteína potencialmente utilizables (21,22).

Estas últimas observaciones podrían considerarse especulativas, ya que el método de digestibilidad «in vitro» representa una aproximación a los procesos fisiológicos, y no toma en cuenta diversas condiciones "in vivo", tales como las características del fluido intestinal, la motilidad y las peptidasas mucosales implicadas en la digestión, entre otros factores (27). Sin embargo, constituyen un llamado de atención en relación a la real utilización de las proteínas por parte de los lactantes. Por ello, la evaluación de la digestibilidad proteica sería una herramienta útil para asegurar que los niveles de seguridad en la ingesta proteica no se vean afectados por los tratamientos térmicos a los que han sido sometidas estas fórmulas. Además, sería útil incluir en el rótulo el % de NNP o el contenido de proteína verdadera que aportan las fórmulas infantiles.

#### AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo está enmarcado dentro de los Proyectos PICT-04735, UBACYT AB26 y B062.

#### REFERENCIAS

- Hambraeus L. Proprietary milk versus human breast milk in infant feeding. A critical appraisal from the nutritional point of view. *Pediatr Clin North Am* 1977;24:17-36.
- Ogra PL, Greene LH. Human milk and breast feeding: an update on the state of the art. *Pediatr Res* 1982;16:266-271.
- O'Donnell AM. Alimentación del niño en América Latina. *Arch Latinoamer Nutr* 1988;38:685-704.
- Informe de la Reunión, Taller celebrado en la isla Margarita, 15-20 de marzo de 1994. La alimentación del niño menor de 6 años en América Latina. Bases para el desarrollo de guías de Alimentación. *Arch Latinoamer Nutr* 1994;44:176-198.
- Ronayne de Ferrer, PA. Pasado y presente en el diseño de fórmulas infantiles. *Arch Latinoamer Nutr* 1995;45:265-73.
- Raiha NCR. Protein quantity and whey-casein ratio in infant formulas. En: *Protein and Non-Protein Nitrogen in Human Milk*. Atkinson SA, Lonnerdal B, Eds. Boca Raton, Fla, CRC Press Inc., 1989, p. 138-144.
- Donovan SM, Lonnerdal B. Non-protein nitrogen and true protein in infant formula. *Acta Paediatr Scand* 1989;78:497-504.
- Agostoni C, Carratu B, Boniglia C, Riva E, Sanzini E. Free amino acid content in standard infant formulas: comparison with human milk. *J Am Coll Nutr* 2000;19:434-438.
- Gaull GE. Taurine in pediatric nutrition: review and update. *Pediatrics* 1989;83:433-442.
- Carver JD, B Pimentel, WI Cox & LA Barness. Dietary nucleotide effects upon immune function in infants. *Pediatrics* 1991;88:359-363.
- Uauy R. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. *J Nutr* 1994;124:157S-159S.
- Ronayne de Ferrer PA. Fórmulas infantiles: Perfil de aminoácidos y nitrógeno no proteico. *Rev. Soc. Arg. Nutr* 1997;8:13-17.
- Sarwar G, Peace RW, Botting HG. Differences in protein digestibility and quality of liquid concentrate and powder forms of milk-based infant formulas fed to rats. *Am J Clin Nutr* 1989;49:806-13.
- Janas LM, Picciano MF, Hatch TF. Indices of protein metabolism in term infants fed either human milk or formulas with reduced protein concentration and various whey/casein ratios. *J Pediatr* 1987;100:838-48.
- Lonnerdal B, Chen C-L. Effects of protein level and ratio on infant growth, plasma amino acids and serum trace elements. *Acta Paediatr Scand* 1990;79:257-65.
- Rudloff S, Lonnerdal B. Solubility and digestibility of milk proteins in infant formulas exposed to different heat treatments. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992;15:25-33.
- Hanning RM, B Paes, Atkinson SA. Protein metabolism and growth of term infants in response to a reduced-protein, 40:60 whey:casein formula with added tryptophan. *Am J Clin Nutr* 1992;56:1004-1011.
- Rudloff S, Kunz C. Protein and nonprotein nitrogen components in human milk, bovine milk, and infant formula: quantitative and qualitative aspects in infant nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:328-344.

19. Viadel B, Alegría A, Farré R, Abellán P, Romero F. Amino acid profile of milk-based infant formulas. *Int J Food Sci Nutr* 2000;51:367-372.
20. Official methods of analysis of the A.O.A.C. 13<sup>th</sup> Edition; Washington D.C., USA, Association of Official Analytical Chemists: 14, 1980.
21. ESPGAN Committee on Nutrition of the Preterm Infant. Nutrition and feeding of preterm infants. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1987;336:1-14.
22. ESPGAN Committee on Nutrition: Guidelines on infant nutrition. I. Recommendation for the composition of an adapted formula. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1977;262:1-20.
23. Fomon SJ, Ziegler EE, Nelson SE, Frantz JA. What is the safe protein-energy ratio for infant formulas? *Am J Clin Nutr* 1995;62:358-63.
24. Lonnerdal B, Hernell O. Effects of feeding ultrahigh-temperature (UHT)-treated infant formula with different protein concentrations or powdered formula, as compared with breast-feeding, on plasma amino acids, hematology, and trace element status. *Am J Clin Nutr* 1998;68:350-356.
25. LSRO Report: Assessment of Nutrient Requirements for Infant Formulas. V. Protein. *J Nutr* 1998;128:2110S-2114S.
26. Fomon SJ, Ziegler EE, Nelson SE, Rogers RR, Frantz JA. Infant formula with protein-energy ratio of 1.7 g/100 kcal is adequate but may not be safe. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;28:495-501.
27. Lindberg T, Engberg S, Sjöberg LS, Lönnerdal B. In vitro digestion of proteins in human milk fortifiers and in preterm formula. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;27:30-6.

Recibido: 23-04-2001

Aceptado: 29-11-2001

## Determinação do consumo de alimentos fontes de vitamina A por gestantes, utilizando o formulário dietético simplificado (FDS)

*Betzabeth Slater Villar, Maria José Roncada*

Universidade de São Paulo, Brasil

**RESUMO.** O “International Vitamin A Consultative Group” (IVACG) desenvolveu um instrumento de pesquisa, com base no consumo de alimentos fontes de vitamina A, para categorizar uma população em grupos de Alto, Moderado e Baixo risco de deficiência de consumo desse nutriente. Este instrumento foi testado numa população de 91 mulheres grávidas que freqüentaram o serviço de atendimento pré-natal do Centro de Saúde pertencente à FSP/USP. O instrumento recebe o nome de Formulário Dietético Simplificado (FDS) e está composto por um questionário Recordatório de 24 h - Índice de Consumo (IC), e outro de freqüência de consumo - Padrão Usual de Consumo (PUC). Através do FDS, identificou-se, como alimentos de maior consumo diário e semanal o leite fluido, tomate, alface, margarina e banana, todos pertencentes aos grupos de baixo e moderado teor de vitamina A. Para assinalar as categorias de risco, tomou-se como base as necessidades dietéticas propostas pela Food and Agriculture Organization of the United Nation - (FAO/OMS -1991) e, como ponto de corte, o consumo inferior a 2/3 da quantidade recomendada. Os dados obtidos através do FDS mostraram que mais de 50% das entrevistadas encontravam-se nas categorias de Alto e Moderado risco de deficiência de consumo de vitamina A. Na análise estatística dos dados, encontrou-se uma correlação estatisticamente significativa  $r = 0,50$  ( $p < 0,005$ ) e um valor Kappa ponderado de ( $k_w = 0,207$ ), o que sugere que o FDS é um instrumento útil e se mostra razoável para categorizar risco de deficiência de vitamina A em grupos com inadequado consumo de alimentos fontes deste nutriente. Entretanto, os resultados evidenciam que para avaliar corretamente o consumo de vitamina A seriam necessários um número maior de aplicações do método IC.

**Palavras chaves:** Inquéritos dietético, formulário dietético simplificado, gravidez, deficiência de vitamina A.

**SUMMARY.** Determination of vitamin A consumption from food sources for pregnant women by using of a simplified dietary assessment (SDA). The International Vitamin A Consultative Group (IVACG) developed a research instrument based on consumption of vitamin-A food sources to classify populations into groups of high, moderate and low deficiency risk in the consumption of this nutrient. The instrument was tested on a population of 91 pregnant women who attended prenatal health care service run by School of Public Health of the University of São Paulo. Such instrument was termed Simplified Dietary Assessment (SDA) and it is comprised of a 24-hour dietary recall- Consumption Index (CI) and consumption frequency questionnaire- Usual Food Pattern (UFP). SDA pointed out the most consumed daily and weekly foods as being milk in liquid form, tomato, lettuce, margarine and banana. All these food sources belong to groups of low and moderate vitamin A content. Assignment in risk groups was based on the recommended dietary intake proposed by the Food and Agriculture Organization of the United Nations - (FAO/OMS - 1991) and two-thirds of the recommended intake was considered the cutting off point. According to data obtained by the SDA, more than 50% of the population interviewed was assigned to the High and Moderate risk groups for deficiency in vitamin A intake. Statistical analysis of the data revealed a significant statistical correlation  $r = 0,50$  ( $p > 0,005$ ) and a weighted Kappa value of ( $k_w = 0,207$ ), which suggests that the SDA is a useful instrument and is a reasonable means for risk assignment of vitamin A deficiency among groups with inadequate levels of intake of foods as sources of this nutrient. However, the results suggest that in order to evaluate vitamin A intake appropriately, a larger number of applications of the IC questionnaires would be required.

**Key words:** Dietary inquiries, simplified dietary assessment, pregnancy, vitamin-A deficiency.

### INTRODUÇÃO

Até o final da gravidez, um adequado estado nutricional com relação à ingestão de vitamina A e a uma dieta balanceada são importantes para garantir a transferência de nutrientes para o feto, preparando-o para o nascimento e o período de amamentação. A vitamina A cumpre um papel

altamente importante durante períodos de proliferação e crescimento celular como os da gravidez, lactação, primeira infância e infância.(1).

Sabe-se que condições temporárias ou prolongadas de consumo deficiente de vitamina A podem conduzir à xerofthalmia, que é a expressão máxima da hipovitaminose A. No Brasil, a hipovitaminose A surge como um problema

de Saúde Pública entre outras endemias nutricionais, porém as informações disponíveis não proporcionam um conhecimento fidedigno da magnitude e características do problema no País como um todo. Além disso, os principais estudos foram realizados em pré-escolares utilizando inquéritos bioquímicos para avaliar o estado nutricional relativo a vitamina A.

Estudo realizado em gestantes sem manifestações clínicas detectáveis e que faziam seu pré-natal em um centro de saúde-escola na cidade de São Paulo (2), verificou que, apenas no 3º e 9º mês de gestação foram encontrados 15% de resultados abaixo da normalidade ( $< 0,70 \mu\text{mol/L}$ ). Neste estudo, realizou-se um total de 799 análises para vitamina A, por meio de inquérito bioquímico,

Outro estudo avaliou o nível plasmático de 116 gestantes presentes nas salas de pré-parto de uma instituição beneficente que estivessem na 36ª semana de gravidez e não apresentassem patologia própria ou associada, diagnosticada antes do parto. O nível médio de vitamina A encontrado foi de  $0,84 \mu\text{mol/L}$  e foram estudadas outras variáveis, como idade e número de gestações (3).

Rondó e colaboradores (4), em um hospital de Campinas SP, avaliaram as concentrações de vitamina A no sangue materno e no cordão umbilical dos recém-nascidos de 356 mães que geraram bebês com retardo de crescimento intra-uterino (RCIU) e de 356 mães que geraram bebês adequados para idade gestacional (AIG). Nesta pesquisa foram encontradas porcentagens similares de mães com bebês com RCIU (1,1%) e mães com bebês com AIG (1,4%), sendo que ambos os grupos apresentaram baixas concentrações de vitamina A, sugerindo que a deficiência de vitamina A é, provavelmente, uma consequência e não uma causa do RCIU.

Quanto ao consumo alimentar de vitamina A no Brasil, há apenas um inquérito realizado em todo o País (5), o qual verificou que a porcentagem de ingestão de vitamina A foi inferior às necessidades em todas as regiões do País, com exceção das áreas rural e urbana da Região I (Rio de Janeiro) e da área metropolitana de Salvador. No Estado de São Paulo, foi verificado que 83% da população estudada em 11 localidades não atingiram as recomendações de consumo (6,7). As pesquisas aqui citadas utilizaram, no primeiro caso, o método de pesagem direta dos alimentos por 7 dias, e, nos dois últimos, o mesmo método em combinação com recordatórios de 24 horas. Em todos os casos as metodologias referidas são de difícil execução, e um tanto invasivas.

As informações obtidas através dos inquéritos alimentares podem ser consideradas indicadores indiretos do estado nutricional de vitamina A dos indivíduos. É freqüente encontrar, em condições de hipovitaminose A e xerofthalmia, altas prevalências de consumo inadequado de vitamina A e carotenóides. Por isso, ao abordar o inquérito alimentar, deve-se levar em consideração: a freqüência de consumo de

alimentos fontes de vitamina A; o conteúdo de vitamina A expresso em Equivalentes de Retinol - ER nas tabelas de composição de alimentos; a faixa etária da população que está sendo examinada e a porcentagem de crianças com aleitamento materno. Além disso, deve-se considerar as flutuações sazonais e o viés do método dietético empregado, a fim de que os dados obtidos possam ser usados para classificar áreas/populações potencialmente expostas ao risco de consumo deficiente de vitamina A e para que tais dados sejam respaldados por critérios biológicos que confirmem o diagnóstico de um problema de Saúde Pública (8,9).

Com base no consumo inadequado de fontes de vitamina A, o "International Vitamin A Consultative Group" (IVACG)(10) desenvolveu um instrumento que categoriza uma dada população em grupos de Alto, Moderado e Baixo risco de deficiência de consumo desse nutriente. Este instrumento, de rápida aplicação, baixo custo e pouco invasivo, recebe o nome de Formulário Dietético Simplificado (FDS) e já foi testado em outros países com bons resultados (11-13).

Apesar da importância, em nosso meio poucos são os estudos que avaliam o consumo de vitamina A em gestantes (14,15). Tendo em vista esse fato e a existência dessa nova metodologia, os objetivos deste estudo foram adaptar o novo método proposto pelo IVACG às condições locais e ao grupo alvo (gestantes), identificar seu consumo de alimentos fontes de vitamina A e avaliar a concordância entre os métodos que compõem o FDS.

## MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Centro de Saúde Geraldo Paula Souza (CS), pertencente à Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. As pacientes foram entrevistadas durante as consultas do pré-natal durante o primeiro semestre do ano de 1996. A coleta de dados foi realizada por uma nutricionista devidamente treinada e durante os meses de maio e junho.

Para o cálculo da amostra foi necessário conhecer o número de atendimentos mensais dos consultórios de obstetrícia do CS e valor da prevalência de inadequação de consumo de vitamina A.(16,7). A população estudada foi constituída por 91 mulheres grávidas saudáveis, com idades compreendidas entre 19 e 40 anos, que freqüentaram espontaneamente o citado CS, não importando se a consulta era realizada pela primeira vez ou se tratava-se de retorno.

O método requereu, para sua adaptação :

1. a definição de alimento - fonte (17) ;
2. a identificação de todas as fontes potenciais de vitamina A e carotenóides existentes no Estado de São Paulo, seguindo 3 critérios para a seleção (18,19,6);
3. o cálculo do conteúdo de Equivalentes de Retinol (ER)

em  $\mu\text{g}$ , dos alimentos-fontes locais, usando resultados de inúmeros autores, permitindo, assim, categorizar os alimentos em *Alto*, *Moderado* e *Baixo* teor de vitamina A (20)

4. a determinação do tamanho da porção pequena, tomando-se como base a lista de equivalência de pesos e medidas de alimentos de um estudo de base populacional realizado em um município da cidade de São Paulo (21), e as informações de trabalhos realizados em laboratórios de técnica dietética (22,23). Uma vez determinada a quantidade referente à porção pequena de alimento, foi assumido o conceito do IVACG, segundo o qual as porções média e grande são respectivamente 2 e 4 vezes maiores que a pequena (10).

5. Considerando-se todos esses critérios, convém frisar que foram incluídos como alimento- fonte aqueles que contribuem com mais de 50 ER em uma porção pequena, e também os que comumente integram a dieta habitual da população.

Com base nas informações anteriores foi desenvolvida a estrutura do FDS, que consta de um questionário Recordatório de 24horas - Índice de Consumo (IC), e outro de frequência de consumo - Padrão Usual de Consumo (PUC), que permitem conhecer o consumo de alimentos fontes de vitamina A. Para cada uma das partes foram realizados os seguintes procedimentos:

#### Índice de consumo - IC

O IC foi calculado de tal forma que todas as quantidades são convertidas a um equivalente de uma porção pequena de alimento de escore BAIXO de vitamina A (menos de 50  $\mu\text{g}$  ER/100g). Assumindo que as quantidades médias e grandes são duas e quatro vezes maiores, a frequência de consumo foi multiplicada por 2 e 4, respectivamente, para converter as porções em um número equivalente à porção pequena. Para os alimentos com Moderado (300 ER) e Alto (>500 ER) teor de vitamina A foi necessário multiplicar estes valores pelos fatores aleatórios 6 (para Moderado) e 10 (para Alto) de maneira a compensar o nível alto de ER (10).

Para assinalar a *Categoria de Risco*, foram tomadas como base as recomendações de necessidades dietéticas FAO/OMS (24), que preconiza o consumo de 600  $\mu\text{g}$ ER/dia. Teoricamente, a ingestão do nível recomendado situa o indivíduo na categoria de *baixo risco*, enquanto o consumo de menos de 2/3 (400  $\mu\text{g}$  ER) da quantidade recomendada colocaria a pessoa na condição de *alto risco* à deficiência. Neste sentido, os valores relativos da categoria de risco são obtidos da divisão da recomendação pela quantidade mínima de ER contida em uma porção pequena de alimento (50  $\mu\text{g}$  ER). Considerando este valor como ponto de corte, foram estabelecidas as seguintes categorias que definem os níveis de risco.

#### Padrão usual de consumo (PUC)

Para se chegar ao PUC, o primeiro passo é determinar os escores. Estes são resultado da escolha de um fator de peso para os consumos Diário, Semanal e Mensal dos alimentos com escore de vitamina A Alto. O peso 1 corresponde a 50  $\mu\text{g}$  ER. Se o período em consideração é de 1 mês, então a ingestão diária de uma categoria Alta de alimentos corresponde a 30 dias x 5 pontos = 150 pontos. Assumindo-se que o consumo semanal significa a ingestão de 1 a 3 vezes, o escore deve ser calculado com base em 3 dias por semana. Isto é, 3 dias x 4 semanas x 5 pontos = 60 pontos. Da mesma forma, assumindo-se que o consumo mensal envolve a ingestão de 3 vezes, o escore deve ser calculado da seguinte maneira: 3 dias x 5 pontos = 15 pontos. Estes fatores de peso são, então, ajustados aproximadamente de cima para baixo, correspondendo 3/5 à categoria de alimentos com teor moderado e 1/5 para a categoria de baixo teor. O passo seguinte será executar a soma dos escores do PUC dos três níveis de vitamina A para se definir o índice de risco. Os níveis de risco para o escore PUC nas gestantes são baseados no nível recomendado de ingestão de vitamina A a necessidade basal (10).

Como elemento auxiliar para as gestantes estimarem com maior precisão as porções dos alimentos consumidos, foi utilizado um álbum com 126 fotografias representando 42 alimentos e preparações, que ilustram os tamanhos das porções pequena, média e grande.

Depois de realizadas as entrevistas, elaborou-se um banco de dados o qual foi analisado pelo programa EpiInfo versão 6.0. Foram calculadas medidas de tendência central, coeficiente de correlação de Spearman, e análise de variância para avaliar as diferenças entre as médias obtidas. Para o cálculo da concordância por meio do Teste Kappa ponderado usou-se o programa EPIDAT.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A idade média das gestantes foi de 25,5 anos ( $DP \pm 5,03$ ), com valor mínimo de 19 anos e máximo de 40 anos, encontrando-se um valor mediano de 24 anos.

A maioria das gestantes (45,1%) frequentou o CS a partir do segundo semestre de gestação e 49,5% no terceiro trimestre; somente 5,5% o frequentaram no primeiro trimestre. Quanto aos níveis de instrução, apenas 3,3% delas não possuíam educação formal, embora aproximadamente 60% não completaram o curso primário. Com relação à ocupação, observou-se que 52,8% são donas de casa, 25,3% empregadas domésticas, 13,1% constituídas por assalariadas com atividades diversas, 5,5% profissionais autônomas e 3,3% estudantes.

A Tabela 1 mostra os valores médios de consumo total de vitamina A, segundo os trimestres de gestação, obtidos através do IC. A média total de consumo de vitamina A foi 1134 µg ER, com DP amplo (2005 µg ER), explicado pelo consumo de fígado por apenas 4 mulheres. Os dados encontrados mostraram-se semelhantes aos encontrados por Saunders e colaboradores (14) quando usaram as tabelas do INCAP (1008µgER) (25) e da FIBGE (1204µgER) (19) para analisar o consumo de vitamina A de gestantes atendidas na rede Pública da Cidade de Rio de Janeiro.

TABELA 1

Consumo médio (x) e desvios-padrão (DP) em µg de ER/dia das gestantes estudadas segundo o trimestre de gravidez - Centro de Saúde Geraldo de Paula Souza, São Paulo. 1996

Trimestres de gravidez	$\bar{X}$	DP	Intervalo de consumo	Coefficiente de variação (CV%)
Primeiro	1213	± 535	785 - 2143	44
Segundo	915	± 1514	0 - 9725	>100
Terceiro	1321	± 2456	0 - 10479	>100
TOTAL	1134	± 2005	372 - 10479	>100

Teste F: 0,437 p > 0,05

Assinala-se que existem muitas variáveis associadas ao consumo de vitamina A que estão fortemente interligadas e tendem a incrementar a variação do consumo entre as pessoas (26). Pelos resultados deste estudo, observou-se que 55% das gestantes apresentaram um consumo médio de 1134 µgER acima da recomendação, e coeficiente de variação (CV) maior que >100% o que descreve uma ampla variação interpessoal.

O FDS não é só um instrumento que categoriza risco de acordo com o consumo inadequado de alimentos fontes de vitamina A. Por meio do IC obtiveram-se, também, os dados da Tabela 2, os quais assinalam que o leite integral fluido foi consumido por 73,6% das gestantes entrevistadas, tanto no desjejum como em outras refeições; tomate e alface vêm a seguir, com 51,6% e 47,3%, respectivamente, tendo sido consumidos principalmente durante o almoço. As frutas de maior preferência são banana e mamão. Pimentão e cenoura (31,9%) integravam diferentes preparações. Os queijos foram consumidos num percentual de 36,3%. Embora a margarina figure em 4º lugar, é interessante assinalar que o seu consumo, 42,9%, aliado ao da manteiga, 17,6%, foi observado em 60,5% de gestantes.

TABELA 2

Frequência de alimentos fontes de vitamina A consumidos pelas gestantes estudadas (percentuais decrescentes), segundo o índice de consumo (IC). São Paulo, 1996

Alimentos	nº	%
Leite fluido	67	73,6
Tomate	47	51,6
Alface	43	47,3
Margarina	39	42,9
Banana	36	39,6
Pimentão cozido	29	31,9
Cenoura cozida	22	31,9
Ovo de galinha	21	23,1
Mamão	19	20,9
Bolo simples	18	19,8
Frango cozido	17	18,7
Queijo prato	17	18,7
Manteiga	16	17,6
Queijo minas	16	17,6
Requeijão	8	8,8
Couve cozida	8	8,8
Agrião	7	7,7
Goiaba	7	7,7

A Tabela 3 mostra os resultados do PUC, podendo-se verificar que mais de 70% das entrevistadas declararam consumir diariamente leite e margarina/manteiga; entre 70 e 85% delas assinalaram consumir semanalmente cenoura, banana, frango, ovos, folhas verde-claro e tomate. Os alimentos de consumo mensal foram: fígado, folhas verde-escuro, bolo simples, peixe, queijo tipo Minas, goiaba, abóbora madura, caqui e folhas medianamente verdes (15 e 33%). Em contraposição aproximadamente 60% das entrevistadas não costumam ingerir alimentos ricos em vitamina A pré-formada ou em carotenóides.

Segundo a OMS/UNICEF(9), um dos indicadores ecológicos para a área/população exposta à deficiência de vitamina A é o consumo de menos de três vezes por semana de alimentos ricos em vitamina A por mais de 75% do grupo vulnerável em estudo. Este ponto de corte sugere prevalência de deficiência de vitamina A. No entanto, nesta pesquisa levantam-se duas questões: a primeira considera que o alto consumo de alimentos de *Moderado* e *Baixo* teor de vitamina A compensaria relativamente o baixo consumo de alimentos ricos em vitamina A, que geralmente são influenciados por fatores de sazonalidade (no caso das frutas) e de hábito alimentar (para o fígado e folhas de cor verde-escuro); a segunda questão refere-se a favorecer ou não a divulgação do consumo de frutas e vegetais para satisfazer as necessidades de vitamina A como estratégia para combater a

sua deficiência (sem que isso signifique desestimular o consumo, pois estes alimentos aportam à dieta outros nutrientes), sendo que alguns estudos assinalam que o consumo de certas hortaliças ricas em carotenóides não melhoram o estado de vitamina A, provavelmente devido a muitos fatores que afetam a biodisponibilidade dos carotenóides (27).

TABELA 3

Alimentos fontes de vitamina A com maior frequência de consumo pelas gestantes estudadas, segundo o padrão usual de consumo (PUC). São Paulo, 1996

Alimentos > 250 µg ER/ porção	Diário		Semanal		Mensal		Nulo	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Fígado de qq animal	-	-	8	8,8	30	33,0	53	58,2
Abóbora madura	-	-	17	18,7	20	22,0	54	59,3
Folhas verdes escuro	-	-	25	27,5	30	33,0	36	39,6
Caqui	-	-	13	14,3	16	17,6	62	68,1
Goiaba	-	-	15	16,5	21	23,1	55	60,4
Manga	-	-	8	8,8	17	18,7	66	72,5

Alimentos com 50 a 250 µg ER/porção	Diário		Semanal		Mensal		Nulo	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Queijo Minas	2	2,2	23	25,3	22	24,2	44	48,4
Peixes	-	-	25	27,5	27	29,7	39	42,9
Ovos e preparações	-	-	71	78,0	5	5,5	15	16,5
Folhas verde med. escuras	-	-	10	11,0	14	15,4	67	73,6
Folhas verde claro	-	-	74	81,3	5	5,5	12	13,2
Brócolis	-	-	15	16,5	9	9,9	67	73,6
Pimentão	3	3,3	48	52,7	3	5,5	35	38,5
Cenoura	-	-	64	70,3	7	7,7	20	22,0
Mamão	-	-	49	53,8	11	12,1	31	34,1

Alimentos < 50 µg ER/porção	Diário		Semanal		Mensal		Nulo	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Leites	66	73	12	13,2	3	3,3	10	11,0
Queijos e requeijão	-	-	39	42,9	12	13,2	40	44,0
Frango	-	-	72	79,1	9	9,9	10	11,0
Manteiga e margarina	64	70	13	14,3	3	3,3	11	12,1
Bolo simples	-	-	33	36,3	30	33,0	28	30,8
Tomate	2	2,2	77	84,6	4	4,4	8	8,8
Vagem	-	-	26	28,6	12	13,2	53	58,2
Banana	2	2,2	64	70,3	5	5,5	20	22,0

Neste estudo, observou-se pouca presença de alimentos sazonais, provavelmente devido ao curto período de avaliação e ao fato das frutas sazonais ricas em vitamina A aparecerem principalmente nos últimos meses do ano, confirmando que somente uma avaliação não é suficientemente sensível para registrar os padrões de consumo em nível individual, nem tampouco as variações da ingestão decorrentes das transformações fisiológicas pelas quais a mulher grávida

passa. Assim, reitera-se a necessidade da obtenção de dados sobre a ingestão alimentar em diferentes estações do ano, bem como nos diferentes trimestres da gravidez.

Através do Formulário Dietético Simplificado foi também possível chegar aos seguintes resultados: o IC encontrou que 26,4% das entrevistadas estavam na categoria de Alto risco; 19,8% em Moderado risco e 53,8% em Baixo risco, segundo os dados mostrados na Figura 1. Na Figura 2, segundo o PUC, a maioria das gestantes (58,2%), foi categorizada em Moderado risco. Identificaram-se 3,3% de mulheres em Alto risco e 38,5% em Baixo risco

É óbvio que a estimativa do consumo de vitamina A de um dia pelo IC não revela a verdadeira ingestão desse nutriente, em função da natureza variável da dieta (26). No sentido de superar a deficiência desse método, acredita-se, é que o IVACG propõe a utilização de instrumentos que substituam o consumo de um ou vários dias pela informação global de um período amplo de tempo. Em nosso caso, o PUC possibilitou categorizar os indivíduos segundo seu grau de exposição, isto é, identificar os indivíduos nos diferentes níveis de consumo deste nutriente. Por outro lado, o IC e o PUC na categoria alto risco, apresentam uma marcada diferença, 26,4% e 3,3%, respectivamente, o que nos sugere que o PUC possui um melhor desempenho para classificar os indivíduos.

FIGURA 1

Categorização de risco de deficiência de vitamina A das gestantes estudadas, segundo índice de consumo (IC). São Paulo, 1996

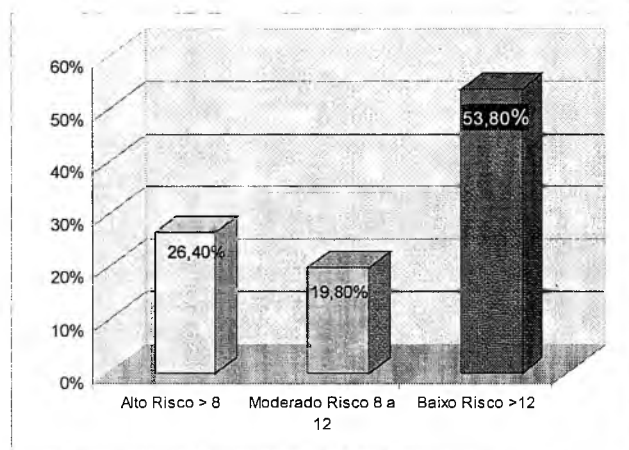
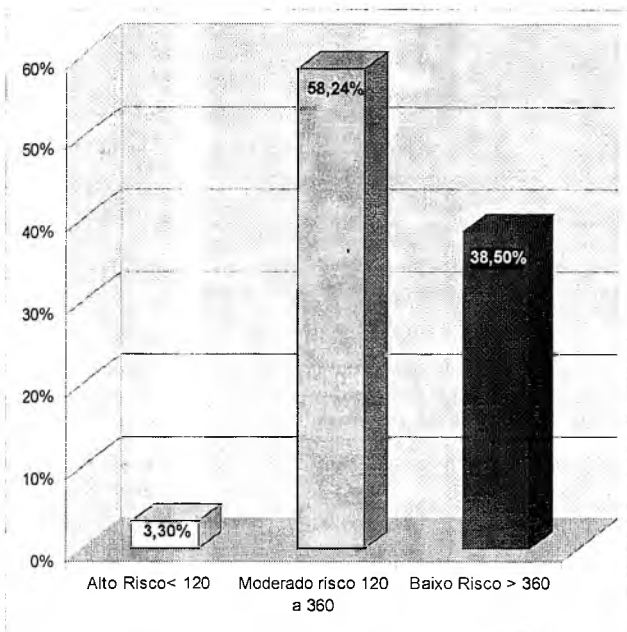


FIGURA 2

Categorização de risco de deficiência de vitamina A das gestantes estudadas, segundo o padrão usual de consumo (PUC). São Paulo, 1996



A concordância de um instrumento em relação a outro, considerado método de referência, pode ser realizada por diferentes metodologias estatísticas, entre as quais se destaca a análise de correlação (28). Neste estudo foi possível relacionar os resultados em escores obtidos por ambos os métodos (IC e PUC), obtendo-se um coeficiente de correlação de Spearman de  $r = 0,50$ ; ( $p < 0,005$ ) entre ambos os métodos. Embora este não seja um estudo de validação, a literatura mostra que nos estudos que envolvem a comparação de dois métodos de avaliação dietética (Questionários de frequência alimentar versus. Método padrão de referência) os coeficientes de correlação encontrados tendem a variar entre 0,5 e 0,70 (29,30). Estes valores mostram o erro de medição associado da estimativa do nutriente calculado pelos questionários de frequência utilizados. Nosso entender, o coeficiente de correlação é um valor limitado, pois descreve só um aspecto da concordância ou, em outras palavras, reflete somente a aproximação linear entre os métodos dentro de uma mesma população.

Por esta razão consideramos importante avaliar a concordância por outro método estatístico. O coeficiente de Kappa<sub>w</sub> verificou-se um valor de 0,207, significativamente diferente de zero ( $p < 0,001$ ).

Nossos resultados se apresentam de forma discrepante. Por um lado, coeficientes de correlação acima de 0,50 são considerados razoáveis e por outro lado fracos (0,20), inerentes a avaliações dietéticas realizadas em períodos curtos

e por metodologias mais acuradas. Nelson (28) assinala que quando os coeficientes de correlação são baixos, existe a probabilidade de incrementar o número de pessoas mal classificadas segundo seu consumo. Resultados como os deste estudo evidenciam que, em grupos como as gestantes, seria necessário um número maior de aplicações do IC dada a natureza do nutriente e a prováveis erros aleatórios inerente às pessoas e ao método (31).

A partir desses resultados, pode-se sugerir que o Formulário Dietético Simplificado é um instrumento útil e de fácil aplicação e se mostra razoável para categorizar risco de deficiência de vitamina A em grupos com inadequado consumo de alimentos fontes de vitamina A e carotenóides, podendo ser adaptado a situações locais e aplicado, também, ao grupo vulnerável gestante. Sugere-se que a avaliação do consumo alimentar relativo a vitamina A deve ser efetivada nas diferentes estações do ano.

## REFERÊNCIAS

1. Underwood BA. Maternal vitamin A status and its importance in infancy and early childhood. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: (suppl.): 517S- 24S.
2. Roncada MJ, Coelho LT, Siqueira AAF, Okani ET, Wilson A. Perfil bioquímico de vitamina A e caroteno plasmático em gestantes com exame pré-natal. *Rev Chil Nutr* 1988a ;16: 116 -20.
3. Roncada MJ, Coelho LT, Siqueira AAF, Okani ET, Soto OJ, Wilson A. Níveis plasmáticos de vitamina A em parturientes atendidas por instituição beneficente. *Rev Chil Nutr* 1988 b; 16: 223 -28.
4. Rondó PH, Abbott R, Tomkins A. Vitamin A and intrauterine growth retardation. *Eur J Clin Nutr* 1995;49: 391-99,
5. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística -IBGE. Consumo alimentar-antropometria. Rio de Janeiro, 1977 a. p.1 (Estudo Nacional da Despesa Familiar, v.1: dados preliminares, t.1.
6. Roncada MJ. & Mazzilli RN. Fontes de vitamina A na dieta de populações do Estado de São Paulo, Brasil. *Alim Nutr* 1989; 1: 71-85 .
7. Roncada MJ, Wilson D, Mazzilli RN, Gandra YR. Hipovitaminose A em comunidades do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública* 1981; 15: 338-49,.
8. Arroyave G, Baltazar J, Kusin J, Lepkowski JM, Milton RC, Srikanthia SG. Methodologies for monitoring and evaluating vitamin a deficiency intervention programs. a report of international vitamin A consultative group. (IVACG) The Nutrition Foundation, Washington, DC, 1989.
9. World Health Organization/United Nations Children's Fund.. Indicators for assessing vitamin A deficiency and their application in monitoring and evaluating intervention programmes. Micronutrient Series. WHO/NUT/ 96.10. WHO Geneva, 1996.
10. Underwood BA, Chaves M, Hankin J, Kusin JA, Omololu A, Ronchi-Proja F, Butrum, R, Ohata S. Guidelines for the

- development of a simplified dietary assessment to identify groups at risk for inadequate intake of Vitamin A: a report of the International Vitamin A Consultative Group (IVACG). Washington, D.C., 1989.
11. Chavez M, Martines H, Chavez A. A simplified tool for assessing vitamin A deficiency risk at the community level. *Food Nutr Bull* 1989; 11: 7- 40.
  12. Abdullah M, & Ahmed L. Validating a simplified approach to the dietary assessment of vitamin A intake in preschool children. *Eur J Clin Nutr* 1993; 47: 115-22.
  13. Nimsakul S, Collumien M, Likit-Ekaraj V, Suwanarach Ch, Tansuhaj A, Fuchs GJ. Simplified dietary assessment to detect vitamin A deficiency. *Nutr Rev* 1994;14: 325-36.
  14. Saunders C, Ramalho RA, Accioly E, Paiva FJ. Utilização das tabelas de composição dos alimentos na avaliação do risco de hipovitaminose A. *Arch Latinoam Nutr* 2000; 50 (3): 237-42.
  15. Accioly E, Souza SS. Deficiência de vitamina a em embarazadas atendidas em uma maternidad pública en Rio de Janeiro - Brasil. *Rev Chil Nutr* 2000; 27(3): 352 -7,.
  16. Lwanga SK & Lemeshow S. Determinación del tamaño muestral en los estudio sanitarios. Manual práctico. Ginebra: Organización Mundial de la Salud.,1991.
  17. Batcher, O.M. & Nichols, J.M. Identifying important food source of nutrient. *J Nutr Educ* 1984;16: 177-81.
  18. Companhia De Armazens Gerais Do Estado De São Paulo (Ceagesp) - Índice de variação estacional (IVE): Relativos às quantidades e preços dos principais produtos hortigrangeiros comercializados no ETSP. Período: 1981 a 1988. São Paulo, s.d.
  19. Fundação IBGE. Tabela de composição dos alimentos. Rio de Janeiro, 1977b. (Estudo Nacional da Despesa Familiar, v:3, t.1.)
  20. SlaterVB. Identificação de risco de deficiência de vitamina A em gestantes, usando metodologia simplificada de inquérito alimentar. São Paulo, 1996. [Dissertação de mestrado-Faculdade de Saúde Pública, Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Faculdade de Economia e Administração da USP].
  21. Trigo M. Metodologia de inquérito dietético: estudo do método Recordatório de 24 horas. São Paulo, 1993. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da USP]
  22. Philippi ST. Técnicas dietéticas: resultados das preparações desenvolvidas em aulas práticas. São Paulo, Departamento de Nutrição - Faculdade de Saúde Pública da USP, 1998.
  23. Pinheiro AB, Lacerda EMA, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. Tabela para avaliação de consumo alimentar em medidas caseiras, 4ª ed. revisada, Rio de Janeiro, Grupo de Pesquisa em Nutrição Materno-Infantil, 1998.
  24. Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO/OMS). Necesidades de Vitamina A, Hierro, Folatos y Vitamina B12. Informe Roma, FAO/OMS. (Estudios FAO. Alimentación y Nutrición, 23) 1991.
  25. Leung WTW, Flores M. Tabla de composición de alimentos para uso en America Latina. Instituto de Nutrición Centro América y Panamá. Ciudad de Guatemala. Jun. 1961.
  26. Willett WC. *Nutritional Epidemiology*. 2ª ed. Oxford: Oxford University Press; 1998.
  27. Pee S, West CE, Karyadi D, Hautvast JGA. Lack of improvement in vitamin a status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. *Lancet* 1995; 346: 75-81,.
  28. Nelson, M. The validation of dietary assessment. In: Margetts B, Nelson M. *Design concepts in nutrition epidemiology*. 2ª ed. 1997. Oxford: Oxford University Express; p. 241-72.
  29. Willett, W.C. Diet and nutrition. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF. *Cancer epidemiology and prevention*. 2ª ed. Oxford: Oxford University Press; p. 438-61, 1996
  30. Rimm EB, Giovannucc IEL, Stampfer MJ, Colditz, GA, Litin LB, Willett WC. Reproducibility and validity of na expanded self-administered semiquantitative food frequency questionnaire among male health professionals. *Am J Epidemiol* 1992; 135: 1114-26,.
  31. Armstrong BK, White E, Saracci R. *Principles of exposure measurement in epidemiology*. 2ª ed. Oxford: Oxford University Press; 1995. v.21.

Recibido:03-12-1999

Aceptado: 05-11-2001

## Prácticas alimentarias en las familias del area rural de Medellin- Colombia

*Martha Cecilia Álvarez Uribe, Laura González Zapata*

Universidad de Antioquia – Escuela de Nutrición y Dietética, Medellín, Colombia

**RESUMEN.** Se presentan algunas prácticas alimentarias de las familias de los corregimientos de Medellín: Santa Elena, Belén Altavista, Palmitas, San Cristóbal y San Antonio de Prado. El estudio es de tipo descriptivo transversal; la muestra fue representativa y probabilística. La lactancia materna prevalece en todos los corregimientos sin diferencias significativas entre los mismos, se observó una duración promedio de la lactancia materna entre 10 y 13 meses ( $p < 0.05$ ), el 29% de las mujeres manifestaron haber tenido alguna dificultad para amamantar a su último hijo, las principales causas fueron: poca producción de leche y enfermedad de la madre. El 53% de las madres informaron haber introducido la alimentación complementaria antes de cuatro meses. El consumo de frutas y verduras en la población es bajo, en contraste con el consumo de frijol. El 49% de las familias utilizan como métodos de cocción preferidos la fritura y la cocción. La manteca y aceites que contienen mayor proporción de ácidos grasos saturados, se constituyeron en el tipo de grasas preferidas para la cocción. La mayoría de los integrantes de las familias, consumen las comidas principales y lo hacen en el hogar. Por el contrario las comidas secundarias tienden a desaparecer, en especial la merienda y la media mañana.

**Palabras clave:** Prácticas alimentarias, hábitos alimentarios, cultura alimentaria, patrón alimentario, seguridad alimentaria y nutricional.

**SUMMARY.** Feeding practices among rural families of Medellín Colombia. Some feeding practices among families of Medellín's Districts: Santa Helena, Belen Altavista, Palmitas, San Cristóbal and San Antonio de Prado are presented. It is a descriptive and transversal investigation. The sample used was representative and probabilistic. Breast feeding practice is prevalent in all the Districts mentioned above; a duration average of the breast feeding was observed between 10 and 13 months ( $p < 0.05$ ), 29% of the women, declared having some kind of difficulty trying to breast feed their last child. The main reasons for this were: low milk production and illness of the mother. 53% of the mothers informed to have introduced the complementary feeding before four months. Fruits and vegetable consumption was low, comparing it with the high level of consumption of beans. The cooking methods most used were deep frying and boiling. The oils and lard used have a high content of saturated fat acids. Most of the members of the families, they consume the main foods and they make it in the home (breakfast, lunch and supper). On the other hand in between meals tend to disappear, especially midmorning and late snack.

**Key words:** Feeding practices, food habits, feeding culture, food security, pattern of feeding.

### INTRODUCCION

La seguridad alimentaria y nutricional en población rural de la ciudad de Medellín está condicionada por el acceso que las familias tienen a los alimentos más que por la disponibilidad de los mismos (1). Entre los factores que inciden en esto se encuentran las prácticas alimentarias, dado que ellas orientan la decisión de compra de alimentos. Por otro lado el consumo de frijol ha sido una práctica alimentaria en la población Antioqueña que ha contribuido a incrementar el valor nutricional de la dieta y que por razones de costos las familias han hecho un ajuste al gasto alimentario reduciendo su consumo, situación que se quiso verificar con el fin de promover la producción de esta leguminosa para el autoconsumo.

En la población materno infantil las prácticas alimentarias son importantes de estudiar por su vulnerabilidad a la

inseguridad alimentaria y nutricional. La lactancia materna exclusiva hasta los seis meses aporta la cantidad de nutrientes necesarios para el adecuado crecimiento y desarrollo del lactante, lo que garantiza su seguridad alimentaria y nutricional, además es importante conocer las prácticas de alimentación complementaria por su incidencia en la lactancia materna y en la alimentación y nutrición del menor (2). Las preferencias y rechazos de alimentos durante la gestación influyen en su selección y por ende en la calidad nutricional de la dieta.

El Plan Nacional de Alimentación y Nutrición de Colombia (1995/2006) (3), plantea la necesidad de investigar sobre prácticas alimentarias por regiones, como insumo requerido para trazar las políticas, programas y proyectos alimentarios y nutricionales que partan del conocimiento local, propósito al cual contribuye. Además, con este estudio se complementan los resultados en Seguridad Alimentaria y

Nutricional obtenidos en otras investigaciones en esta misma población (4-7). En el estudio de corte etnográfico realizado en esta población se encontró que las frutas y verduras no hacían parte del modelo alimentario (8), razón por la cual se considero importante complementar desde una perspectiva cuantitativa este aspecto, por el papel que juegan los micronutrientes en la protección de la salud (9). Para lo cual se utilizó una frecuencia semicuantitativa semanal de consumo de frutas, verduras y leguminosas.

### Espacio poblacional

Medellín es la segunda ciudad de Colombia, su área rural esta constituida por cinco corregimientos (\*): Santa Elena, Belén Altavista, San Cristóbal, Palmitas y San Antonio de Prado, con una extensión que representa el 70.5% del territorio municipal, distribuidos en 41 veredas (\*\*) y en ellas viven el 5% de la población del municipio (10).

### MATERIALES Y METODOS

En las familias del área rural de la ciudad de Medellín se realizó un estudio de tipo descriptivo de corte transversal. Para cada corregimiento se calculó una muestra representativa y probabilística con un error máximo de un 5% y un nivel de confianza del 95%, constituida por: 342, 313, 385, 328 y 308 para Santa Elena, Palmitas, San Antonio de Prado, San Cristóbal y Belén Altavista respectivamente, para un total de 1676 familias.

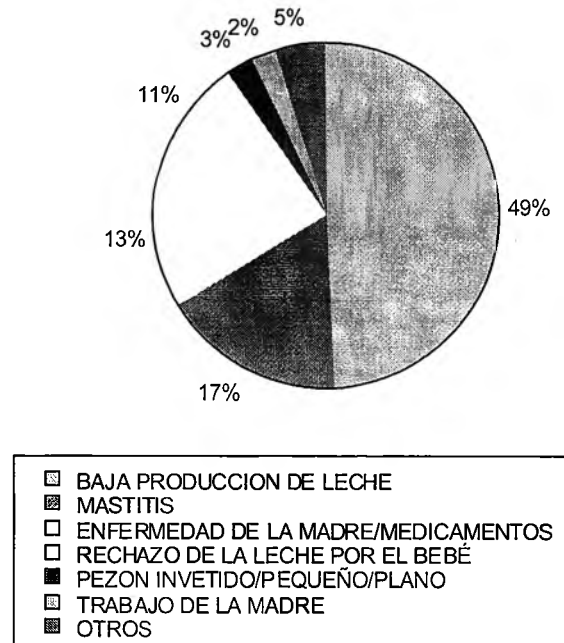
La técnica utilizada para la recolección de los datos fue la entrevista familiar, guiada por una encuesta estructurada que recopiló datos sobre: aspectos demográficos, producción de alimentos, alimentación subsidiada, prácticas alimentarias, hábito de compra de alimentos y frecuencia semanal de consumo de frutas, verduras y leguminosas. Seis encuestadores, previamente capacitados y estandarizados para realizar la entrevista y registrar los resultados en el formulario, se desplazaron a las diferentes veredas seleccionadas en la muestra y en las viviendas entrevistaron a las madres o a las personas responsables de preparar los alimentos. La crítica, organización y tabulación de los datos fue efectuada por un profesional de Nutrición y Dietética,

proceso supervisado por los investigadores. Los datos fueron procesados en los programas EPIINFO, CERES, EXCEL Y PRISMA. El análisis de la información es de tipo descriptivo.

### RESULTADOS

El 80% de las madres manifestaron haber alimentado al seno a su último hijo, la duración promedio en los diferentes corregimientos osciló entre 10 y 13 meses. El 29% de las madres que lactaron tuvieron alguna dificultad, las causas de mayor frecuencia fueron: baja producción de leche, enfermedad de la madre, el uso de medicamentos por la madre y rechazo de la leche materna por parte del bebé (Figura 1). En el 53% de los niños la introducción de alimentos diferente a la leche materna se inició antes de los cuatro meses y de estos el 11% los recibieron desde el nacimiento (Figura 2). El 30% y el 34% de las mujeres entrevistadas manifestaron preferir o rechazar algún alimento durante la gestación. Los alimentos de mayor preferencia fueron las frutas, verduras y leguminosas y el de mayor rechazo el frijol.

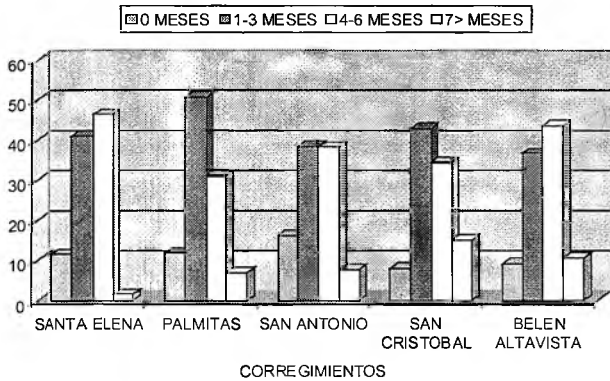
FIGURA 1  
Tipo de dificultad para amantar al último hijo en los corregimientos de Medellín 1998



\* Secretaría de Bienestar Social del Municipio de Medellín. Aproximación a un diagnóstico de las problemáticas sociales de la ciudad de Medellín. 1992, p 64. Se define corregimiento como "territorio ubicado dentro del área rural, con una población estimada entre 5.000 y 20.000 habitantes que dispone de un núcleo central en el que se desarrolla un proceso de urbanización".

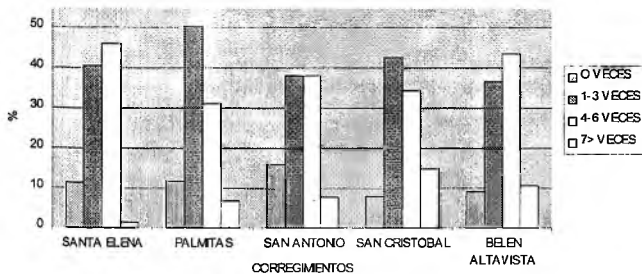
\*\* Ibid. Se define la vereda "como una porción territorial situada dentro del área rural, con una población entre 2.000 y 10.000 habitantes y que carece de proceso de urbanización", p 64.

**FIGURA 2**  
Edad de inicio en meses de la alimentación complementaria al último hijo en los corregimientos de Medellín 1998

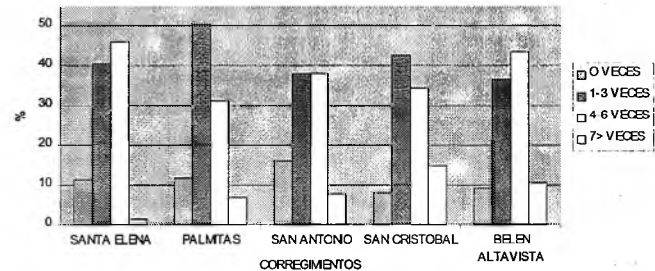


La frecuencia semanal del consumo de frutas y verduras fue muy bajo en las familias de todos los corregimientos (Figura 3 y 4). El consumo de leguminosas representadas en su mayoría por frijol continúa siendo una práctica de consumo de alta frecuencia semanal. Las tres comidas principales fueron consumidas por la mayoría de la población, principalmente en el hogar, aunque se observó que entre el 17% y 19% de las personas de los corregimientos los consumen fuera de este. El hábito de realizar comidas secundarias ha disminuido, en forma especial la merienda y media mañana. El 49% de las familias prefieren la preparación de alimentos en forma frita o cocida, el 20% cocidos y el 15% fritos, cocidos o asados.

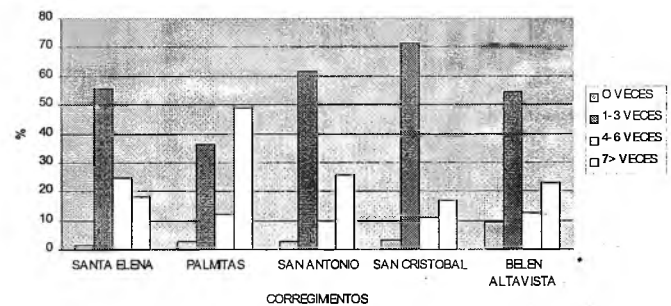
**FIGURA 3**  
Frecuencia del consumo semanal de frutas por las familias de los corregimientos de Medellín 1998



**FIGURA 4**  
Frecuencia del consumo semanal de verduras por las familias de los corregimientos de Medellín 1998



**FIGURA 5**  
Frecuencia del consumo semanal de leguminosas por las familias de los corregimientos de Medellín 1998



**DISCUSION**

**Práctica de lactancia materna**

Desde la perspectiva de la seguridad alimentaria y nutricional de los menores de un año, la lactancia materna exclusiva se constituye hasta los seis meses, en la más saludable opción para que los lactantes obtengan la cantidad y calidad de los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo (11). A partir de esta edad se debe continuar con la lactancia al pecho hasta los dos años, complementándola con otros alimentos para garantizar la óptima alimentación del menor.

El 80% de las mujeres amamantaron a su último hijo, con proporciones similares en todos los corregimientos (p=0.46), salvo en Palmitas que fue de 69.7%. Esta proporción, es más baja a la encontrada en el estudio sobre hábitos alimentarios de la población rural de Colombia realizado en 1981, en el cual se encontró que el 98% de los niños habían sido alimentados al pecho (12) y en la Encuesta Nacional de Demografía y Salud de 1995 (ENDS-95), según

la cual el 95.1% de los niños del área rural de Colombia han sido lactados por lo menos una vez (13). Cabe destacar que el 20% de los niños de los corregimientos de Medellín no recibieron lactancia materna, lo que conlleva riesgo de inseguridad alimentaria y nutricional, con implicaciones inmediatas y futuras para su salud, nutrición y desarrollo.

Se observó una duración promedio de la lactancia materna entre 10 y 13 meses ( $p < 0.05$ ). La última cifra fue reportada en Belén Altavista, aspecto que llama la atención dado que este corregimiento presenta mayores características de urbanismo, lo cual coincide con la posición de expertos en el tema, quienes sustentan que en las zonas urbanas existe mayor práctica de la lactancia materna. Los promedios anteriores son similares a los encontrados en la Encuesta Nacional de Demografía y Salud de 1995, en la que se reporta un promedio de duración de la lactancia al pecho de 11 meses (14); cifra que supera los promedios de países como Brasil, México, República Dominicana y Trinidad y Tobago que fue de 9 meses e inferior en los países del sur del Sahara y Sri Lanka que supera los 18 meses (15).

Cabe resaltar que la moda de duración de la lactancia materna fue de 12 meses, la cual coincidió en todos los corregimientos; esto demuestra una buena práctica de la lactancia materna. La duración mediana más baja fue de 7 meses; superando la mediana de 5 meses, encontrada para áreas urbanas marginadas de grandes ciudades de Colombia (16).

El 29% de las mujeres de los corregimientos manifestaron haber tenido alguna dificultad para lactar a su último hijo, la proporción mayor se encontró en San Antonio de Prado (40%) y la menor en las madres de Belén Altavista (16%). Si bien estas cifras son menores a la considerada por Savage (17), quien expresa que por lo menos la mitad de las mujeres presentan dificultad para amamantar, este hecho es preocupante dado que 329 niños dejaron de ser alimentados al seno. La mayor dificultad fue la baja producción de leche con un 49%, motivo referido en el estudio multicéntrico de Conocimientos Actitudes y Prácticas (CAP) de lactancia materna, en áreas urbanas marginadas de grandes ciudades Colombianas (18) y en la Encuesta de Demografía y Salud de 1995, según la cual el 30% de las madres reportaron esta dificultad (19). Esta apreciación puede estar ocasionada por técnicas de lactación incorrecta, además por situaciones que generan ansiedad en la madre y que tienen efectos negativos sobre el reflejo de eyección de la leche (20).

El 17% de las mujeres manifestaron la enfermedad de la madre y uso de medicamentos por ella como causa para no amamantar, proporción menor a la encontrada por el FES en las zonas marginadas de las grandes ciudades de Colombia. En esta investigación no se indagó sobre la enfermedad que sufrió la mujer, pero en la mayoría de los casos es posible continuar lactando al bebé, a excepción de madres con

períodos agudos de infección por citomegalovirus, virus de inmunodeficiencia humana en mujeres sero positivas, virus linfotrópicos de las células T, hepatitis A con ictericia materna durante el período agudo de infección, hepatitis B con la enfermedad activa; herpes simple en presencia de lesiones herpéticas vesiculares, rubéola y tuberculosis (21). Cuando la madre tiene cáncer y recibe quimioterapia, se recomienda la suspensión (Figura 1).

Con respecto a los medicamentos que ingieren las madres, casi todos son excretados por la leche materna en cantidades pequeñas que no logran afectar al niño. Se recomienda la suspensión de la lactancia, por el consumo de medicamentos por parte de la madre como sulfonamidas, clotrimazol, fansidar, dapsona, psiquiátricas y anticonvulsivas.

Un 13% de las madres manifestaron que sus hijos rechazaron la leche materna, esto pudo relacionarse con la administración en forma simultánea de: agua, otros leches u otros alimentos que para el niño tienen sabores diferentes de la leche materna y le facilita la succión por el uso de biberón. La mastitis, "infección que se produce cuando la obstrucción de un conducto no es manejada a tiempo, cuando el pezón se agrieta o cuando la leche acumulada al no salir se infecta da como resultado inflamación del pecho, dolor y fiebre en la madre" (22), se presentó en el 11% de las mujeres como causa para no lactar, aspecto que es posible controlar con apoyo oportuno a la madre, para que ésta no deje de amamantar o se extraiga la leche.

Cinco madres no lactaron a sus hijos por haber nacido prematuros, decisión muy negativa para la salud, crecimiento y desarrollo de los niños, porque en estos casos la leche materna tiene más anticuerpos y factores anti-infecciosos que la leche de madres de niños nacidos a término y tiene un contenido mayor de nutrientes necesarios para el lactante prematuro en esta edad: proteínas, sodio, hierro y cloro (23).

La planificación familiar, también apareció en menor proporción, como causa para no lactar. El control de la natalidad, por medio de anticonceptivos orales que contienen estrógenos por encima de 50  $\mu\text{g}$ , disminuye la cantidad de leche; además estos y los que contienen progestágeno pasan a la leche, razón por la cual se debe recomendar a las madres el uso de otros métodos de anticoncepción que no interfieran con la lactancia.

### **Alimentación complementaria**

Como ya se dijo, la lactancia materna exclusiva en los primeros cuatro a seis meses de vida, suministra la cantidad y calidad de nutrientes y otras sustancias requeridas por el lactante. A partir de estas edades se recomienda iniciar la ablactación o alimentación complementaria. El inicio precoz de la alimentación complementaria presenta riesgos para el niño por su inmadurez biológica en diferentes sistemas: el neuromuscular, digestivo, inmunológico y renal (24). Por

otro lado, la alimentación complementaria no debe retardarse, dado que el niño entre los cuatro y seis meses requiere de calorías y nutrientes adicionales a los que suministra la leche materna y necesita desarrollar en forma progresiva habilidades para masticar y deglutir otros alimentos, ejercitar los músculos de la mandíbula y probar otros sabores y texturas (25). Además la leche materna contiene hasta los seis meses el hierro requerido por el lactante, a partir de esta edad se le debe suministrar otros alimentos que garanticen cubrir las necesidades de este mineral (26).

La alimentación complementaria se inició en forma temprana en el 53% de los lactantes y de estos el 11% la recibió desde el nacimiento. Sólo al 39% de los niños se le introdujo la alimentación complementaria en edades adecuadas. Según los reportes del Centro de Documentación sobre Alimentación Infantil y Nutrición Materna, estos porcentajes son menores a los encontrados en Brasil, México, República Dominicana, Trinidad y Tobago, donde el 50% de los lactantes la recibieron en la edad recomendada (Figura 2).

Los alimentos utilizados para iniciar la alimentación complementaria fueron muy diversos para cada una de las edades. Los más utilizados desde el nacimiento fueron: fórmulas lácteas, leche de vaca, jugos de frutas, caldo de fríjol y sopas preparadas con diferentes alimentos; estos son similares a los reportados por Vemury en el estudio para el área rural de Colombia.

Alimentar al lactante con leche de vaca, especialmente en el primer semestre de vida puede tener graves efectos deletéreos en el estado nutricional del niño, porque sus ácidos grasos son saturados en alta proporción; el ácido linoleico, el colesterol, la cistina y la taurina necesarios para el crecimiento del cerebro son insuficientes en ella; no contiene lipasa para digerir las grasas, contiene demasiada caseína que forma grumos gruesos y tiene una relación calcio fósforo inadecuada para el lactante. Además la leche de vaca se contamina más y no contiene las células sanguíneas blancas vivas, ni los anticuerpos que protegen al niño contra las infecciones, implicando un mayor riesgo de enfermedades como diarrea e infecciones respiratorias.

Entre el primer y tercer mes de vida, la alimentación complementaria se inició con sopas a base de diversos alimentos, se resalta el guineo y el arroz como sus ingredientes principales y caldo de fríjol; esto ratifica las creencias de las madres sobre las sopas, al considerarlas nutritivas e importantes para el crecimiento y desarrollo de los bebés y el supuesto aporte de hierro del guineo. El huevo que ha sido asociado con el desarrollo de alergias fue también un alimento utilizado en la alimentación del niño en este rango de edad.

La aguapanela se introduce en forma temprana, cambiando los beneficios de la leche materna por un alimento de baja densidad de nutrientes y alto contenido calórico. También se prefieren las frutas y verduras, preparadas en forma de jugos, sopas y compotas, si bien estos alimentos contienen vitaminas y minerales importantes para la nutrición de los menores, no son necesarias si el lactante está siendo alimentado al pecho en forma exclusiva y pueden interferir en forma desfavorable con el equilibrio y biodisponibilidad de los nutrientes de la leche humana.

### **Preferencias y rechazos de alimentos o preparaciones durante la gestación**

El 30% y el 34% de las mujeres entrevistadas, manifestaron preferir o rechazar algún alimento durante la gestación; el corregimiento que presentó menor proporción en ambos sentidos fue Belén Altavista y el más alto fue Palmitas; el primero tiene características más urbanas, lo cual lleva implícito un mejor nivel educativo de las mujeres, mayor demanda por el control prenatal en el momento oportuno; el segundo muestra condiciones de mayor ruralidad; lo anterior puede explicar esta actitud frente a los alimentos, durante el periodo de gestación. Las razones que aducen las madres para preferir estos alimentos son: sabor, antojo, tolerancia, nutritivos y olor.

Las frutas, verduras y leguminosas fueron preferidas por las gestantes de todos los corregimientos, aspecto positivo dado que estos alimentos suministran vitaminas y minerales necesarios para la nutrición humana y en forma especial durante este período. La leche fue preferida durante la gestación, conducta saludable porque durante esta etapa se incrementan las necesidades de calcio. Casi toda la ganancia de calcio por la madre durante la gestación pasa al feto y por lo tanto la dieta debe tener un aporte adecuado de este mineral, para evitar la disminución de masa ósea de la madre y promover el óptimo crecimiento y desarrollo del esqueleto fetal.

Las preparaciones rechazadas por las gestantes fueron: el sancocho y la carne cocida; aspecto que no es preocupante, dado que los alimentos que se utilizan en ellas, pueden ser consumidos en otras formas culinarias. Las leguminosas, en forma especial el fríjol, fueron rechazadas por algunas madres, así mismo los condimentos por causar flatulencia y exacerbar algunos síntomas relacionados con la alimentación durante este período. Las razones por las cuales rechazan estos alimentos son: desgano, náuseas, indigestión y vómito.

### **Consumo de frutas, verduras y leguminosas en las familias**

El consumo de frutas y verduras es muy importante para la nutrición humana por su contenido de vitaminas, minerales,

fibra y por agregar a la dieta variedad de colores y sabores. Un bajo consumo de estos grupos de alimentos, no contribuye a obtener la ingestión dietética diaria recomendada de vitamina C y A, las cuales tienen un efecto protector de enfermedades crónicas degenerativas (27,28).

En los corregimientos, la frecuencia semanal de consumo de frutas y verduras fue muy bajo, situación que para las verduras, se podría explicar por los hallazgos de Maya M (\*). Un alto porcentaje de las familias en todos los corregimientos, reportaron no consumirlas, en donde se encontró un menor porcentaje de familias que no consumen frutas a la semana fue en Santa Elena y verduras en San Cristóbal con un 8.0% posiblemente por ser un corregimiento productor de estos alimentos. Las familias de San Antonio de Prado mostraron una mejor frecuencia de consumo de frutas el 43% de ellas lo hacen 7 veces o más a la semana y verduras en Belén Altavista con un 10.6% con misma frecuencia, este aspecto es similar a lo reportado por las familias de los estratos más bajo de la ciudad de Medellín (29) (Figura 3 y Figura 4).

El consumo de leguminosas, representadas en su mayoría por frijol, continúa siendo una práctica de consumo de alta frecuencia semanal, conservando uno de los platos típicos de la comida Antioqueña. Las familias del corregimiento de Palmitas, son las que presentan mayor consumo, cerca de la mitad de ellas incluyen esta leguminosa en su alimentación diaria, seguida en su orden por San Antonio de Prado con una cuarta parte y los tres corregimientos restantes con cerca de la quinta parte. Los porcentajes de frecuencia semanal de consumo de una y tres veces y entre cuatro y seis veces, reafirman el hábito de consumo de las leguminosas (\*\*). Lo anterior, es un aspecto muy positivo en las familias del área rural de la ciudad de Medellín, por el contenido de este alimento de proteínas, hierro, magnesio, ácido fólico y fibra (Figura 5).

### **Frecuencia de consumo y lugar de las comidas principales y secundarias**

El desayuno, almuerzo y comida, se consideran en esta investigación como las comidas principales, por su aporte calórico y de nutrientes a la alimentación diaria; las tres fueron consumidas por un alto porcentaje de la población. Si bien, quienes no lo hacen son muy pocos, se debe resaltar el hecho porque estas personas se someten a ayunos muy prologados, que repercuten en bajos niveles sanguíneos de glucosa e inciden negativamente en el aporte necesario de calorías y nutrientes para obtener una dieta saludable.

Con respecto al lugar donde las personas efectúan estas comidas, prima aún el hogar, aunque se observó que entre el 17% y 19% de las personas de los corregimientos de Santa Elena, Palmitas y San Cristóbal, lo hacen fuera. Estos porcentajes se pueden explicar por que los agricultores

acostumbran llevar a las parcelas el almuerzo preparado en los hogares, aspecto que se debe tener en cuenta, para el análisis de la disponibilidad de alimentos en el hogar, también se puede contemplar la posibilidad que sean personas que se desplazan a zona urbana de la ciudad de Medellín, lo cual limita el tiempo para trasladarse a sus hogares a la hora del almuerzo.

Los tragos, media mañana, algo y merienda, se consideraron comidas secundarias, dado que por su volumen tienen menor aporte calórico y nutricional a la alimentación diaria. Se encontró que los tragos, generalmente constituidos por aguapanela o café negro y que se consumen antes del desayuno, todavía se conservan como práctica alimentaria, en contraste con la merienda que es un refrigerio ligero ingerido en la noche después de la comida, que tiende a desaparecer; el algo se consume en las horas de la tarde, e incluye bebidas, cereales y/o frutas, se conserva en mayor porcentaje como comida secundaria, seguido por la media mañana constituida en forma similar al algo, siendo más frecuente en los corregimientos que presentan mayores características de ruralidad: Santa Elena, San Cristóbal y Palmitas.

Los métodos de preparación más utilizados fueron cocido y frito, solos o combinados con otros, en comparación con el asado que se presenta en muy bajo porcentaje; esto se podría explicar por no disponer de hornos y por la preferencia al sabor de las grasas que tiene la población. Las frituras contribuyen al incremento del consumo de ácidos grasos saturados, por la calidad de aceites utilizados, lo cual se comporta como factor de riesgo para enfermedad cardiovascular y algunos tipos de cáncer.

### **Adición de sal a las comidas preparadas**

El 11.5% de las familias adicionan sal a las comidas preparadas, siendo mayor en Belén Altavista con un 16% y menor en San Cristóbal con un 6%. Esta práctica puede aumentar el consumo total de sodio de la dieta, dado que se debe considerar el sodio que contienen los alimentos y la sal utilizada en las preparaciones. La OMS, recomienda como medida preventiva para enfermedad cardiovascular, limitar el consumo diario de cloruro de sodio a seis gramos o menos.

---

\* Maya M. "Hasta hace muy poco tiempo la ensalada no hacía parte de la dieta alimentaria de los habitantes de la zona rural de Medellín, esta se ha ido introduciendo aunque muy lentamente por varias vías: principalmente por contacto con los habitantes de la ciudad, muchas mujeres se emplean como domésticas donde aprenden nuevas preparaciones que incorporan a la dieta familiar", p 56.

\*\* MAYA. M. " El frijol es un plato servido como símbolo de identidad del pueblo antioqueño. Los frijoles es una comida de relación, donde existe la posibilidad de mezclarse todo (...)". P 51

### Personas de las familias que reciben una mejor alimentación

El 88% de las familias entrevistadas consideran que todas las personas deben recibir la misma alimentación y lo sustentan desde el principio de igualdad o equidad, el 6.3% manifestaron dar preferencia a los niños, las razones fueron por estar en etapa de crecimiento y estudiando.

En un pequeño porcentaje de las familias se prefirió a los padres; lo anterior revela un cambio importante, dado que no se considera que la mejor alimentación debe destinarse a quien genera ingresos económicos, máximo en el área rural, donde este rol es asumido principalmente por el hombre.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las familias del área rural de la ciudad de Medellín, presentan inadecuadas practicas alimentarias. Ellas revelan bajo consumo de frutas, verduras y preferencia por los alimentos preparados fritos. Los niños reciben alimentos diferentes a la leche materna antes de los cuatro meses y algunos de ellos desde que nacen. Las dificultades que las madres reportan para tener una lactancia materna exitosa están relacionadas con inadecuadas técnicas de amamantamiento o por desconocimiento sobre esta.

Ante la situación anterior, se recomienda a las autoridades municipales, diseñar políticas, programas y proyectos en alimentación y nutrición, dirigidos a las familias de los corregimientos de Medellín, tendientes a mejorar las prácticas alimentarias y así promover una alimentación saludable y prevenir enfermedades relacionadas con la alimentación y la nutrición. Dicha implementación requiere de las siguiente estrategias: participación de los diferentes sectores del desarrollo, trabajo interdisciplinario, participación comunitaria, sistematización de la experiencia, seguimiento, control y evaluación de cada una de las acciones.

### REFERENCIAS

1. FAO. Concepto de Sistema Alimentario Alcances y Limitaciones. En: Economía Política de los Sistemas Alimentarios en América Latina. Santiago de Chile 1994: 67.
2. Pi pes P. Infant Feeding and Nutrition. In: Nutrition in Infancy and Childhood. Seattle, Washington. De. Mosby, yearbook. 1993: 89
3. República de Colombia. Plan Nacional de Alimentación y Nutrición. 1996- 2005. Santafé de Bogotá, 1996
4. Álvarez MC, González L. Acceso a la Canasta de alimentos por las familias del área rural de la ciudad de Medellín: Indicador de Equidad para la Seguridad Alimentaria y Nutricional. Universidad de Antioquia. Medellín, 1999.
5. Álvarez MC, González L. La Seguridad Alimentaria y Nutricional en las familias del área rural de Medellín: Algunas consideraciones demográficas. En: Agroalimentaria. Venezuela, No10. 2000: 31-41
6. Álvarez MC, González L. Producción de alimentos en el área rural de Medellín y su incidencia en la Seguridad Alimentaria y Nutricional. Universidad de Antioquia. Medellín, 1999. En trámite de publicación en la Revista Cubana de Alimentación y Nutrición.
7. Álvarez MC, González L. La mujer rural de Medellín y su rol en la Seguridad Alimentaria y Nutricional del hogar. Universidad de Antioquia. Medellín, 1999. Aprobado para publicación en próximo número de la Revista Epidemiológica de Antioquia.
8. Maya M. Construcción del modelo alimentario para la zona rural de Medellín. En: Agroalimentaria. Venezuela, No7. 1998: 67-79. 1997: 1. En prensa.
9. World Center Research Fund, American Institute For Research. Food Nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, D.C.: Banta Book Group, 1997.
10. DANE. Proyección de Población para Medellín, Colombia. 1999.
11. O' donnell A. Alimentación en el destete y dieta familiar. En: Nutrición y alimentación del niño en los primeros años de vida. Washington. OPS, 1997: 428.
12. Vemury M. Estudio de hábitos y creencias que afectan la alimentación de la población rural de Colombia. CARE- 198: 116.
13. Ministerio de Salud de Colombia, UNICEF. Plan decenal para la promoción, protección y apoyo a la lactancia materna. Santafé de Bogotá, ed. Carrera 7 Limitada, 1998: 16.
14. PROFAMILIA. Encuesta Nacional de Demografía y Salud. Santafé de Bogotá, 1995: 20.
15. Centro de Documentación sobre Alimentación Infantil y Nutrición Materna. Nuevas investigaciones sobre lactancia materna. En: Madres y Niños. Washington, VOL II, 1992 (1): 4.
16. FES. Lactancia materna en zonas marginadas de grandes ciudades Colombianas, Santafé de Bogotá, 1992: 45.
17. Savage K, Felicite. Porque las madres necesitan ayuda. En: Como ayudarles a las mamas a amamantar. Santafé de Bogotá, ed Gente Nueva, 1987: 11.
18. Lactancia Materna en Colombia en el año de 1981, Lactancia Natural una Revisión de conceptos de 1980, Lactancia Materna en Zonas Urbanas Marginadas de Grandes Ciudades Colombianas de 1991: 45.
19. Ruiz M, PROFAMILIA. Lactancia materna. Niveles, tendencias y diferenciales. Resultados de la ENDS -95, 1995.
20. Osorno J. Problemas tardíos de la madre y el niño. En: Hacia una feliz lactancia materna. UNICEF. 1987: 111.
21. Neira LM. Lactancia para la mujer contemporánea. En: Nutrición normal en el niño, generalidades y conceptos. Santafé de Bogotá, ed. medica internacional limitada, 1999: 63.
22. Instituto de Desarrollo Infantil. La lactancia algo serio. En: La gestación Humana una Mirada Integral. Medellín, ed. Panamericana, 1988: 7-24.
23. Osorno J. Amamantamiento y situaciones especiales del niño. En: Hacia una feliz lactancia materna. UNICEF: 111- 139.
24. Rojas Clara. Alimentación complementaria. En: nutrición normal en el niño, generalidades y conceptos. Santafé de

- Bogotá, ed. medica internacional limitada, 1999: 74.
25. Centro de Atención Nutricional. El paso de la alimentación materna a la alimentación familiar. En: Nutrición y alimentación del niño: Una guía practica para la acción. Medellín, ed. L.Vieco. 1993: 36
  26. Montenegro RC. El hierro. En: Nutrición normal en el niño, generalidades y conceptos. Santafé de Bogotá, ed médica internacional limitada, 1999: 103.
  27. World Center Research Fund, American Institute for Cancer Research. Food Nutrition and the prevention of cancer: global perspective. Washington. D.C.: Banta Book Group, 1997.
  28. Combs GF. The Vitamins: fundamental aspects in nutrition and health. San Diego: Academic, 1994:528.
  29. Álvarez MC y Uscategui RM. Caracterización nutricional de los almuerzos de un día en algunas familias, según estrato socioeconómico, Medellín, 1996. En: Perspectivas en nutrición humana. Órgano de difusión de la Escuela de Nutrición y Dietética de la Universidad de Antioquia. Medellín. Numero 1 (1); 1999: 17-20.

Recibido: 4-02-2001

Aceptado: 26-11-2001

## Consumo de frutas en una población adulta de Costa Rica

*Sonia Guzmán Padilla, Marlene Roselló Araya*

Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (Inciensa), Tres Ríos, Costa Rica

**RESUMEN.** Se describe el consumo de frutas y su relación con el estado de salud y los factores socioeconómicos en una población adulta costarricense. Se realizó un estudio transversal y descriptivo en hombres y mujeres mayores de 18 años de edad. Se seleccionó una urbanización o caserío y en cada una de ellas se seleccionó por afinidad igual, un bloque de diez viviendas. Los datos se recolectaron en Cartago, por medio de encuesta, utilizando la técnica de entrevista directa estructurada la cual se realizó en el hogar en horas de la tarde y los fines de semana, durante el mes de febrero del 2000. De un total de 161 personas, 80% correspondió al sexo femenino. Las mayores de 60 años de edad, de estrato socioeconómico medio-alto y de alta escolaridad, consumen mayor cantidad de frutas al día ( $2,3 \pm 1,0$ ,  $2,50 \pm 1,3$  y  $2,0 \pm 1,3$  porciones respectivamente). No existió diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre las variables estudiadas. Además, contrariamente a lo esperado, aquellas personas que consideraron su estado de salud como malo, las que reportaron enfermedades crónicas, las que practican ejercicio, toman suplementos vitamínicos y las que fuman, consumen mayor cantidad de fruta que los que no presentan estas condiciones, no siendo este resultado estadísticamente significativo. En ambos casos la cantidad de fruta consumida no es adecuada. Se concluye que la cantidad y frecuencia de consumo de frutas en esta población es inadecuada, por lo que sería necesario desarrollar estrategias de educación nutricional donde se promueva el consumo gradual, hasta lograr la meta propuesta por las guías alimentarias de nuestro país.

**Palabras claves:** Sociodemográficos, estado de salud, hábitos alimentarios, patrón de consumo.

### INTRODUCCION

En las diferentes encuestas de Nutrición realizadas en Costa Rica desde 1978, se determinó que los costarricenses no tienen el hábito de consumir frutas o su consumo es menor al indicado por las guías alimentarias, la cual recomienda el consumo de por lo menos tres frutas al día (1). La encuesta de 1982 concluyó que el consumo de frutas continuaba siendo bajo a pesar de existir una disponibilidad satisfactoria de estos alimentos en el país (2).

La Encuesta Nacional de Consumo Aparente de Alimentos, de 1991 mostró que el consumo de frutas fue mayor en el área urbana y en el estrato social alto; y en 1996 las frutas fueron consumidas en 89,9% de los hogares entrevistados (3).

**SUMMARY. Consumption of fruits in an adult Costa Rican population.** The consumption of fruits and its relation with the health and socioeconomic condition of an adult Costa Rican population is described. The study included a cross sectional and descriptive analysis in men and women 18 years old or older. Ten-house blocks were selected by affinity in a community or neighborhood in Cartago. Data were collected in a survey using home direct structured interviews carried out in the afternoons or during the weekend in February, 2000. Eighty percent of the 161 people interviewed were women. Results showed that the higher consumption of fruits was described in women who were older than 60 years old and, who proceed from a medium-high economic stratum or have a high schooling condition ( $2,3 \pm 1,0$ ,  $2,50 \pm 1,3$  y  $2,0 \pm 1,3$  portions, respectively). No statistical significant difference was found in any of the variables evaluated. Data also showed that, in contrast with what it was expected, people that considered their health condition as bad, suffered chronic diseases, practiced physical exercise, took vitamin supplement or smoke, showed a higher consumption of fruits than those who do not have those conditions. The difference, however, showed to be no significant and the consumption of fruit showed to be not adequate in both groups. In conclusion, the amount and frequency of fruit consumption were inadequate in the population studied. The necessity of developing nutritional education strategies to promote a gradual increment in the consumption of fruits to approach the recommendation of the National Alimentary Guidelines is recommended.

**Keywords:** Socio-demographic conditions, health status, alimentary habits, and consumption pattern.

El bajo consumo de frutas lo confirma también un estudio realizado en adolescentes costarricenses donde, 59,5% de la zona urbana y 46,6% de la rural consumen menos de una porción de fruta al día. El consumo de fruta total fue de  $1,73 \pm 0,36$  porción al día, mientras que el de frutas cítricas fue de  $0,35 \pm 0,05$  porciones, igual comportamiento se presentó por zonas geográficas, siendo más alto el consumo en la zona rural que la urbana (4).

En 1994 en la comunidad de la Eulalia, cantón de la Unión, se realizó un estudio sobre los factores de riesgo cardiovascular en la población adulta. Entre los resultados se destacó que el promedio de fibra no alcanzó la recomendación diaria de 30 gramos al día, debido a que el consumo de frutas y vegetales no formaron parte del patrón

diario de alimentación, hábitos que incrementan el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (5).

En Costa Rica, en 1999, las enfermedades cardiovasculares representaron la primera causa de muerte, con una tasa de 11,2 por cada 10 000 habitantes, la cual se incrementa con la edad (6). Diversos factores contribuyen a la aparición de las enfermedades cardiovasculares, entre ellos la inadecuada alimentación, en la que se incluye el bajo consumo de frutas y vegetales (7).

La importancia de incluir frutas en la alimentación diaria, se basa fundamentalmente en las propiedades que éstas presentan, pues las frutas contienen elementos antioxidantes, fibra y vitaminas a las cuales se les atribuye efectos protectores contra enfermedades degenerativas y algunos tipos de cáncer (7-9,15), siempre y cuando se consuma en cantidades mayores (más de tres porciones diarias). Por tal motivo, en las "Guías alimentarias" de Costa Rica, se recomienda el consumo de frutas al menos tres veces por día (10).

Dado lo anterior, en este artículo se describe el consumo de frutas en función de las características socioeconómicas y estado de la salud de la población adulta del Cantón de la Unión.

## MATERIALES Y METODOS

Se realizó un estudio transversal y descriptivo en hombres y mujeres mayores de 18 años de edad, residentes en una población costarricense. Para obtener una muestra representativa se seleccionó una urbanización o caserío y en cada una de ellos se seleccionó por afinidad igual, un bloque de diez viviendas. La investigadora principal recolectó los datos por medio de encuesta, utilizando la técnica de entrevista directa estructurada la cual se realizó en el hogar en horas de la tarde y los fines de semana.

La muestra se obtuvo mediante el método simple al azar, con un nivel de significancia de 5% y un error de 10%. Por lo tanto, la muestra fue de 96 personas. Con el fin de compensar la posible pérdida de información por efecto de diseño, se incrementó en un 50%, o sea 144 personas por entrevistar.

Las personas entrevistadas en cada vivienda, se seleccionaron por medio de la hoja de ruta, obtenida al levantar un listado consecutivo en forma descendente, de mayor a menor edad, de todas las personas adultas que vivían en cada casa. Fueron entrevistadas las personas anotadas en los números marcados según punto de arranque, el cual se seleccionó al azar en forma aleatoria y correspondió al número dos.

Para la recolección de los datos se diseñó un cuestionario, validado previamente en un grupo de individuos de la misma comunidad y con características semejantes a la muestra del estudio, el cual incluyó características sociodemográficas, estado de salud y hábitos referentes al consumo de frutas, categorizadas de la siguiente manera:

**Características sociodemográficas:** Se incluyeron edad, sexo, estado civil, años de estudio, trabajo remunerado, ocupación, número de personas que habitan en la casa, número de miembros que trabajan, tenencia de vivienda e índice de artefactos eléctricos el cual se elaboró con la ponderación de cada uno de los artefactos obteniendo un puntaje por medio de una suma de la tenencia de éstos (12). Con las variables años de estudio, trabajo remunerado, ocupación e índice de artefactos, se elaboró el índice socioeconómico dividido en dos categorías: bajo y medio-alto

**Estado de salud:** Se confeccionó un índice con cinco preguntas relacionadas con la salud (percepción de la salud y presencia de enfermedades crónicas) y estilo de vida (ingesta de suplementos, fumado y práctica de actividad física) de los participantes. Se otorgó un mismo peso a cada variable y se elaboró una escala de 0 a 6 puntos (a menor puntuación, mejor estado de salud), posteriormente se elaboraron tres categorías: malo, bueno y excelente.

**Frecuencia de consumo:** Se utilizó una frecuencia semicuantificada de consumo usual (mensual, semanal y diario) de frutas durante el mes anterior a la entrevista. Se clasificaron las frutas en frescos naturales (bebida preparada con pulpa de fruta, agua o leche y azúcar), banano, frutas cítricas (naranja, limón ácido, cas, piña, mandarina, melón, fresas, mora) y frutas no cítricas (papaya, sandía, guayaba, manzana, pera, uvas, melocotones).

**Consumo de frutas:** Las personas entrevistadas reportaron el consumo de fruta diaria en unidades caseras, que posteriormente se unificaron en porciones. Para este estudio una porción de fruta equivale a media taza, o una tajada o una unidad mediana o 100 gramos.

El procesamiento y análisis de datos se realizó con el programa Epi-Info versión 6.0. Se obtuvo estadística descriptiva, expresada como proporciones para las variables categóricas y promedios con desviación estándar para las variables continuas.

## RESULTADOS

Se obtuvo una muestra de 161 personas, de las cuales el 80% (129) eran de sexo femenino. La edad promedio fue de  $37,8 \pm 13,6$  años, y la edad modal de 18 años (rango 18-72 años), el 52% se ubicó en el grupo etáreo de 21 a 40 años.

### Características sociodemográficas

Los datos socioeconómicos obtenidos en las 161 personas encuestadas permiten concluir que 57% de la población posee una escolaridad de media a alta, 60% de las personas no trabaja remuneradamente y 62,7% se ubicó en

el estrato bajo según el índice socioeconómico.

Según los factores sociodemográficos estudiados, se identificó que las personas mayores de 61 años y del estrato socioeconómico medio-alto, presentaron mayor consumo de frutas al día. Por el contrario, las personas menores de 20 años, de baja escolaridad y los solteros, indicaron menor consumo. En todos los casos anteriores, las mujeres reportaron consumir mayor cantidad de frutas que los hombres, pero no hubo una diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabla 1).

**TABLA 1**  
Consumo de frutas por sexo según factores sociodemográficos y de salud de la población adulta del cantón de La Unión, 2000

Factores sociodemográficos	n	Total x ± DS	Hombres x ± DS	Mujeres x ± DS
<b>Grupo de edad</b>				
≤ 20 años	15	1,70 ± 1,03	1,25 ± 0,50	1,86 ± 1,14
21-40 años	84	1,71 ± 1,29	1,35 ± 1,10	1,82 ± 1,33
41-60 años	47	1,86 ± 1,58	1,90 ± 1,60	1,86 ± 1,60
≥ 61 años	15	2,30 ± 1,00	2,33 ± 1,53	2,29 ± 0,92
<b>Escolaridad</b>				
baja	69	1,75 ± 1,46	1,60 ± 1,26	1,78 ± 1,50
media	60	1,77 ± 1,22	1,43 ± 1,13	1,88 ± 1,24
alta	32	2,00 ± 1,30	1,57 ± 1,27	2,12 ± 1,31
<b>Estado civil</b>				
solteros	45	1,51 ± 1,19	1,18 ± 0,75	1,62 ± 1,30
casados/ unión libre	104	1,91 ± 1,40	1,61 ± 1,26	1,98 ± 1,43
separados/ viudos	12	2,00 ± 1,21	2,50 ± 2,12	1,90 ± 1,10

Valores expresados como promedio ± desviación estándar.  
Datos en porciones (1 porción= ½ taza o 1 tajada o 1 unidad mediana o 100 gramos de fruta)

**Salud**

En cuanto a la presencia de enfermedades crónicas, la hipertensión arterial fue reportada en el 19% de los entrevistados, seguida por la hipercolesterolemia (13%); ambas se presentaron en mayor proporción en varones ( $p > 0,05$ ). La obesidad fue más acentuada en las mujeres (12%). En el caso de la diabetes mellitus, se evidenció sólo en las mujeres (4,3%), y con respecto al estilo de vida, 22% manifestó que tomaba suplementos vitamínicos, 12,4% eran fumadores y 45,3% reportó realizar ejercicio. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres únicamente en la práctica de ejercicio.

El 92,5% percibe su salud de bueno a excelente, sin embargo, las personas que percibían su estado de salud malo, informaron que padecían entre cuatro y cinco enfermedades crónicas no transmisibles relacionadas con la nutrición.

Las personas que percibían su salud como mala, los que reportaron padecer enfermedades crónicas, los que practican ejercicio y los que toman suplementos vitamínicos, así como

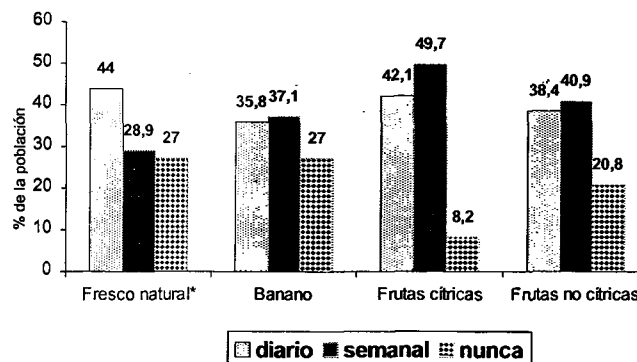
los fumadores, consumen más frutas que los que no tienen estas condiciones ( $\geq 1,90$  porciones), se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los fumadores y los que toman suplementos vitamínicos entre sexo. A excepción de los que padecen enfermedades crónicas, las mujeres reportaron un mayor consumo con respecto a los hombres; no hubo diferencias estadísticamente significativas.

**Frecuencia de consumo de frutas**

El 91% de los entrevistados compra fruta semanalmente. Del porcentaje de personas que compran frutas, sólo el 83,9% (n=135) reportó que come fruta y de éstos, únicamente 40% (n=64) la consume a diario. Cerca del 60% de los participantes prefiere consumir las frutas a media mañana. Con respecto a la cantidad de dinero que destinan para la compra de frutas, solamente el 35,5% presupuesta, en promedio 2400 colones (\$7,5) por semana.

Diariamente, las frutas consumidas en frescos naturales y las frutas cítricas son las que se consumen con más frecuencia. Este comportamiento es diferente por semana, donde las frutas cítricas y no cítricas son consumidas por más del 40% de la población (Figura 1).

**FIGURA 1**  
Frecuencia de consumo por grupo de frutas, en la población adulta del cantón de La Unión



\* Fresco natural: bebida preparada con pulpa de fruta, agua o leche y azúcar

**Consumo de frutas**

El consumo promedio de fruta diario fue de 1,81±1,34 porciones, el 71,0% de las personas consumen menos del promedio. Los hombres consumen menos porciones fruta que las mujeres (1,52±1,17 y 1,88±1,37 respectivamente). Con respecto a la cantidad consumida, el 33% de los entrevistados manifestó que aumentan el consumo de frutas los fines de semana, 33% mantiene la cantidad y 33% reportó que su consumo disminuye.

Con respecto a los indicadores elaborados, las personas de estrato socioeconómico medio-alto y las clasificadas en el estado de salud malo y excelente tienen mayor consumo de frutas, superando incluso el promedio, en ambos casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre categorías (Tabla 2).

**TABLA 2**  
Consumo de frutas por sexo, según índice socioeconómico y de salud, de la población adulta del cantón de La Unión, 2000

Índice	Mujeres x ± DE	Hombres x ± DE	n	Total x ± DE	p
<b>Socioeconómico</b>					
Estrato bajo	1,50 ± 0,79	1,68 ± 1,41	101	1,65 ± 1,32	0,000
Estrato Medio/alto	2,05 ± 1,92	2,60 ± 1,27	60	2,50 ± 1,28	
<b>Estado de salud</b>					
excelente	2,00 ± 1,18	3,00 ± 0,00	16	2,06 ± 1,17	0,036
bueno	1,17 ± 1,18	1,50 ± 1,16	132	1,71 ± 1,18	
malo	3,36 ± 3,09	1,00 ± 1,41	9	2,83 ± 2,92	

p\* Diferencia entre categorías

Datos en porciones (1 porción= ½ taza o 1 tajada o 1 unidad mediana o 100 gramos de fruta)

## DISCUSION

El porcentaje de participantes que reportaron consumir frutas es similar al obtenido en la III Encuesta de Consumo Aparente de Alimentos realizada en 1996 (84% y 89%, respectivamente). Sin embargo, se debe considerar que el presente estudio contempló el consumo y disponibilidad de todas las frutas, mientras que la encuesta de 1996, se limitó a papaya, piña, naranja y limón ácido, por ser las frutas que se encuentran disponibles todo el año; esto no permite una comparación en cuanto a consumo (13).

A pesar que el 84% de la población consume fruta, la mayoría reportó consumir menos de dos porciones al día, situación que preocupa en salud pública, pues las frutas contienen elementos antioxidantes, a las cuales se les atribuye efectos protectores contra enfermedades degenerativas y algunos tipos de cáncer (7-9,15), siempre y cuando se consuma en cantidades mayores (más de tres porciones diarias), según las metas establecidas en las guías alimentarias para Costa Rica (14).

En este estudio, se encontró que las personas acostumbran consumir frutas a media mañana, situación que puede estar influenciada por hábitos adquiridos en la edad escolar, pues los padres incluyen frutas en la merienda de sus hijos, y pareciera que esta conducta se repite con el tiempo.

Otros estudios mencionan que existe relación entre el consumo de frutas y los ingresos económicos, datos que

conducen con los encontrados en esta investigación. Así mismo las mujeres, las personas con alta escolaridad, las casadas y los de más edad, se da un mayor consumo de frutas, similar a lo encontrado en la población de La Unión (15-17).

El estado de salud autorreferido por los participantes fue catalogado de bueno a excelente; sin embargo, reportaron la presencia de varios factores de riesgo cardiovascular, datos similares a los encontrados en otro estudio realizado en 1996 en este cantón (5). Los casos de diabetes mellitus encontrados en este estudio correspondieron a las mujeres, en un 4,3%, cifra similar a la reportada en la encuesta realizada para la población del cantón de Desamparados (4,2%) y mayor a la reportada en la Encuesta Nacional de Hogares de 1998 (2,8%) (18) Es importante mencionar que el 71,1% de las diabéticas no consume frutas, contrario a lo reportado en un estudio efectuado en Tibás, donde un 48% no consumía fruta, porcentaje que se logró disminuir luego de una intervención educativa (19).

Hubo un mayor consumo de frutas en las personas que calificaron su salud como malo y en los que manifestaron tener enfermedades crónicas. Una posible explicación puede ser que las personas por su condición de salud o por indicación médica, se ven obligadas a modificar sus hábitos de alimentación entre los cuales se incluye aumentar el consumo de frutas.

A pesar de que Costa Rica cuenta con una buena disponibilidad de frutas, en esta población, la cantidad y la frecuencia de consumo no son adecuadas. Los datos concuerdan con los reportados en el estudio de Monge (4), donde se hace evidente que es necesario trabajar con poblaciones más jóvenes y desarrollar estrategias de educación nutricional y campañas de divulgación, en donde los proveedores de salud promuevan el consumo gradual de fruta, en grupos escolares y adolescentes, hasta lograr la meta propuesta por las guías alimentarias de nuestro país.

## REFERENCIAS

1. Díaz C, Brenes H, Córdoba M, García P, Quirós J. Encuesta nutricional antropométrica y de hábitos alimentarios en Costa Rica. San José. Costa Rica. 1978.
2. Ministerio de Salud; 1986. Encuesta Nacional de Nutrición. Evaluación dietética 1982. San José. Costa Rica.
3. Rodríguez N, Meza N. Fascículo de Consumo Aparente. II Encuesta Nacional sobre consumo aparente de alimentos. Ministerio de Salud. Costa Rica. 1996.
4. Monge R, and Beita O. Prevalence of coronary heart disease risk factors in Costa Rican Adolescents. *Adolescents Health*, 2000; 27:210-217.
5. Roselló M, Vargas M, Jiménez J. Evaluación de factores de riesgo cardiovascular en una población adulta. *Rev Costarr. Cienc Méd.* 1996;17(1): 23-33.

6. Ministerio de Salud. Memoria anual 1999. [San José, Costa Rica]. Ministerio de Salud,. 2000.
7. Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease: The Framingham study. *Ann Inter Med* 1984; 76 (2A): 4-12.
8. Steinmetz K, Potter J. Vegetables, fruit and cancer prevention: A review. *J Am Diet Assoc.* 1996;96(10): 1026-1035.
9. Jones C. Vegetables and fruits. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. World Cancer Research Fund American Institute for Cancer Research. 1997.
10. Ministerio de Salud. Guías alimentarias para la educación nutricional en Costa Rica. San José. 1998.
11. Parra S, Fernández M, Vandale S, López L. Fibra dietética y tumores gastrointestinales, implicaciones para la población mexicana. *Arch Latinoamer Nutr.*1994;44 (2):76-81.
12. Madrigal J. La construcción de índices. Escuela de Estadística. Universidad de Costa Rica. 1997.
13. OMS/OPS. Informe de Costa Rica. Conferencia Internacional de Nutrición, San José. Costa Rica. 1992.
14. Rodríguez N, Araúz A, Meza N, Roselló M. La dieta como factor de riesgo de la enfermedad cardiovascular en habitantes del área metropolitana. San José, Costa Rica. *Arch Latinoamer Nutr.* 1992;41(3): 350-362.
15. Weisburges J. Nutritional approach to cancer prevention with emphasis on vitamins, antioxidants and carotenoides. *Am J Clin.* 1991;53: 194-200.
16. Trudeau E, Kristal A, Sue Li, Patterson R. Demographic and psychosocial predictors of fruit and vegetable intakes differ: Implications for dietary interventions. *J Am Diet Assoc.* 1998;96 (10):1412-1417.
17. Havas S, Treiman K, Langenberg P, Ballesteros M, Anliker J, Damron D, Feldman R. Factors associated with fruit and vegetable consumption among women participating in WIC. A review. *J Am Diet Assoc.* 1998;98 (10): 1141-1147.
18. Morice A, Roselló M, Araúz A, Sánchez G, Padilla G. Diabetes mellitus en Costa Rica: Un análisis interdisciplinario. Tres Ríos, Costa Rica. Serie de documentos técnicos. 1999.
19. Araúz A, Roselló M, Padilla G, Rodríguez O, Jiménez M, Guzmán S. Modificación de prácticas alimentarias en diabéticos no insulino dependientes: efectos de una intervención educativa interdisciplinaria. *Rev Cost Cienc Méd.* 1997;18 (1): 15-29.

Recibido: 19-06-2001

Aceptado: 15-01-2002

## Aislamiento de bacterias gram positivas de leche cruda con residuos de antimicrobianos

José Faría Reyes, Aleida García Urdaneta, Pedro Izquierdo Corser, María Allara Cagnasso, Kutchynskaya Valero Leal

Universidad del Zulia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Estado Zulia-Venezuela

**RESUMEN.** Se recolectaron 200 muestras de leche cruda a nivel de cántaras en receptorías ubicadas en tres zonas de alta producción lechera del estado Zulia-Venezuela. Se aplicaron las pruebas del cloruro de trifetil tetrazolio (CTT) y el disco ensayo para detectar presencia de antimicrobianos. Las muestras positivas se sembraron en caldo soya tripticasa, agar sangre humana y agar manitol salado para realizar el aislamiento de bacterias Gram positivas. La identificación de especies se realizó a través de pruebas bioquímicas. Se encontró que 45 muestras (22,5%) de leche analizadas contenían antimicrobianos, obteniéndose crecimiento bacteriano en 35 de ellas. Se aislaron 100 cepas, que se distribuyeron en los siguientes géneros: 44 *Staphylococcus*, 19 *Streptococcus*, 17 *Enterococcus*, 9 *Bacillus*, 4 *Micrococcus*, 4 *Corynebacterium* y 3 *Lactococcus*. La especie más frecuentemente aislada fue el *S. aureus*, principal agente productor de mastitis bovina en el estado Zulia, y microorganismo frecuentemente asociado en el país con intoxicaciones alimentarias vehiculizadas por queso elaborado con leche cruda. Se recomienda aplicar programas de control para el uso de antibióticos.

**Palabras clave:** Leche cruda, antimicrobianos, bacterias Gram positivas.

**SUMMARY. Isolation of Gram-positive bacteria from raw milk with antimicrobial residues.** Two hundred samples of raw milk were collected at the receiving plants located in three areas of high milk production in Zulia state, Venezuela. The CTT test and trial disk were used in order to detect the presence of antimicrobials. The positive samples were inoculated in tripticase soy broth, human blood agar and manitol salt agar in order to isolate Gram-positive bacteria. The identification of species was performed through biochemical tests

It was found that 45 samples (22,5%) of analyzed milk contained antimicrobials, and bacterial growth was obtained in 35 of them. 100 strains were isolated namely: 44 *Staphylococcus*, 19 *Streptococcus*, 17 *Enterococcus*, 9 *Bacillus*, 4 *Micrococcus*, 4 *Corynebacterium* and 3 *Lactococcus*. The most frequently isolated specie was *S. aureus*, the main producing agent of bovine mastitis in Zulia state, a microorganism frequently associated in the country to food-borne intoxications, associated to cheese processed from raw milk. It is recommended to apply control programs for the use of antibiotics.

**Key words:** Raw milk, antimicrobial, Gram-positive bacteria.

### INTRODUCCION

La presencia en leche de residuos de productos farmacológicos utilizados como medio terapéutico o profiláctico, reviste gran importancia por los efectos que éstos producen en la salud del consumidor, la inhibición de cultivos utilizados en la manufactura de productos lácteos fermentados, y la selectividad de poblaciones microbianas resistentes (1-4).

En muchos países esta situación ha sido reglamentada, la Comunidad Económica Europea considera ilegal la presencia de residuos de antimicrobianos en leche destinada al consumo humano, y penaliza con multas a los productores que incurren en ello (5). Por su parte, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación/ Organización Mundial de la Salud y la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América, establecen concentraciones de residuos aceptables, consideradas como niveles seguros para el consumo humano (6,7). Estas

reglamentaciones, así como la puesta en práctica de programas de vigilancia, han tenido resultados beneficiosos (8).

En Venezuela, no se dispone de una reglamentación específica para los límites permisibles de antimicrobianos en leche, tampoco se aplican programas de control, y peor aun, en muchos casos no se realiza la práctica común de retiro de la leche proveniente de animales que se encuentran bajo tratamiento, siendo por tanto probable que una parte importante de la leche cruda producida en el país se encuentre contaminada con residuos de antimicrobianos, los cuales podrían estar ejerciendo una presión selectiva hacia la presencia en ésta de bacterias patógenas antibiótico-resistentes.

La pasteurización es el proceso más frecuentemente utilizado para la destrucción de la flora patógena de la leche; sin embargo en algunos casos no es aplicado. En el país, un 55% de la leche que se produce se destina a la elaboración de quesos, y cerca de un 40% de ésta es usada cruda en la

producción de queso artesanal (9). Por otra parte, se ha demostrado que la pasteurización no afecta la concentración de un antimicrobiano en leche, y sólo en algunos casos modifica su actividad (10,11).

Dentro del grupo de bacterias Gram positivas que suelen aislarse de leche cruda se encuentran los principales agentes etiológicos causantes de la mastitis bovina, así como especies implicadas en numerosos brotes de enfermedades alimentarias (12,13).

El objetivo de esta investigación fue realizar el aislamiento e identificación de bacterias Gram positivas presentes en leche cruda, producida en el estado Zulia-Venezuela, en aquellas muestras que resultaron positivas a la prueba de detección de residuos de antimicrobianos.

## MATERIALES Y METODOS

**Muestras de leche:** Las muestras consistieron en 25 ml de leche cruda recolectada en forma aséptica en frascos de vidrio esterilizados, a nivel de cántaras, en receptorías ubicadas en tres zonas de alta producción lechera del estado Zulia, entidad donde se genera el 40% del total nacional. De El Laberinto, municipio Jesús Enrique Lossada, provinieron 88 muestras, 62 de Machiques de Perijá y 50 de la Costa Oriental del Lago de Maracaibo (COL), para un total de 200 muestras. La leche fue transportada bajo refrigeración, en un tiempo no mayor a 3 horas, hasta el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, donde fueron analizadas.

**Detección de antimicrobianos:** Se utilizaron dos métodos para la detección de antimicrobianos en las muestras de leche analizadas, el método de óxido-reducción con cloruro de trifeníl tetrazolio (CTT) (Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio) y *Streptococcus thermophilus* (14), y el método del disco ensayo propuesto por la AOAC (15), utilizando el *Bacillus stearothermophilus* variedad *calidolactis* (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA). Se consideraron muestras de leche con presencia de antimicrobianos aquellas que dieron resultado positivo a las dos pruebas aplicadas.

**Análisis microbiológicos:** Para el aislamiento de las bacterias una alícuota de las muestras de leche fue sembrada en caldo soya tripticasa, agar sangre humana y agar manitol salado. Para identificar los *Micrococcus* y *Staphylococcus* se caracterizaron las colonias aisladas del agar sangre humana compatibles con los miembros de la familia Micrococaceae, y a las colonias de *Staphylococcus* recuperadas del agar manitol salado, de acuerdo a su morfología, producción de hemólisis y tinción de Gram.

Las colonias aisladas se sembraron en agar nutritivo

(cepario) y posteriormente la diferenciación se realizó mediante pruebas bioquímicas de glucosa, coagulasa, manitol y Dnasa. La identificación hasta especie se realizó utilizando pruebas de azúcares, descarboxilación de ornitina, urea y Voges-Proskauer. Para identificar cocos Gram positivos, catalasa negativa se realizaron las siguientes pruebas: susceptibilidad a bacitracina, disco de optoquina, test de camp, producción de hemólisis en agar sangre de carnero, prueba de crecimiento en bilis e hidrólisis de la esculina y crecimiento en caldo salado (6,5% de NaCl). También se aplicaron pruebas de utilización de azúcar, descarboxilación de arginina y piruvato, urea, Voges-Proskauer, motilidad y agar sangre telurito.

Para identificar *Bacillus* se aplicaron pruebas complementarias como catalasa, glucosa, reducción de azúcares, motilidad, hemólisis, indol, citrato, Voges-Proskauer y urea.

En el caso de *Corynebacterium* además de las pruebas de fermentación de azúcares y producción de ureasa se aplicó reducción de nitratos.

Todos los análisis microbiológicos se realizaron utilizando principalmente medios de la casa BBL (BBL Microbiological System, Cockeysville, MD), así como las metodologías propuestas por la ICMSF (16).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se presentan los resultados de las pruebas del cloruro de trifeníl tetrazolio (CTT) y el disco ensayo (DE), utilizadas en la detección de residuos de antimicrobianos en las muestras de leche provenientes de El Laberinto, Machiques y la Costa Oriental del Lago (COL) de Maracaibo. En ésta se observa que en las muestras de leche de El Laberinto se encontró el mismo número de resultados positivos al utilizar el CTT y el DE; mientras que, en las muestras de leche provenientes de Machiques y la COL el número de resultados positivos fue mayor con el CTT.

TABLA 1

Resultados de las pruebas de detección de residuos de antimicrobianos aplicadas a las muestras de leche cruda producida en el estado Zulia-Venezuela

Origen	N	Muestras positivas a CTT(1)	Muestras positivas a DE(2)	Porcentaje muestras Positivas
El Laberinto	88	14	14	16
Machiques	62	15	10	16
La COL(3)	50	23	21	42
Total	200	52	45	23

1 CTT= Prueba del Cloruro de Trifenil Tetrazolio. 2 DE = Disco Ensayo de la AOAC. 3 COL= Costa Oriental del Lago de Maracaibo. Edo. Zulia-Venezuela

Diversas investigaciones (1,17,18), han demostrado que las pruebas microbiológicas comúnmente utilizadas para la detección de residuos de antimicrobianos presentan diferencias en los límites de detección; y que además, los microorganismos utilizados como indicadores, generalmente difieren en los niveles de concentración inhibitoria mínima. Es probable que el mayor número de muestras positivas encontradas con el CTT se haya debido a su mayor sensibilidad para detectar la presencia de diferentes inhibidores microbianos. Es importante resaltar que las diversas pruebas disponibles para la detección de residuos de antibióticos, casi siempre tienen una sensibilidad por debajo de los límites permisibles establecidos en las normativas de diversos países.

De las tres regiones consideradas se encontró la mayor incidencia de residuos de antimicrobianos en la leche de la COL (42%). Este resultado coincide con un estudio previo realizado por Rivero y col.(19), donde al analizar muestras de leche cruda proveniente de Maracaibo y la COL se encontró para esta última un resultado positivo en 68,6% de las muestras.

La prevalencia global encontrada (23%), puede considerarse bastante elevada al compararse con valores reportados para otros países latinoamericanos como Barbados (8%), Jamaica (10%) y Costa Rica (0%)(2). Resultado que hace evidente la existencia de un serio problema de salud pública, por ser la leche un alimento de alto valor nutritivo y de amplio consumo por parte de una población particularmente vulnerable como los niños.

Diversos factores han sido asociados con este problema; sin embargo, se ha reconocido que el cumplimiento del tiempo mínimo de retiro de la leche proveniente de animales que se encuentran bajo tratamiento, suele proveer de un alto grado de seguridad al consumidor, a pesar de lo cual en muchas regiones del país esto no es puesto en práctica, lo que probablemente se deba, en algunos casos, al desconocimiento de las consecuencias, y en otros, a las pérdidas económicas que esto implicaría para los productores.

De las 45 muestras con residuos de antimicrobianos, se obtuvo crecimiento de bacterias Gram positivas en 35 de ellas (Tabla 2), esto podría deberse, a que el nivel del inhibidor presente no era lo suficientemente elevado para impedir el crecimiento, o al desarrollo de resistencia frente al inhibidor por parte de esta flora microbiana. Es evidente, que además de los problemas comúnmente asociados con la presencia de residuos de antimicrobianos en leche, estos también pueden afectar la utilidad de los resultados de los análisis microbiológicos como indicadores de la calidad higiénico sanitaria de la leche, debido a la alteración de los mismos.

TABLA 2

Muestras de leche con residuos de antimicrobianos que presentaron crecimiento de bacterias gram positivas

Origen	Muestras con antimicrobianos(1)	Muestras con crecimiento
El Laberinto	14	13
Machiques	10	10
La COL	21	12
Total	45	35

1 Muestras positivas al CTT y Disco Ensayo.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del aislamiento e identificación de géneros y especies Gram positivas presentes en las muestras de leche con residuos de antimicrobianos. Se observó un claro predominio de los *Staphylococcus* frente a los demás géneros, al pertenecer a éste 44 de las 100 cepas aisladas, seguido por los *Streptococcus* y *Enterococcus*, con 19 y 17 cepas, respectivamente, y en un menor número *Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* y *Lactococcus*. Escasa información se reporta en la literatura sobre los géneros y especies predominantes en la flora microbiana de la leche cruda producida en el estado Zulia, con o sin residuos de antimicrobianos.

La especie encontrada en mayor número fue el *S. aureus*, principal agente etiológico en la producción de mastitis bovina en el estado Zulia (12,20), y agente causal de numerosas intoxicaciones alimentarias en el país vehiculizadas por quesos elaborados con leche cruda (13, 21). Aun cuando son numerosos los factores relacionados con la efectividad de los antibióticos en el tratamiento de la mastitis causada por estafilococos, se ha reconocido que ésta puede ser menor a causa de la tolerancia y adaptabilidad que han demostrado frente a varias drogas antibacterianas, lo cual, de acuerdo a algunos autores, pudiera estar siendo favorecido por la presencia en leche de residuos de antibióticos y antimicrobianos.

Brady y col. (22), demostraron que hasta los niveles de concentración considerados por la FDA como seguros, tienen un fuerte potencial para la selectividad de poblaciones resistentes, señalando en otro estudio (23), que la exposición de *S. aureus* ATCC 9144 por 14 días a niveles residuales de una mezcla de oxitetraciclina, tylosina, penicilina y virginiamicina, provocó un incremento en la concentración inhibitoria mínima. Es importante resaltar que en el estado Zulia la oxitetraciclina es un antibiótico de primera elección en el tratamiento de la mastitis bovina.

Por otra parte, dicha selectividad e incremento de resistencia, pudiera provocar un aumento de casos de intoxicaciones alimentarias causadas por estafilococos, por

cuanto las cepas antibiótico resistentes de *S. aureus* son capaces de producir toxinas con mayor frecuencia que las cepas sensibles (24).

**TABLA 3**  
Géneros y especies Gram positivos aislados de las muestras de leche cruda con residuos de antimicrobianos

Genero	Nº	Especies identificadas	Total de cepas para el género
<i>Staphylococcus</i>	15	<i>S. aureus</i>	44
	12	<i>S. haemolyticus</i>	
	6	<i>S. Intermedius</i>	
	4	<i>S. schleiferi</i>	
	3	<i>S. hyicus</i>	
	2	<i>S. lugdunensis</i>	
	2	<i>S. epidermidis</i>	
<i>Streptococcus</i>	10	<i>S. bovis</i>	19
	6	<i>S. Mitis</i>	
	2	<i>S. mutans</i>	
	1	<i>S. equinus</i>	
<i>Enterococcus</i>	7	<i>E. avium</i>	17
	4	<i>E. faecium</i>	
	2	<i>E. faecalis</i>	
	2	<i>E. durans</i>	
	1	<i>E. raffinosus</i>	
<i>Bacillus</i>	1	<i>E. solitarius</i>	9
	4	<i>B. circulans</i>	
	3	<i>B. cereus</i>	
	1	<i>B. Firmus</i>	
<i>Micrococcus</i>	1	<i>B. alvei</i>	4
	3	<i>M. varians</i>	
<i>Corynebacterium</i>	1	<i>M. luteus</i>	4
	4	<i>C. pseudotuberculosis</i>	
<i>Lactococcus</i>	2	<i>L. lactis</i>	3
	1	<i>L. cremoris</i>	
Total general			100

También se encontraron en la leche cepas de *S. haemolyticus*, *S. hyicus* y *S. epidermidis*, que han sido reconocidos como patógenos oportunistas capaces de adquirir genes de resistencia a los antibióticos (25).

De acuerdo con algunas investigaciones los *Streptococcus* ocupan el segundo lugar de prevalencia como agentes etiológicos de la mastitis bovina en la cuenca del lago de Maracaibo (20), siendo implicados principalmente las

especies *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, las cuales no fueron aisladas de las muestras de leche analizadas en este estudio. El *S. bovis*, especie encontrada en mayor número dentro del género, se ha aislado del tracto digestivo de vacas y otros rumiantes y también se ha encontrado en gran proporción en heces humanas, lo que podría corresponderse con la baja calidad higiénico sanitaria que ha sido reportada para la leche producida en el estado Zulia (26).

Los *Enterococcus* por provenir del tracto intestinal del hombre y los animales suelen usarse como indicadores de contaminación fecal de los alimentos (27). También se les reconoce como la especie responsable del 10 al 15% de la endocarditis bacteriana, con una mortalidad de aproximadamente el 20%(28).

La antibioterapia de infecciones enterocócicas severas usualmente depende del efecto sinérgico de la combinación de antimicrobianos, y esto además de encontrarse en cepas de origen hospitalario, ha sido reportado en cepas aisladas de agua y animales como el cerdo, en forma especial para *E. faecalis* (29), la que además ha sido reconocida como una especie propagadora de resistencia a través de la cadena alimentaria. Perreten y col.(30), encontraron que cepas de *E. faecalis*, con resistencia múltiple a los antibióticos, aislada de queso elaborado con leche cruda, transfirió por conjugación genes de resistencia a tetraciclina, al cromosoma de otras cepas de *E. faecalis*, *Lactococcus lactis* subs *lactis* biovar *diacetylactis*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Staphylococcus aureus*, señalando el mismo autor en otro estudio (31) en otro estudio, que también cepas de *E. faeciun* transfieren genes de resistencia a tetraciclina, concluyendo el autor que en la cadena alimentaria del hombre se encuentran genes de resistencia a los antibióticos iguales a los conocidos en especies de origen clínico.

Los *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden llegar a la leche por diversas vías. Una de las especies de este género más aislada es el *B. cereus*, el cual reviste una gran importancia para la industria alimentaria, debido principalmente a la producción de toxinas, la producción de una proteasa extracelular y fosfolipasa que suelen causar deterioro de los alimentos; así como, por la formación de esporas termoresistentes (27,32).

Los *Micrococcus* forman parte de la flora normal de la leche, siendo las especies encontradas en este estudio las aisladas con mayor frecuencia, las cuales además se caracterizan por no ser patógenas.

Dentro de los *Lactococcus* se identificaron el *L. lactis* y *L. cremoris*, que son cepas utilizadas con mucha frecuencia en la elaboración de productos fermentados, diversos estudios han sido realizados con el fin de demostrar como la presencia de residuos de antimicrobianos en leche causan la inhibición de su crecimiento (3,33,34). También se ha comprobado que el *Lactococcus lactis* aislado de queso elaborado con leche

cruda, transfiere genes de resistencia a estreptomicina, tetraciclina y cloramfenicol (35), este último antimicrobiano, al cual se le atribuye que sus residuos en leche podrían aumentar la aparición de resistencia bacteriana en las personas, ha sido retirado en muchos países de la línea veterinaria por la inducción de anemia aplásica en individuos susceptibles, considerándose su presencia en leche potencialmente letal para el consumidor.

Los resultados encontrados en esta investigación hacen evidente la necesidad de realizar investigaciones tendientes a determinar la prevalencia, tipo y concentración de los antimicrobianos presentes en la leche cruda producida en el país, con el fin de establecer las bases para el desarrollo de las normativas legales; así como la aplicación de programas de control para el uso racional de los antibióticos.

### AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia por el soporte financiero para la realización del presente estudio.

### REFERENCIAS

1. Sischo WM. Quality milk and test for antibiotic residues. *J Dairy Sci.* 1996; 79(6): 1065-1073.
2. Baynes RE, Lyman R, Anderson KL, Brownie CF. A preliminary survey of antibiotic residues and viable bacteria in milk from three caribbean basin countries. *J Food Prot.* 1999; 62(2):177-180.
3. Oh SJ, Lim KS, Huh CS, Baek YJ. Effects of antibiotic residues on the growth of lactic culture in milk. *Korean J Dairy Sci* 1996; 18(1):25-30.
4. Rodrigues R, Cerqueira, MM, Rubinich J, Fonseca CM. Antibiotic residues detection in milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 1993; 45(4): 419-426.
5. Heeschen WH. Hygienic quality requirements for raw milk and dairy products and their production, manufacture and sale in the European Community. *Milchwirtschaftliche* 1992; 112: 117-129.
6. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/ Organización Mundial de la Salud. *Codex Alimentarius Vol. 1-7, Secretaria del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias*, FAO. Roma, 1994.
7. Stribling JH. Animal drug requirements of the federal food, Drug and cosmetic act. In: *Proceedings of the Symposium on Animal Drug Use-Dollar and Sense*. Stefan, G.E editor. Center for Veterinary Medicine, Food and Drug Administration, Rockville, 1987 Maryland, 29-36.
8. Barbano D. Raw milk quality: milk quality improvement in the United States. *Aust. J Dairy Tech.* 1992; 47(2):89-90.
9. CAVEPAS. *Sistema Lácteo Venezolano. Flujo Físico* 1998. Venezuela, 1999 Caracas.
10. Shahani K, Gould L, Weiser H, Slatter W. Stability of small concentrations of penicillin in milk as affected by heat treatment and storage. *J Dairy Sci.* 1956; 39:971-977.
11. Shahani K. The effect of heat and storage on the stability of aureomycin in milk, buffer and water. *J Dairy Sci.* 1957; 40:289-296.
12. Alonso FR. Prevalencia de mastitis subclínica bovina en la Cuenca del Lago de Maracaibo I. Porcentaje de prevalencia y caracteres de la infección. *Las Jornadas Nacionales sobre Ganadería de Doble Propósito. Machiques- Perija.* 1977 Enero 12-16.
13. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social (MSAS). *Oficina de Higiene de los Alimentos.* 1998 Maracaibo, edo Zulia-Venezuela.
14. Hands A. Assay of inhibitory substances. *J Soc Dairy Tech.* 1989; 42 (4):92-93.
15. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis.* 15th Edition. 1990 Washington, DC.
16. *International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganismos en alimentos I. Su significancia y métodos de enumeración.* Edición en Lengua Española. Editorial ACRIBIA. 1983 Zaragoza-España.
17. Gandino L, Chiappetta G. Comparison of rapid methods for determination of beta-lactam antibiotics in milk. *Latte* 1998 23(3):71-74.
18. Senyr GF, Davidson JH, Brow JM, Halltead EP, Sherbon JW. Comparison of rapid test used to detect antibiotic residues in milk. *J Food Prot.* 1990; 53(2): 158-164.
19. Rivero Z, Faría J, Santoro R. Aislamiento de Gram negativos en Leches Crudas con Antibióticos. *Revista Científica FCV-LUZ.* 1994; vol. IV, Nº1:11-16.
20. Jimenez U. Comparación de la Eficacia de la Cefoperazona y la Novobiocina en la Mastitis Bovina sub-clínica. *La Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. Trabajo de Ascenso.* 1992 Venezuela.
21. López N. Valoración de las Normativas Legales Existentes en Venezuela para la Producción de Queso y su Incidencia en los Aspectos Higiénico-Sanitario. *Rev.Fac. Ciens Vets UCV.* 1992; 38(8):64-70.
22. Brady MS, Whitw N, Katz S. Resistance Development Potential of Antibiotic/Antimicrobial Residue Levels Designated as "Safe Levels". *J. Food Prot.* 1993; 56(3): 229-233.
23. Brady MS, Katz SE. In vitro effect of multiple antibiotic/ antimicrobial residues on the selections for resistance in bacteria. *J AOAC Int.* 1992; 75(4):738-742.
24. Zaadhof KJ, Ferplan G. Enterotoxigenicity of Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* cultures isolated from mastitis milk. *XIX International Dairy Congress. Vet. Fac. Univ. of Munich, Federal Republic of Germany.* 1974 May 21:57-59.
25. Perreten V, Grampa N, Schuñer U, Teuber M. Antibiotic resistance genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from food. *Syst. Appl. Microb.* 1998; 21(1):113-120.
26. Boscán L, Faría J, Sánchez MD. Calidad Química y Microbiológica de la Leche en Venezuela. En: *Ganadería Mestiza de Doble Propósito.* Gonzáles Stagnaro Ed. Editorial

- Astro Data. 1era edición. Maracaibo-Venezuela. Cap XXIX 1992; 604-629.
27. Frazier WC, Westhoff DC. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. 3era Edición Española. 1985 Zaragoza, España 521pp.
  28. Contreras R, Teiceira G, Inciarte C, Sanz L, Carmona O. y col. Resistencia de Enterococos a los Antimicrobianos en Venezuela. Bol. Soc. Ven. Microb. 1995; 15(1):11-15.
  29. Knudtson LM, Hartman PA. Antibiotic resistance among Enterococcal isolates from environmental and clinical sources. J Food Prot. 1993; 56(6): 489-492.
  30. Perreten V, Kolloffel B, Teuber M. Conjugal transfer of the Tn916-like Transposon TNF01 from Enterococcus faecalis isolated from cheese to other Gram-positive bacteria. Syst. Applied Microb. 1997; 20(1): 27-38.
  31. Perreten V. Distribution, molecular characterization and genetic mobilization of antibiotic resistance genes in enterococci, staphylococci and lactic acid bacteria isolated from food. Diss Abst. Int. 1996; 57(9) 102pp.
  32. Gilmour A, Rowe MT. Microorganismos Asociados a la Leche. En: Robinson, R.K. editor. Microbiología Lactológica Vol. I. Editorial Acribia. Edición en Lengua Española 1987:33-67.
  33. Champagne CP. Effect of penicillin on free or immobilized lactococci: milk acidification and residual antibiotic level. J. Food Saf. 1992; 12(4): 327-337.
  34. Scheiffmann AP, Schuertz M, Wiesner HU. False negative and positive results in testing for inhibitory substance in milk Y. The influence of antibiotic residues in bulk milk on Lactic acid production of starter cultures. Milchwissenschaft 1992 47(11): 712-715.
  35. Perreten V, Schwarz F, Cresta L, Boeglin M, Dasen G, Teuber M. Antibiotic resistance spread in food. Nat. 1998; 7:801-805.

Recibido: 15-02-2001

Aceptado: 29-10-2001

## Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos

Luis López V, José Romero R y Fernando Ureta V.

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. Santiago de Chile

**RESUMEN.** Existe en el mercado una gran variedad de productos desinfectantes de uso tradicional en la industria alimentaria, como cloro, yodo, amonios cuaternarios y sus respectivos derivados. Sin embargo, han aparecido otros productos alternativos, como el extracto de semilla de toronja, ácido peracético y láctico. En el presente trabajo se analizó la efectividad germicida *in vitro* del extracto de semilla de toronja (400 ppm), ácido peracético (2000 ppm) y ácido láctico (20000 ppm) a los tiempos recomendados por el fabricante y otros tiempos adicionales, frente a microorganismos de prueba, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para cada caso se determinó la cinética de muerte, evaluando la eficacia germicida (%), la velocidad específica de muerte ( $t^{-1}$ ) y el tiempo de reducción decimal (min). De los productos evaluados, el ácido peracético en las condiciones recomendadas por el fabricante, 2000 ppm durante 1 min de acción, presentó los menores tiempos de reducción decimal frente a los microorganismos ensayados. En general y para todos los productos, los microorganismos Gram positivos presentaron una mayor sensibilidad a la acción desinfectante.

**Palabras clave:** Desinfectantes, acción germicida, alimentos.

**SUMMARY.** *In vitro* germicide action of disinfectant products used in the food industry. There is a wide offer of disinfectant products, for the food industry, available in the market, such as chlorine, iodine and quaternary ammonium compounds and their respective derivatives. However, new alternative products have emerged, for instance grapefruit seed extract, and peracetic and lactic acids. The present study was carried out in order to analyze *in vitro* the germicide effect, from the grapefruit seed extract (400 ppm), peracetic acid (2000 ppm) and lactic acid (20000 ppm) at the manufacturer recommended action time, and other additional times. The germicide effect was tested against microorganisms such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa*. In each case, the death kinetic was determined through the evaluation of the germicide effect (%), specific death rate ( $t^{-1}$ ) and the decimal reduction time (min). From the evaluated products, the best germicidal effect at the manufacturer conditions was reached by peracetic acid (2000 ppm) at 1 min, which presented the lower decimal reduction times compared with the other tested microorganisms. Generally speaking, Gram positive microorganisms showed a greater sensibility to the disinfectant action.

**Key words:** Disinfectant , germicide action, foods.

### INTRODUCCION

La mayoría de las plantas elaboradoras de alimentos son diseñadas para ser higiénicas, pero si no se utilizan métodos adecuados de sanitización, los alimentos pueden presentar contaminación microbiológica. Esos microorganismos pueden causar alteración en los alimentos o problemas a la salud de los consumidores (1).

De acuerdo a estudios realizados por el Food and Drug Administration (FDA), respecto a enfermedades transmitidas por alimentos, una de las principales causas de este problema en Estados Unidos, es la sanitización no adecuada de superficies y utensilios para la preparación de alimentos, incluyendo tablas para cortar y cuchillos. Cada año en ese país, alrededor de 33 millones de personas sufren de enfermedades transmitidas por alimentos, de las cuales 9.000 mueren.

El reporte del FDA revela que el 70% de los restaurantes monitoreados, no realiza una sanitización efectiva del equipo

y superficies de trabajo (2).

Existe una gran oferta de productos detergentes y desinfectantes, que en conjunto con adecuados programas de sanitización, ayudarían a prevenir y reducir la contaminación microbiológica. Entre estos se encuentran 3 productos de interés actual, el extracto de semilla de toronja, compuesto complejo, físicamente estabilizado e integrado por elementos naturales y que ha sido aprobado de acuerdo al registro del FDA, USA N° 0013982 (3); el ácido peracético, líquido transparente que se descompone formando agua y ácido acético, no afectando a los alimentos, aprobado por FDA N° 84F0099 (4) y el ácido láctico, que es un líquido viscoso, claro, levemente amarillento y completamente soluble en agua (5).

Por ser estos productos de naturaleza ácida, su acción germicida es atribuible a que afectan el pH del medio, desnaturalizan las proteínas y afectan el funcionamiento de la membrana celular (1,6).

En comparación con los yodóforos y derivados de cloro, estos compuestos ácidos no se ven afectados por la temperatura, son más estables al almacenamiento, no son corrosivos, no son tóxicos y pueden ser usados en la mayoría de las superficies en que se procesan productos alimenticios. Así también presentan ventajas sobre los amonios cuaternario, ya que son menos afectados por la materia orgánica y los detergentes (1).

Estos productos ya están siendo aplicados en diferentes ámbitos de la industria de alimentos, considerando para ello sólo las especificaciones técnicas que entregan sus distribuidores, sin efectuar en la mayoría de los casos una validación experimental adecuada del efecto esperado.

En el presente trabajo se comparó la acción *in vitro* que ellos presentan, frente a microorganismos Gram (+) (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*) y Gram (-) (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), representativos de la flora contaminante que puede estar presente en la mayoría de las industrias elaboradoras de alimentos.

## MATERIALES Y METODOS

Los productos desinfectantes se estudiaron a la concentración de uso y tiempo de acción (\*) recomendados por el fabricante y a otros tiempos adicionales:

Extracto de semilla de toronja (A), 400 ppm y a 3, 5 y 10 (\*) min de acción

Acido peracético (B), 2000 ppm y a 0,5, 1(\*) y 2 min de acción

Acido láctico (C), 20000 ppm y a 1, 3 y 5 (\*) min de acción

Los microorganismos utilizados fueron cepas de colección:

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 33186	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853

### Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro*

Cada experiencia se realizó por triplicado y los resultados corresponden al promedio de los valores obtenidos.

Se prepararon los desinfectantes de acuerdo a las especificaciones del fabricante, utilizando agua potable 300 ppm CaCO<sub>3</sub> de dureza y a temperatura ambiente (15°C).

El inóculo bacteriano se preparó, haciendo crecer las cepas durante 24 h en caldo nutritivo a una temperatura de 35°C.

La determinación de la actividad antimicrobiana propiamente tal, se efectuó de acuerdo a la metodología recomendada por AOAC (7), poniendo en contacto los microorganismos en concentraciones de 10<sup>7</sup> ufc/ml con los productos en estudio, sacando alícuotas de la suspensión a los tiempos establecidos y efectuando el recuento de los

microorganismos sobrevivientes. Este último y el recuento inicial de las cepas, se realizó en Agar Nutritivo con incubación a 35°C por 24 h.

Los resultados se expresaron como eficiencia germicida porcentual (% E), velocidad específica de muerte (k) y tiempo de reducción decimal (TRD).

El valor de %E se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{N_0 - N_t}{N_0} \times 100$$

donde N<sub>0</sub> = número de microorganismos iniciales

N<sub>t</sub> = número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t

La velocidad específica de muerte k corresponde a la pendiente de la curva en el gráfico lnN<sub>t</sub> vs t y se obtiene a partir de la siguiente expresión matemática:

$$\ln(N_t/N_0) = -kt$$

donde N<sub>0</sub> = numero de microorganismos iniciales

N<sub>t</sub> = número de microorganismos sobrevivientes a tiempo t

t = tiempo de contacto entre el desinfectante y el microorganismo

k = velocidad específica de muerte (t<sup>-1</sup>)

El TRD queda determinado por:

$$\text{TRD} = 2,3/k$$

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los tres productos ensayados son de naturaleza ácida, constituidos en base a ácido ascórbico (producto A), ácido peracético (producto B) y ácido láctico (producto C).

A las concentraciones y tiempos recomendados para cada producto, se evidencia de acuerdo a las velocidades específicas de muerte y tiempos de reducción decimal calculados (Tabla 1 y 2), una acción más eficaz en el siguiente orden: producto B > producto C > producto A.

TABLA 1

Velocidades específicas de muerte, k (min<sup>-1</sup>) a los tiempos y concentraciones recomendados por el fabricante

Producto/tiempo	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>P. Aeruginosa</i>
A / 10 min	1,82	1,26	1,40	1,02
B / 1 min	5,42	5,31	4,45	4,44
C / 5 min	2,62	2,08	2,10	2,04

TABLA 2  
Tiempo de reduccion decimal, TRD (min) a los tiempos y concentraciones recomendados por el fabricante

Producto/tiempo	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>P. Aeruginosa</i>
A / 10 min	1,27	1,83	1,65	2,26
B / 1 min	0,42	0,43	0,52	0,52
C / 5 min	0,88	1,11	1,10	1,13

Cada desinfectante, muestra una acción germicida similar frente a cada uno de los microorganismos probados, las variaciones más significativas en la velocidad específica de muerte, se presenta para el producto B,  $k = 5,42 \text{ min}^{-1}$  para *S. aureus* y  $k = 4,44 \text{ min}^{-1}$  para *P. aeruginosa*.

En general para los productos ensayados, *P. aeruginosa* presentaría la mayor resistencia y *S. aureus* la menor resistencia a la acción germicida.

Al comparar la acción desinfectante de cada producto, expresada como % Eficacia germicida (Tabla 3) se observa que en ningún caso se alcanza la reducción estipulada por el test de Chambers, el cual considera como buen desinfectante un producto que, a la concentración recomendada, cause un 99,999% de muerte a una cantidad entre  $7,5 \times 10^7$  y  $1,3 \times 10^8$  células / ml en 30 seg (8).

TABLA 3  
Eficacia (%) de los productos desinfectantes a las concentraciones de uso recomendadas y diferentes tiempos de acción

Tiempo (min)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>P. Aeruginosa</i>
Producto A				
3	98,629	96,071	99,973	94,194
5	99,999	99,993	99,999	99,972
10*	99,999	99,999	99,999	99,996
Producto B				
0,5	94,722	93,846	95,098	90,333
1*	99,556	99,508	98,824	98,833
2	99,999	99,996	99,999	99,992
Producto C				
1	99,750	77,966	96,938	84,615
3	99,998	99,932	99,969	99,773
5*	99,999	99,997	99,997	99,996

\* tiempo recomendado por el fabricante

El 99,999 % de reducción se logra con el producto A frente a *S. aureus*, *E. coli* y *S. faecalis* sólo a los 10 min de acción.

Con el producto B, frente a *S. aureus* y *S. faecalis* esto se logra a los 2 min y con el producto C sólo para *S. aureus* a los 5 min.

Las condiciones de empleo indicadas por los respectivos fabricantes, para cada uno de los productos ensayados, son bastante diferentes, en cuanto a concentración y tiempos de acción. Además, se debe considerar que en el cálculo de Eficacia germicida (%), no se considera el tiempo, es decir se puede presentar la misma Eficacia pero a tiempos muy distintos.

El ácido peracético, además por ser un poderoso oxidante, oxida los grupos sulfhidrilos y grupos amino de las moléculas de aminoácidos. Esto explicaría la acción más eficaz del producto B, en las condiciones ensayadas.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En las condiciones del ensayo y de acuerdo al tiempo de reducción decimal y la velocidad específica de muerte, el producto de mayor efectividad resultó ser el ácido peracético.

En ningún caso se alcanzó la exigencia del Test de Chambers. El 99,999% de destrucción se obtuvo a los 10 min frente a *S. aureus*, *E. coli* y *S. faecalis* para el producto A; con el producto B a los 2 min de acción frente a *S. aureus* y *S. faecalis* y con el producto C, solamente frente a *S. aureus* a los 5 min de acción.

La mayor sensibilidad a estos compuestos la presentaron los microorganismos Gram positivos.

A objeto de mejorar la acción de estos productos se podría recomendar aumentar la concentración en el caso del producto A y un mayor tiempo de exposición a los productos B y C.

## REFERENCIAS

1. Marriott NG. Essentials of Food Sanitation. Chapman & Hall. International Thomson Publishing. 1997.
2. Flynn, J.F. FDA Study Declares Unsanitized Food Preparation Surfaces and Equipment Among the Greatest Risks of Foodborne Illness. Chlorine Chemistry Council. 2000.
3. Chemie Research. Kilol. Catálogo Informativo. Santiago 1994.
4. Prinal. El desinfectante Oxonia activo. Catálogo Informativo. Santiago 1994.
5. Cramer S.A.I.C. Acido láctico. Catálogo Informativo. Santiago 1996.
6. McDonnell G y Russell AD. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. Clin. Microbiol. Rev. 1999;12(1):147-179.
7. AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 12<sup>th</sup> Ed. Washington. 1984.
8. Ayres JC, Mundt JO y Sandine WE. Microbiology of Foods. San Francisco: W.H. Freeman & Co.1980.

Recibido; 04-12-2000

Aceptado: 04-01-2002

## Caracterização do perfil peptídico e de aminoácidos em hidrolisados de caseína

*Harriman Aley Morais, Cristiane Márcia da Silva Barbosa, Daniella Cristine Fialho Lopes, Mônica Cristina de Oliveira, Marialice Pinto Coelho Silvestre*

Laboratório de Bromatologia Faculdade de Farmácia da UFMG, Av. Olegário Maciel - Belo Horizonte - MG - Brasil

**RESUMO.** Vários estudos têm relacionado a importância nutricional dos hidrolisados protéicos ao seu teor em oligopeptídeos, especialmente, em di- e tripeptídeos. Assim, neste trabalho, alguns parâmetros hidrolíticos foram testados, utilizando-se a papaína, a fim de se obter hidrolisados de caseína com perfil peptídico adequado para uso em dietas especiais. Os hidrolisados foram fracionados por cromatografia líquida de alta performance de exclusão molecular (SE-HPLC) e, para a quantificação dos peptídeos, empregou-se o método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF). Dentre as cinco condições de hidrólise estudadas, três deram origem a preparações com perfis peptídicos nutricionalmente semelhantes. Entretanto, o emprego da temperatura de 37°C e da relação enzima:substrato (E:S) de 2% indicou ser, provavelmente, esta a condição economicamente mais viável para ser utilizada em escala industrial.

**Palavras-chave:** Dietas especiais, hidrólise enzimática, caseína, peptídeos, papaína, qualidade nutricional.

**SUMMARY. Characterization of peptide and aminoacid profile in casein hydrolysates.** The nutritional quality of protein hydrolysates has been related in several reports to their di- and tripeptide contents. In the present work different hydrolytic conditions were tested using papain in order to prepare casein hydrolysates with a suitable peptide profile for being used in special diets. The hydrolysates were fractionated by size-exclusion HPLC and the rapid Correct Fraction Area method was used for quantifying the peptides. Among the five hydrolytic conditions studied, three of them gave rise to preparations having nutritionally similar peptide profiles. However, the use of the temperature of 37°C and enzyme:substrate ratio (E:S) of 2% may probably be the most economical condition for industrial production.

**Key words:** Special diets, enzymatic hydrolysis, casein, peptides, papain, nutritional quality

### INTRODUÇÃO

A introdução na dieta de hidrolisados enzimáticos ricos em pequenos peptídeos pode ser importante, no sentido de propiciar uma melhor utilização das proteínas, principalmente em determinadas situações como a que ocorre em indivíduos com intolerância à proteína ou em portadores de deficiência enzimática (1,2). Neste sentido, os hidrolisados protéicos têm sido utilizados, especialmente nos países desenvolvidos, na fabricação de alimentos especiais para diversos grupos, tais como os recém-nascidos prematuros, as crianças com diarreia, gastroenterite, má-absorção, fenilcetonúria e, ainda, para pessoas com alergia a proteínas, visto que o decréscimo no tamanho dos peptídeos tem relação direta com a diminuição da imunogenicidade (3-5). Além disso, estes preparados enzimáticos podem ser úteis na suplementação dietética de idosos, na nutrição de esportistas, como também, em dietas para controle de peso (6).

O valor nutricional dos hidrolisados depende da proteína de origem, do tipo de hidrólise (enzimática ou química) e do tamanho da cadeia peptídica. A qualidade de uma proteína alimentar é função da quantidade e do tipo de aminoácidos

em sua composição, especialmente dos essenciais, representando uma medida da eficácia com a qual pode ser utilizada pelo organismo. Uma proteína de alta qualidade contém aminoácidos essenciais em proporções aproximadas àquelas que satisfazem as necessidades humanas (7). Assim, a caseína foi selecionada para o presente trabalho, devido ao seu alto valor nutricional, elevada susceptibilidade à ação catalítica de todas as proteases conhecidas (8) e à disponibilidade no mercado. Além disso, a qualidade nutricional de hidrolisados protéicos está diretamente relacionada ao seu perfil peptídico, uma vez que, segundo González-Tello (2), a composição destas preparações deve apresentar elevados teores de di- e tripeptídeos e peptídeos com massa molecular média de 500 Da, baixa porcentagem de peptídeos com massa molecular maior que 800 Da e de aminoácidos livres.

Sendo assim, torna-se importante utilizar um método eficiente para o fracionamento e a quantificação de peptídeos e de aminoácidos livres dos hidrolisados protéicos, além de se proceder à avaliação da distribuição de certos aminoácidos na forma de em que são mais facilmente absorvidos pelo organismo (9,10).

Este trabalho teve como objetivo estudar diferentes condições de hidrólise a fim de se obter hidrolisados de caseína com perfil peptídico adequado para uso em dietas especiais. Para isto, foram testados vários parâmetros hidrolíticos empregando-se a enzima papaína.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

O sistema de HPLC isocrático consistiu de uma bomba (série HP1100) e de um detector espectrofotométrico em UV-VIS, acoplado a um computador com software HPChemstation (Avondale, USA). Foi utilizada a coluna cromatográfica [poli-(2-hidroxietilaspártamida)-sílica - PHEA], 250 X 9,4 mm, 5µm e 200 Å (PolyIC, Columbia, MD). A papaína foi gentilmente doada pela BIOBRÁS (Montes Claros, Brasil). A caseína bovina (C7078) foi adquirida da Sigma Chemical (St.Louis, MO). O ácido fórmico foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). A água para uso no cromatógrafo foi purificada através da passagem pelo Sistema de Purificação de Água Aries (Vaponics, EUA). As membranas de celulose, utilizadas para filtração das amostras (0,20 µm) e dos solventes (0,45 µm), foram adquiridas da Sartorius (Alemanha).

### Métodos

#### Preparo dos hidrolisados de caseína

Foram preparados cinco hidrolisados protéicos. As soluções de caseína a 0,125g% (p/v) em tampão fosfato 0,01mol/L (pH 6,5 e 7,5) foram, inicialmente, pré-aquecidas em banho-maria a 90°C por 30 minutos. Posteriormente, a temperatura foi ajustada para cada caso, e a papaína foi adicionada numa dada concentração, de maneira a obter a relação E:S desejada. O tempo total de hidrólise foi de 5h. Os outros parâmetros das reações estão apresentados na Tabela 1.

TABELA 1  
Parâmetros hidrolíticos empregados no preparo dos hidrolisados de caseína pela papaína

Hidrolisados	Temperatura (°C)	pH	E:S (%)	Tempo (h)
H1	37	7,5	4	5
H2	37	7,5	2	5
H3	40	7,5	4	5
H4	37	6,5	4	5
H5	60	7,5	4	5

E:S = relação enzima:substrato

### Fracionamento dos hidrolisados de caseína

O fracionamento dos hidrolisados foi realizado por SE-HPLC, em coluna PHEA, como descrito por Silvestre *et al.* (10). As amostras foram dissolvidas a uma concentração de 1g% (p/v) em solução de ácido fórmico 0,05mol/L (pH 2,5) e cromatografadas à temperatura ambiente, sob condições isocráticas, a um fluxo de 0,5mL/min, durante 35 min. A fase móvel foi filtrada, através de membrana de 0,45 µm, e degaseificada em banho de ultra-som, imediatamente antes do uso. A detecção dos picos cromatográficos foi efetuada em três comprimentos de onda: 230, 280 e 300nm. As amostras foram analisadas em triplicatas e as frações foram separadas, de acordo com o tempo de retenção, sendo F1, de 14,4 a 18,9 min; F2, de 18,9 a 22,4 min; F3, de 22,4 a 23,4 min; e F4, de 23,4 a 32,7min.

### Quantificação de peptídeos e aminoácidos livres nos hidrolisados de caseína

O método rápido da Área Corrigida da Fração (ACF), desenvolvido por Silvestre *et al.* (10), foi utilizado para quantificar os peptídeos e aminoácidos livres presentes nos hidrolisados de caseína. As amostras foram fracionadas e os valores da ACF calculados, de acordo com a curva padrão estabelecida por Morato *et al.* (11).

### Análise estatística

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Para verificar a presença de efeitos significativos entre os diferentes tratamentos, foi adotado o delineamento em Análise Fatorial 5x4 (hidrolisados x frações cromatográficas). Para a determinação das diferenças entre as médias e o conteúdo de aminoácidos das frações cromatográficas dos hidrolisados de caseína foi realizado o teste de Duncan (12).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização dos hidrolisados de caseína

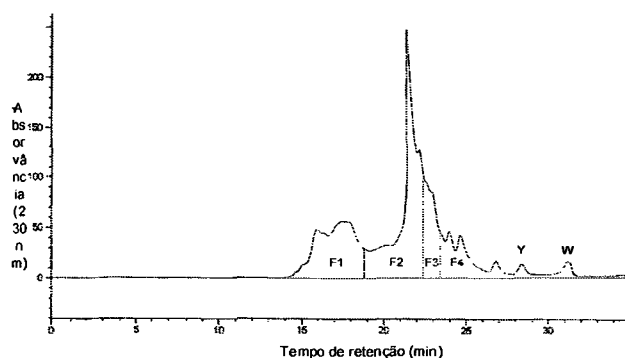
#### Fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência - exclusão molecular (SE-HPLC)

O perfil cromatográfico do hidrolisado H3, a 230 nm, está apresentado na Figura 1. Os hidrolisados protéicos foram separados em quatro frações, conforme descrito anteriormente por SILVESTRE *et al.* (9), Morato *et al.* (11) e Carreira (13). A fração 1 corresponde aos peptídeos contendo mais que 7 resíduos de aminoácidos; a fração 2 de 4 a 7 resíduos; a fração 3, de 2 a 3 resíduos e a fração 4 contendo os aminoácidos livres. Os últimos dois picos na fração 4 correspondem à tirosina (pico Y) e ao triptofano (pico W). Assim sendo, a técnica de SE-HPLC empregada no presente trabalho, mostrou ser eficiente na caracterização

de hidrolisados protéicos, especialmente nos casos em que o interesse está voltado para o fracionamento de peptídeos de baixa massa molecular, ou seja, inferior a 1000 Da.

FIGURA 1

Perfil cromatográfico do hidrolisado H3 (4%, pH 7,5, 40°C, 5h) a 230 nm. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Y = pico da tirosina, W = pico do triptofano



Diferentes técnicas têm sido empregadas no fracionamento de peptídeos de hidrolisados protéicos. A maioria refere-se a peptídeos com massa molecular superior a 1000 Da. Dentre estes métodos destacam-se a eletroforese em gel de poliacrilamida - sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE), a cromatografia de exclusão molecular (SEC), HPLC capilar e de troca de ligante (LE-HPLC) e a SE-HPLC (14- 18).

Entretanto, o emprego destas técnicas tem demonstrado uma série de inconvenientes, tais como interações secundárias (eletrostáticas ou hidrofóbicas) entre os solutos e a fase estacionária e a ineficiência para separar pequenos peptídeos (19-21). Outros autores, empregando a SE-HPLC (14) ou a HPLC capilar (16), relataram a dificuldade de separar os peptídeos de acordo com o tamanho da cadeia, tendo observado uma superposição de pesos moleculares.

**Distribuição de tirosina e triptofano nas frações cromatográficas**

A fim de se ter uma idéia mais precisa do valor nutricional dos hidrolisados protéicos, avaliou-se a distribuição de tirosina e triptofano nas diferentes frações cromatográficas, especialmente na fração F3 (Tabela 2), visto que di- e tripeptídeos representam a forma mais facilmente absorvida destes dois aminoácidos. Além disso, considerando-se a baixa solubilidade da tirosina livre, seria interessante a sua substituição em preparações dietéticas, por di- e tripeptídeos, contendo altos teores de tirosina solúvel (22).

TABELA 2

Distribuição de tirosina e triptofano (%) nas frações cromatográficas dos hidrolisados de caseína

Hidrolisado	Aminoácido	Frações cromatográficas			
		F1	F2	F3	F4
H1	Tyr	19,31c	20,60b	49,93a	10,17d
	Trp	19,30x	20,53w	50,01v	10,16z
H2	Tyr	13,99e	25,19a	32,33e	28,49a
	Trp	13,97y	25,14v	32,38z	28,50v
H3	Tyr	20,32b	14,67c	36,44d	28,56a
	Trp	20,38w	14,80x	36,40y	28,43w
H4	Tyr	13,92d	13,64e	47,33b	25,11c
	Trp	13,94y	13,66z	47,28w	25,11y
H5	Tyr	20,98a	14,45d	38,78c	25,79b
	Trp	20,93v	14,42y	38,87x	25,78x

\*Os valores representam a média das triplicatas. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Os dados referem-se à porcentagem da área total das quatro frações, medida a 230nm. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados.

A distribuição foi estimada baseando-se nas áreas relativas dos dois resíduos a 230 nm. Como apresentado na Tabela 2, o hidrolisado H1 foi o mais vantajoso, uma vez que contém teores mais elevados de tirosina e triptofano na forma de di- e tripeptídeos.

**Comparação entre os diferentes tratamentos enzimáticos**

**Efeito da relação E: S**

A influência da relação E:S na ação da papaína sobre a caseína pode ser avaliada na Figura 2.

Observa-se que a alteração da relação E:S de 2% para 4% (hidrolisados H2 e H1, respectivamente), alterou significativamente o conteúdo de todas as frações cromatográficas, produzindo um perfil peptídico de qualidade nutricional inferior. Houve diminuição dos níveis de di- e tripeptídeos, assim como aumento do teor de aminoácidos livres e médios peptídeos. A única alteração vantajosa, do ponto de vista nutricional, refere-se ao decréscimo no conteúdo de grandes peptídeos (Tabela 3). Considerando-se que a papaína apresenta baixa especificidade, esta redução expressiva na quantidade de di- e tripeptídeos não era esperada. O aumento da E:S, ao invés de promover a quebra dos grandes e médios peptídeos a di- e tripeptídeos, levou à clivagem destes a aminoácidos livres. Isto poderia estar associado, pelo menos em parte, ao fato de que a 2%, houve

apenas pequena formação de di- e tripeptídeos contendo fenilalanina como segundo aminoácido a partir da porção carboxi-terminal os quais, de acordo com Lenier (23) e Reed (24), não serviriam de substrato para a ação desta enzima.

FIGURA 2

Ação isolada da papaína: efeito da relação E:S. H1: 4%; H2: 2%. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado

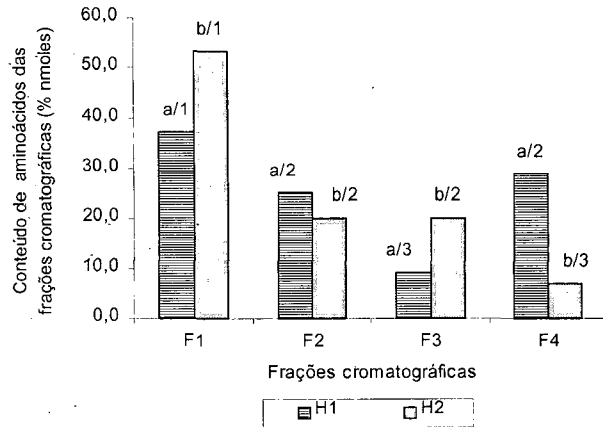


TABELA 3

Teor de peptídeos e de aminoácidos livres (% nmoles) das frações cromatográficas dos hidrolisados testes

Hidrolisados	Frações			
	F1	F2	F3	F4
H1	37,13c/1	25,07c/2	9,01c/3	28,79a/2
H2	53,29a/1	19,99d/2	19,96a/2	6,76b, c/3
H3	33,23d/2	41,46a/1	14,94b/3	10,37b/4
H4	52,68a/1	36,65b/2	8,91c/3	1,76d/4
H5	42,24b/1	40,60a/1	12,10b, c/2	5,06c, d/3

Os valores são apresentados em nmoles% (porcentagem do número de nmoles das quatro frações). Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres.

Este efeito da papaína sobre o perfil peptídico foi mais prejudicial do que o da pepsina, uma vez que Carreira (13), variando a relação E:S nas mesmas proporções, não observou alterações significativas nos conteúdos das frações F1, F2 e F4 e, ainda, obteve uma elevação nos níveis de di- e tripeptídeos.

Comparando-se a ação da papaína com a da subtilisina, observa-se que o segundo tratamento foi bem superior, do ponto de vista nutricional. Assim, Morato *et al.* (11), ao passar a E:S de 2% para 4%, obtiveram um decréscimo dos teores de grandes peptídeos e aminoácidos livres, bem como um aumento do conteúdo de médios peptídeos e também de di- e tripeptídeos.

Estes resultados contradizem a afirmativa de González-tello (2) de que uma alteração na relação E:S não exerce qualquer influência na distribuição de peptídeos nas frações cromatográficas de hidrolisados protéicos. Existem relatos na literatura que confirmam esta observação. Assim, Freitas *et al.* (3) não obtiveram uma alteração do perfil cromatográfico de um hidrolisado de caseína, ao aumentar de 3,7 vezes a concentração de pancreatina. Segundo os autores, este limite aparente na hidrólise da caseína, pode estar relacionado, pelo menos em parte, à sua seqüência de aminoácidos e a especificidade da enzima empregada. Apesar destes resultados estarem de acordo com o relato de González-tello (2), uma explicação para isso seria a de que os suportes cromatográficos, empregados por estes autores, foram ineficientes para a separação de peptídeos, de acordo com o tamanho da cadeia, especialmente de di- e tripeptídeos (20, 25).

Todavia, os resultados apresentados por outros pesquisadores estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, bem como os de Carreira (13) e Morato *et al.* (11). Assim, Loosen *et al.* (26) testaram o emprego da subtilisina na hidrólise da caseína, variando-se a relação E:S de 1 a 4%, sendo que os melhores resultados foram obtidos empregando-se a relação E:S de 2%, levando à obtenção de um hidrolisado contendo 75% de di- e tripeptídeos e apenas 5% de aminoácidos livres.

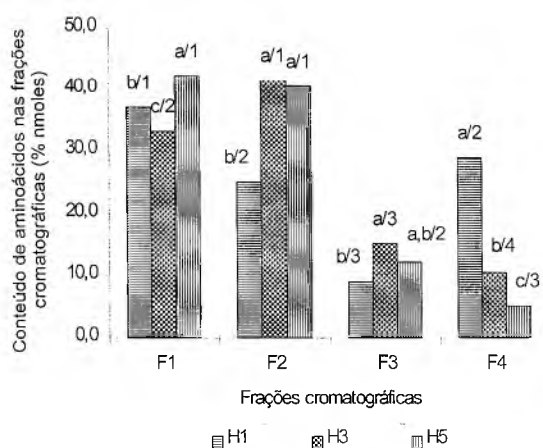
Com relação à distribuição de tirosina e triptofano (Tabela 2), a alteração na relação E:S de 2% para 4% (H2 e H1, respectivamente) foi vantajosa, pois aumentou o conteúdo de ambos aminoácidos na forma de di- e tripeptídeos. Ao promover esta mesma alteração empregando a subtilisina para hidrolisar a caseína, Morato *et al.* (11) obtiveram resultados semelhantes. Por outro lado, Carreira (13), utilizando a pepsina, observou que este aumento na relação E:S reduziu o conteúdo de tirosina e triptofano na fração F3.

### Efeito da temperatura

O efeito da temperatura na ação da papaína sobre a caseína está representado na Figura 3.

FIGURA 3

Ação isolada da papaína: efeito da temperatura. H1: 37°C; H3: 40°C; H5: 60°C. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livre. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado.



Observa-se que a variação da temperatura de 37°C para 40°C (hidrolisados H1 e H3, respectivamente) produziu uma elevação nos teores de di- e tripeptídeos, além de reduzir os níveis de aminoácidos livres e de grandes peptídeos (Tabela 3). Este efeito da papaína sobre a caseína foi diferente daquele da pepsina, uma vez que Carreira (13) mostrou que, ao passar de 37°C para 40°C, não houve alteração nos teores de di- e tripeptídeos, como também nos de aminoácidos livres.

O aumento da temperatura de 40°C para 60°C (H3 e H5, respectivamente), produziu um perfil peptídico ligeiramente inferior, do ponto de vista nutricional. Se por um lado obteve-se uma queda expressiva (cerca de 50%) na quantidade de aminoácidos livres, por outro este tratamento elevou os teores de grandes peptídeos e provocou uma pequena redução nos níveis de di- e tripeptídeos. Verifica-se que, entre os tratamentos realizados, o emprego de temperatura de 40°C foi o mais vantajoso, do ponto de vista nutricional, pois permitiu a obtenção de um hidrolisado apresentando o melhor perfil peptídico para ser empregado em dietas especiais, como

descrito por González-tello (2). Ressalta-se, ainda, que neste caso também, a ação da papaína sobre a caseína produziu melhores resultados do que a da pepsina, uma vez que ao passar de 40° para 60°C, esta enzima não contribuiu para reduzir os teores de aminoácidos livres (13).

O efeito da elevação da temperatura (de 40°C para 50°C) sobre o perfil peptídico de hidrolisados de caseína obtidos pela ação da subtilisina foi, também, estudado recentemente. Assim, Morato *et al.* (11) mostraram que o emprego da temperatura acima de 40°C foi prejudicial do ponto de vista nutricional, tendo obtido resultados semelhantes ao do presente trabalho, ao se passar de 40°C para 60°C.

Chataud *et al.* (1) e Loosen *et al.* (26) recomendam o emprego de temperaturas superiores a 50°C para o preparo de hidrolisados ricos em di- e tripeptídeos, usando a subtilisina. De acordo com estes autores, isto poderia reduzir o tempo de hidrólise, sem desnaturação significativa da enzima, e minimizar a contaminação microbiana. Entretanto, os resultados aqui apresentados, assim como os obtidos por Morato *et al.* (11) e Carreira (13), mostraram o contrário, uma vez que o emprego de temperaturas superiores a 40°C foi prejudicial para o perfil peptídico dos hidrolisados. Este tratamento somente foi benéfico para a tirosina, que teve seu teor elevado 5 vezes na fração F3, ao se passar de 40 °C para 50 °C e empregando-se a subtilisina para hidrolisar a caseína (11)

Com relação à distribuição de tirosina e triptofano nas frações cromatográficas (Tabela 2), o emprego de temperaturas superiores a 37°C prejudicou o perfil peptídico. Assim, ao passar de 37°C (H1) para 40°C (H3) e de 40°C para 60°C (H5) observou-se uma redução e um aumento nos teores destes aminoácidos na fração F3, respectivamente. Entretanto, este aumento observado para H5 não foi suficiente para aproximar dos valores encontrados em H1. Efeito semelhante foi obtido pela ação da pepsina, empregando-se a mesma variação da temperatura de hidrólise da caseína (13).

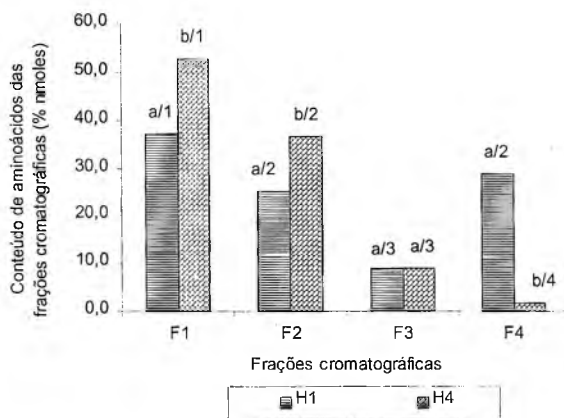
### Efeito do pH

A influência do pH na ação da papaína sobre a caseína está representada na Figura 4.

Observa-se que o emprego destes dois valores de pH, situados na faixa ótima de atuação da papaína (6,0 e 7,5) (27), produziu algumas diferenças significativas no perfil peptídico. O hidrolisado obtido no pH 6,5 (H4) mostrou-se ligeiramente superior, do ponto de vista nutricional, ao preparado no pH 7,5 (H1). Ambos hidrolisados apresentaram os mesmos teores de di- e tripeptídeos. Mas, se por um lado o teor de grandes peptídeos de H1 é inferior ao de H4, a quantidade de aminoácidos livres neste hidrolisado reduziu quase seis vezes em relação a H1.

FIGURA 4

Ação isolada da papaína: efeito do pH. H1: pH = 7,5; H4: pH = 6,5. F1: grandes peptídeos (> 7 resíduos de aminoácidos); F2: médios peptídeos (4 a 7 resíduos de aminoácidos); F3: di- e tripeptídeos; F4: aminoácidos livres. Os resultados representam a média das triplicatas. Médias indicadas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de uma mesma fração para diferentes hidrolisados. Médias indicadas por números iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade na comparação de diferentes frações de um hidrolisado



Este efeito da influência do pH sobre o perfil peptídico de hidrolisados protéicos, sempre verificado na faixa ótima de ação das enzimas, já foi relatado anteriormente. Assim, Morato *et al.* (11) mostraram que o hidrolisado de caseína obtido pela subtilisina, em pH 7,5, foi nutricionalmente superior àquele preparado em pH 8,0, já que apresentou maior teor de di- e tripeptídeos, bem como menor quantidade de grandes peptídeos e aminoácidos livres. De forma semelhante, Carreira (13) verificou uma alteração do perfil peptídico, ao reduzir o pH da hidrólise de 2,5 para 1,9, empregando a pepsina. Do ponto de vista nutricional, esta alteração foi benéfica, pois elevou os teores de di- e tripeptídeos e reduziu o conteúdo de grandes peptídeos, não tendo sido observadas diferenças significativas entre as quantidades de médios peptídeos e de aminoácidos livres.

A distribuição de tirosina e triptofano (Tabela 2) foi afetada pela variação do pH da hidrólise. O melhor resultado foi obtido no pH 7,5, visto que o hidrolisado H1 apresentou os teores mais elevados destes aminoácidos na forma de di- e tripeptídeos. Resultados semelhantes foram obtidos por Morato *et al.* (11) que, ao testarem diferentes valores de pH dentro da faixa ótima de ação da subtilisina, também observaram diferenças entre os conteúdos de tirosina e triptofano na fração F3, obtendo melhor distribuição destes aminoácidos em pH 6,5 e 8,0. Da mesma forma, Carreira

(13), alterando o pH dentro da faixa ótima de ação da pepsina, encontrou diferentes resultados em relação à distribuição de tirosina e triptofano. Assim, maior conteúdo destes aminoácidos aromáticos na forma de di- e tripeptídeos foi observado quando o pH aumentou de 1,9 para 2,5.

O conjunto dos resultados apresentados neste item pode ser, provavelmente, explicado pela carga dos resíduos de aminoácidos nas moléculas das enzimas e da caseína em diferentes valores de pH, afetando a disponibilidade das ligações peptídicas ao ataque enzimático e, conseqüentemente, alterando os produtos obtidos, como relatado anteriormente por Morato *et al.* (11).

### Síntese dos resultados obtidos pela ação da papaína

Considerando a afirmativa de González-Tello *et al.* (2), dentre os hidrolisados preparados, pode-se concluir que H2, H3 e H5 apresentaram as melhores características para serem usados em dietas especiais, ou seja, maior teor de di- e tripeptídeos (F3) e peptídeos com massa molecular média de 500 Da (F2 + F3), a menor porcentagem de peptídeos com massa molecular maior que 800 Da (F1), bem como nível mais baixo de aminoácidos livres (F4).

A escolha do melhor dentre estes três hidrolisados para ser preparado em larga escala dependeria de uma avaliação econômica. Entretanto, a princípio tudo indica que o hidrolisado H2 seria o escolhido, uma vez que no seu preparo foram empregados os menores valores de temperatura (37°C) e da relação E:S (2%), condições que devem ser vantajosas para uma produção em escala industrial.

Alguns parâmetros hidrolíticos, tais como o tempo de reação, poderiam ainda, ser alterados, na busca de um melhor perfil peptídico. Entretanto, deve-se estar consciente de que acima de 5h de hidrólise, o risco de contaminação é considerável (1, 26).

### CONCLUSÃO

A ação da papaína foi mais eficiente na produção de di- e tripeptídeos quando se empregou uma relação E:S de 2%, pH 7,5 e temperatura de 37°C (H2). Com relação à distribuição de tirosina e triptofano, na forma de di- e tripeptídeos, os melhores resultados foram obtidos nos mesmos valores de pH e temperatura, mas nesse caso foi necessário empregar uma relação E:S de 4% (H1).

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro a este trabalho, na forma de bolsas de estudo ou de verba para a pesquisa.

## REFERÊNCIAS

1. Chataud J, Desreumeux S, Cartwright T, Procédé de fabrication d'un hydrolysate enzymatique de protéines riche en di- et tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. Laboratório Roger Bellon, Neuilly-sur-Seine-FR. A23J3/00. FR87402837.6, 0.274946A1. 14/12/1987, 20/07/1988.
2. González-Tello P, Camacho F, Jurado E, Paéz MP, Guadix EM. Enzymatic hydrolysis of whey proteins. II. Molecular-weight range, Biotech. Bioeng., 1994; 44(4):529-532.
3. Freitas O, Padovan GJ, Vilela L, Santos JE, Dutra de Oliveira JE, Greene LJ. Characterization of protein hydrolysates prepared for enteral nutrition. J. Agric. Food Chem., 1993; 41(8):1432-1438.
4. Boza JJ, Martínez-Augustin O, Gil A. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. J. Agric. Food Chem., 1995; 43(4):872-875.
5. Synowiecki J, Jagielka R, Shahidi, F. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction. Food Chem., 1996; 57(3):435-439.
6. Frokjaer S. Use of hydrolysates for protein supplementation. Food Tech., 1994; 48(10):86-88.
7. Cheftel JC, Cuq JL, Lorient, D. Protéines alimentaires: biochimie, propriétés fonctionnelles, valeur nutritionnelle, modifications chimiques. Paris: Tec & Doc Lavoisier, 1985.
8. Morato AF, Carreira RL, Junqueira RG, Silvestre MPC. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. J. Food Composition and Analysis, 2000; 13:843-857.
9. Adachi S, Kimura Y, Murakami K, Matsuno R, Yokogoshi H. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. Agric. Biol. Chem., 1991; 55(4):925-932.
10. Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M. Analyses of protein hydrolysates. 1. Use of poly (2-hydroxyethyl-aspartamide)-silica column in size-exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. J. Agric. Food Chem., 1994; 42(12):2778-2782.
11. Silvestre MPC, Hamon M, Yvon M. Analyses of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. J. Agric. Food Chem., 1994; 42(12):2783-2789.
12. Gomes FP. Curso de estatística experimental. 13 ed. Piracicaba: 1990.
13. Carreira RL. Caracterização de hidrolisados enzimáticos de caseína: perfil peptídico e aminoácidos essenciais [Dissertação]. Belo Horizonte (MG): Faculdade de Farmácia/ Universidade Federal de Minas Gerais, 2000.
14. Lemieux L, Amiot J. Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography to separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates. J. Chromatogr., 1990; 73(1):189-206.
15. Silvestre, MPC. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. Food Chem., 1997; 60(2):263-271.
16. Davis M, Lee TD. Analysis of peptide mixtures by capillary high performance liquid chromatography: a practical guide to small-scale separations. Prot. Sci., 1992;1:935-944.
17. Visser S, Stagen CJ, Robben AJPM. Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. J. Chromatogr., 1992; 599(2):205-209.
18. Gallagher J, Kanekanian AD, Evans EP. Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. Int. J. Food Sci. Tech., 1994; 29(3):279-285.
19. Verneuil B, Bressolier PH, Julien R. Quantification of amino acids, and di- and tripeptides in nutritional interest protein hydrolysates by ligand exchange chromatography in combination with Edman degradation. 4<sup>th</sup> Symposium on purification technologies, 1990:253-258.
20. Lemieux L, Piot JM, Guillochon D, Amiot, J. Study of the efficiency of a mobile phase used in size-exclusion HPLC for the separation of peptides from a casein hydrolysate according to their hydrodynamic volume. J. Chromatogr., 1991; 32(3):499-504.
21. Golovchenko N, Kataeva IA, Akimenko VK. Analysis of pH-dependent protein interactions with gel filtration medium. J. Chromatogr., 1992; 591(4):121-128.
22. Furst P, Albers S, Stehle P. Dipeptides in clinical nutrition. Proc. Nutr. Soc., 1990; 49(3):343-359.
23. Lenier IE. The sulfhydryl proteases. In: Whitaker, JR. Food related enzymes. Advances in Chemistry Series 136. Washington: American Chemistry Society, 1974.
24. Reed G. Enzymes in food processing. 2ed. New York: Academic Press, 1975.
25. Kopaciewicz W, Regnier FE. Nonideal size-exclusion chromatography of proteins: effects of pH at low ionic strength. Anal. Biochem., 1982; 126(13):8-16.
26. Loosen, PC, Bresspollier PR, Julieen AR, Pejoan CH, Verneuil B. Procédé pour préparer un hydrolysate enzymatique. Tessenderlo Cheemie n. v. [BE/BE]; Stationsstraat, B-3980 Tessenderlo (BE). A23J3/34, C12P21/06 C12S3/14, C07K15/00//A61K37/18, A23J3/04, 3/14. FR-PCT/BE91/00001, W091/10369. 11/01/1991; 25/07/1991.
27. Whitaker JR. Principles of enzymology for the food sciences. New York: Marcel Decker, 1972:526-529.

Recibido: 20-03-2001

Aceptado: 17-10-2001

## Efecto de recubrimientos comestibles sobre la calidad sensorial de pimentones verdes (*Capsicum annuum L.*) durante el almacenamiento

Edgar Uquiche Carrasco, Mario Villarroel Tudesca, Luis Cisneros-Zevallos

Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile

**RESUMEN.** Se aplicó un recubrimiento comestible basado en carboximetilcelulosa y ácido esteárico sobre pimentones verdes (*Capsicum annuum L.*), para determinar su efecto como agente protector y estabilizador de las características naturales del fruto. Los pimentones se dividieron en tres lotes de acuerdo al tratamiento: (T1) sin recubrir; (T2) con recubrimiento en la base del pedúnculo o tallo; (T3) recubrimiento sobre toda la superficie del fruto, y se almacenaron a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  por 28 días. Durante este tiempo se evaluó la calidad sensorial y la pérdida de peso. Características sensoriales tales como el color, apariencia, firmeza y calidad, se evaluaron mediante una prueba de puntaje compuesto, en la que participa un panel de 10 jueces entrenados ( $p>0,05$ ). Al final del estudio, los pimentones del tratamiento T3 mostraron mejor estabilidad sensorial que el control T1 ( $p<0,05$ ); no observándose ningún cambio significativo entre T2 y T3. Los pimentones recubiertos mostraron menor deterioro de la firmeza comparado con el control. El color fue el atributo que experimentó menor cambio, no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos ( $p>0,05$ ). **Palabras clave:** Pimentones verdes, evaluación sensorial, recubrimientos comestibles, carboximetilcelulosa.

**SUMMARY.** Edible coating effects on the sensory quality of green bell pepper fruits (*Capsicum annuum L.*) during storage. Edible coating based on carboxymethyl cellulose (CMC) and stearic acid were applied on green bell peppers (*Capsicum annuum L.*) samples in order to investigate its effects as protecting agent to enhance natural characteristics of products. Samples were submitted to three lots according to: (T1) uncoated; (T2) coated in lower part of the stem; (T3) coated all over the surface (T3). During storage at  $5\pm 1^\circ\text{C}$ , for 28 days, sensory quality and weight loss were evaluated. Sensory characteristics such as color, appearance and firmness were controlled using a composite scoring test. At the end of the study, T3 treatment showed better sensory stability than T1 ( $p<0.05$ ), none significant changes between T2 and T3 were found. The coated samples showed less firmness deterioration compared with control samples. The color was the attribute that changed less, without significant difference between treatments ( $p>0.05$ ). **Key words:** Green bell peppers, sensory evaluation, edible coatings, carboxymethylcellulose.

### INTRODUCCION

Los pimentones son hortalizas de composición interesante, debido a que constituyen una excelente fuente de pigmentos y nutrimentos (1), tales como la vitamina C y E, los cuales ayudan a reducir el riesgo de enfermedades cancerígenas (2). El promedio de vitamina C en siete variedades de pimentones verdes fue entre 138 a 194 mg/100 g de producto.

El deterioro por flaccidez y marchitamiento son los principales problemas que reducen la vida útil de los pimentones después de cosechados. La flaccidez esta directamente relacionada con la pérdida de agua durante el almacenamiento (3, 4), debido a la respiración y difusión de agua a través de la piel del fruto, aunque probablemente la respiración cumple un menor papel en la pérdida de agua, debido a que los pimentones son no climatéricos (5).

Los recubrimientos comestibles son capas delgadas de un material biopolímero (proteína o polisacárido como una solución hidrocoloide, o como una emulsión con lípidos), que son aplicadas sobre la superficie de un alimento en adición o reemplazo de la corteza natural, y que se comportan principalmente como barreras que reducen la difusión de gases ( $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , vapor de agua), permitiendo extender la vida útil del alimento. La aplicación de recubrimientos comestibles en alimentos ha sido extensamente revisada (6-9).

Los recubrimientos comestibles pueden ayudar a disminuir la pérdida de humedad y/o reducir la absorción de oxígeno, inhibiendo el proceso de maduración, prolongando la vida útil y la calidad de una verdura o fruta (7,10,11). El desarrollo de recubrimientos comestibles se ha orientado sobre aquellos que contienen principalmente celulosa, lípidos y proteínas (12), adicionadas de agentes plastificantes como el glicerol, sorbitol, polietilenglicol y propilenglicol. Los

recubrimientos basados en celulosa son muy eficientes barreras a la permeabilidad de oxígeno y su propiedad de barrera al vapor de agua puede mejorarse por la adición de lípidos (13). Los plastificantes se emplean para cambiar las propiedades físicas del recubrimiento (elasticidad, flexibilidad, permeabilidad, humectabilidad). El efecto de plastificantes sobre las propiedades de permeabilidad al O<sub>2</sub> y vapor de agua fue estudiado por Park *et al.* (14).

Durante el almacenamiento la hortaliza sufre cambios fisiológicos y sensoriales, este último es muy importante debido a que pueden ser percibidos por potenciales consumidores. En consecuencia, el uso de una apropiada prueba sensorial permitiría predecir la estabilidad de productos recubiertos durante el almacenamiento. El objetivo del presente trabajo fue: evaluar el efecto de recubrimientos comestibles basándose en CMC y lípidos sobre la calidad sensorial y la pérdida de peso de pimentones verdes recién cosechados, durante el almacenamiento.

## MATERIALES Y METODOS

### Materia prima

Pimentones verdes (*Capsicum annum L.*), cosechados de plantas desarrolladas bajo invernadero, provinieron de la zona agrícola de Vilcún (Temuco, Chile). Los frutos se seleccionaron de acuerdo al tamaño, color, firmeza y ausencia de heridas, y luego se lavaron con agua potable. Sesenta pimentones verdes se dividieron en tres lotes de veinte pimentones cada uno, siendo cada pimentón una réplica. Cada fruto poseía una porción de pedúnculo (aprox. 2 cm). El tratamiento T1 correspondió al control, pimentones sin aplicación de recubrimiento; el tratamiento T2, fueron muestras con recubrimiento en la base del pedúnculo o tallo; y el tratamiento T3, muestras con recubrimiento sobre toda la superficie.

### Formulación y aplicación del recubrimiento

Se preparó una solución acuosa de CMC (Sigma Chemical) al 1%, disolviendo 1 g de CMC (Sol. 1% 1000-1500 cp) en 100 mL de agua destilada. Disuelto completamente el CMC, se adicionó 0,5 mL de glicerol (Merck) como plastificante, agitando la solución por 10 minutos a 2000 rpm mediante un agitador (Heidolph, Alemania). Se calentó la mezcla hasta 70°C en una estufa de baño Memmert (30°-100°C) (Schwabach, Alemania) y se adicionó 0,25 g de ácido esteárico (Sigma Chemical). Luego de fundirse el ácido graso, se homogeneizó la mezcla por 15 minutos a 2000 rpm, dejándose enfriar hasta 20°C, quedando lista para su aplicación. Para el tratamiento T2, los pimentones se recubrieron con ayuda de un pincel; mientras que para el tratamiento T3, la aplicación se realizó por inmersión de los frutos en la solución del recubrimiento. Posteriormente, los

pimentones recubiertos se sujetaron del tallo a un soporte mediante ganchos a presión y se dejaron secar al ambiente durante toda la noche (4).

### Almacenamiento

Los pimentones se almacenaron por 28 días a 5±1°C, en una cámara Vestfrost FKG 371 (Dinamarca) de las siguientes dimensiones: altura 1,82 m., fondo 0,66 m., largo 0,61 m. Durante el almacenamiento 10 unidades de cada tratamiento se sometieron a evaluación sensorial, en los días 0, 4, 7, 14, 21 y 28 de almacenamiento; mientras las restantes 10 unidades, se les midió el cambio de color y la pérdida de humedad, evaluada como pérdida de peso, en los días 0, 4, 7, 12, 18, 22, 27 y 32 de almacenamiento.

### Evaluación sensorial

Un panel de 10 jueces entrenados para el presente estudio, que demostraron reproducibilidad en sus respuestas ( $p > 0,05$ ), analizó las muestras para determinar la Calidad Sensorial Total (Q), incluyendo el color, apariencia y firmeza. Se empleó la prueba de puntaje compuesto con una escala analítica descriptiva de cinco puntos (Tabla 1), donde: 1=Muy buena; 2=Buena; 3=Regular; 4=Deficiente; 5=Mala (15, 16). Previamente en discusión abierta con los jueces, se determinaron los atributos sensoriales a evaluar y posteriormente cada juez asignó un porcentaje de importancia a cada atributo (color, apariencia y firmeza), los que en suma darían el 100%. Así los porcentajes de importancia que definieron los jueces para los atributos color, apariencia y firmeza fueron en promedio: 27,6%, 38,5% y 33,8%, respectivamente. La suma de los puntajes ponderados para cada atributo, de acuerdo al grado de importancia determinado previamente, representa la calidad sensorial total (Q).

$$Q = \text{Color} * 0,276 + \text{Apariencia} * 0,385 + \text{Textura} * 0,338$$

### Cambio de color y pérdida de peso

Se midió el color de los pimentones durante el almacenamiento mediante la Norma Española de Colores UNE 48-103-94 (17). Esta norma incluye 300 colores normalizados que pretenden cubrir las necesidades más frecuentes en las aplicaciones industriales y estéticas del color. El sistema adoptado para la designación y codificación de los colores normalizados UNE es el denominado NCS (Sistema Natural del Color), fundamentado en la percepción visual del color. Cada color se identifica y designa, sin ambigüedad alguna, de acuerdo con el sistema de clasificación NCS por dígitos. Esta designación da información directa sobre la negrura, la cromaticidad y la tonalidad. Los códigos del sistema NCS, tienen su equivalencia en valores de las coordenadas L\*, a\*, b\*, según

la Comisión Internacional del Color (Commission International of l'Eclariage, CIE), para cada color. El cambio de color se calculó como el valor promedio Hue ( $\tan^{-1} b/a$ ) de diez frutos para cada tratamiento. Para la pérdida de peso, diez pimentones por cada tratamiento se pesaron en una

balanza analítica  $\pm 0,001$  g de precisión (Hanau, Alemania), en intervalos de 1 minuto en cada medición, para evitar variaciones que afectaran a la pérdida de peso. Se calculó la pérdida de peso respecto al peso inicial del fruto fresco (4).

TABLA 1  
Escala analítico descriptiva para pimentones verdes (*Capsicum annuum L.*)

Color	1: Muy Bueno	2: Bueno	3: Regular	4: Deficiente	5: Malo
	Color verde característico y parejo sobre toda la superficie	Color verde, con aparición de pequeñas zonas verde-amarillo o verde-naranja	Color verde, con cerca de 30% de zonas amarillo-naranja sobre la superficie	Aparición de zonas rojo-naranja, cubriendo cerca del 50% de la superficie	Presencia de extensas zonas de color rojo en más del 50% de la superficie del fruto
Apariencia	1: Muy Bueno	2: Bueno	3: Regular	4: Deficiente	5: Malo
	Superficie suave y brillante, ausencia de estrías y sin pliegues. Punta de extremo cerrada y pedúnculo o tallo verde. Sano, sin magulladuras externas.	Escasa presencia de estrías y pliegues. Punta cerrada. Tallo o pedúnculo verde. Sano y ausencia de golpes o de magulladuras	Presencia de estrías marcadas y profundas en regular cantidad. Tallo o pedúnculo poco leñoso y punta semi-abierta. Sano. Signos de encogimiento y flacidez	Superficie rugosa y con magulladuras. Presencia de estrías profundas. Tallo o pedúnculo seco leñoso, punta abierta. Evidente encogimiento y presencia de hongos	Superficie arrugada notoriamente. Marchita. Exudación de líquido. Signos evidentes de contaminación con hongos. Tejido reblandecido y suelto. Tallo o pedúnculo leñoso y punta abierta
Firmeza	1: Muy Bueno	2: Bueno	3: Regular	4: Deficiente	5: Malo
	Tejido firme y turgente al tacto. Pretado y duro. Pedúnculo o tallo flexible	Tejido firme. Cede levemente a la presión manual. Tallo flexible	Tejido semiblando. Tallo fibroso y ligeramente quebradizo	Tejido blando. Escasa resistencia a la presión manual. Tallo quebradizo	Tejido reblandecido. Nula resistencia a la presión manual. Se deforma fácilmente al tacto

### Análisis estadístico

Las diferencias entre los atributos sensoriales y pérdida de peso se analizaron estadísticamente. Para determinar la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos, se aplicó análisis de varianza (ANOVA) a los residuos del ajuste por regresión de los resultados del estudio de almacenamiento (cambio en los atributos sensoriales: calidad, color, apariencia, firmeza y de peso) con respecto al tiempo.

### RESULTADOS Y DISCUSION

Los puntajes obtenidos en la evaluación sensorial para los atributos: color (C), apariencia (A), firmeza (F) y calidad sensorial total (Q), se ajustaron a un modelo matemático (ecuación 1) que permitiera describir la velocidad de cambio

de éstos atributos con respecto al tiempo.

$$N_t = N_0 - K * t \quad [1]$$

donde:  $N_0$  = valor inicial del factor de calidad;  $N_t$  = Valor del factor de calidad en el tiempo t (días); K= constante cinética de orden cero.

La ecuación 1 corresponde a un modelo lineal (cinética de orden cero), que ajustó mejor los datos experimentales en comparación al modelo exponencial (cinética de primer orden). La constante K del modelo lineal que describe, para cada tratamiento, la velocidad de cambio de cada atributo con respecto al tiempo, se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2  
Constante de orden cero (K) para la velocidad de cambio de atributos sensoriales y pérdida de peso de pimentones durante el almacenamiento ( $5\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Tratamientos	Color $K_C$ (puntaje/día)	Apariencia $K_A$ (puntaje/día)	Firmeza $K_F$ (puntaje/día)	Calidad $K_Q$ (puntaje/día)	Peso $K_P$ (g/día)
Tratamiento T1 $r^2$	$0,0295 \pm 0,023$ a 0,87	$0,0929 \pm 0,024$ a 0,96	$0,1087 \pm 0,027$ a 0,95	$0,0806 \pm 0,021$ a 0,97	$1,2018 \pm 0,296$ a 0,96
Tratamiento T2 $r^2$	$0,0291 \pm 0,027$ a 0,90	$0,0872 \pm 0,037$ ab 0,95	$0,0848 \pm 0,024$ b 0,97	$0,0703 \pm 0,023$ b 0,97	$0,8636 \pm 0,362$ b 0,95
Tratamiento T3 $r^2$	$0,0216 \pm 0,019$ a 0,62	$0,0649 \pm 0,028$ b 0,92	$0,0696 \pm 0,026$ b 0,95	$0,0544 \pm 0,016$ b 0,92	$0,6807 \pm 0,229$ c 0,92

Valores en una misma columna y con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para un nivel de significación de  $\alpha=0,05$ . Los valores  $K_C$ ,  $K_A$ ,  $K_F$ ,  $K_Q$ ,  $K_P$  son las constantes de orden cero para la velocidad de cambio del color, apariencia, firmeza, calidad (puntaje/día) y peso (g/día) respectivamente, y corresponden al promedio de diez réplicas  $\pm$  desviación estándar. Puntaje/día indica el cambio en una unidad de la escala de puntaje compuesto, por día de almacenamiento.  $r^2$  es el coeficiente de regresión.

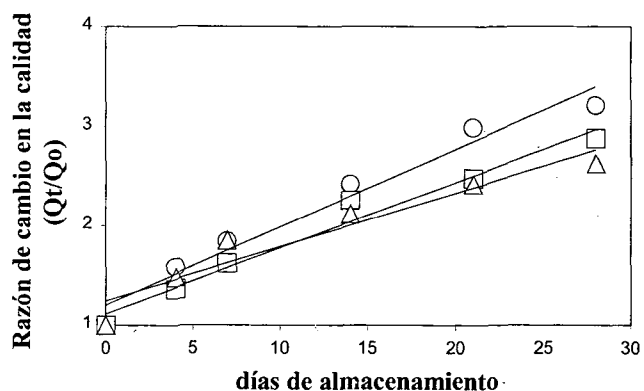
### Calidad (Q)

La velocidad de pérdida de la calidad sensorial total (Q) de los pimentones almacenados se midió como el parámetro  $K_Q$  (Tabla 2). El recubrimiento aplicado sobre todo el pimentón (T3) redujo significativamente ( $p<0,05$ ) la pérdida de calidad en comparación al control (T1). No hubo diferencias entre los tratamientos T3 y T2 ( $p>0,05$ ). La razón de cambio de calidad sensorial ( $Q_t/Q_0$ ) respecto al tiempo de almacenamiento para cada tratamiento, se presenta en la Figura 1. De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 2, la escasa diferencia en apariencia, firmeza y la calidad entre los tratamientos T2 y T3 ( $p>0,05$ ), sugiere que en la respiración de los pimentones, el intercambio gaseoso se daría principalmente en la zona del pedúnculo y no a través de la piel (18). Sin embargo, es posible que la ausencia de diferencias del tratamiento T3 respecto al T2 pueda también deberse a fallas en la adhesión del recubrimiento sobre la superficie de los pimentones, el cual dependería de factores como la estructura de la piel y las características de tensión superficial y viscosidad de la solución de recubrimiento (19, 20).

Este último aspecto requiere investigación adicional. Se ha informado que la modificación de gas interno en frutos a  $20^\circ\text{C}$  es mayor que a  $4^\circ\text{C}$ , originando mayores diferencias y variabilidad entre los tratamientos, en estudios de almacenamiento de manzanas con recubrimiento (21). En nuestra investigación los experimentos se realizaron a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  lo que probablemente disminuyó las posibilidades de observar mayores diferencias y variaciones entre los tratamientos, debido a un cambio menor en la composición del gas interno en el fruto.

FIGURA 1

Razón de cambio de la Calidad Sensorial Total ( $Q_t/Q_0$ ) durante el almacenamiento (28 días a  $5\pm 1^\circ\text{C}$ ) de pimentones verdes: (O) T1, sin recubrimiento; (□) T2, recubrimiento en la base del tallo; (Δ) T3, recubrimiento sobre toda la superficie



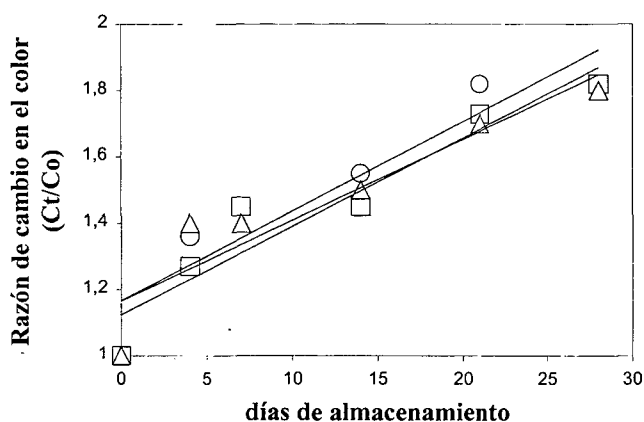
### Color (C), apariencia (A) y firmeza (F)

La velocidad del cambio de color (C) en los pimentones, medido sensorialmente, se calculó para cada tratamiento como el parámetro  $K_C$  (Tabla 2). Durante el almacenamiento no se observaron cambios notorios en el color, y el panel no encontró diferencias entre los tres tratamientos ( $p>0,05$ ). La razón del cambio de color ( $C_t/C_0$ ), del verde al rojo respecto al tiempo de almacenamiento, se presenta en la Figura 2. El cambio de color medido visualmente con el sistema NCS

para los frutos recubiertos, se encontró en un rango de  $110 \pm 8^\circ$  (datos no mostrados). Un ángulo Hue de  $0^\circ$  representa un rojo puro, mientras que un ángulo Hue de  $180^\circ$  representa un verde puro. Tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tres tratamientos. Estudios efectuados por Lerdthanangkul y Krochta (4) con pimentones recubiertos no encontraron un cambio substancial en el color. Estos resultados sugieren que los recubrimientos comestibles no afectaron el color, que es un indicador de la maduración de los pimentones.

FIGURA 2

Razón de cambio del Color ( $C_t/C_0$ ) durante el almacenamiento (28 días a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) de pimentones verdes: (O) T1, sin recubrimiento; (□) T2, recubrimiento en la base del tallo; (Δ) T3, recubrimiento sobre toda la superficie



El efecto del recubrimiento sobre la apariencia, se evaluó calculando el parámetro  $K_A$ , que mide la velocidad del cambio de la apariencia para cada tratamiento (Tabla 2). La razón de cambio de apariencia ( $A_t/A_0$ ) durante el almacenamiento se presenta en la Figura 3. De acuerdo con los resultados se encontró que el recubrimiento aplicado sobre todo el pimentón (T3), redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) la pérdida de apariencia de los pimentones en comparación al control (T1). No se encontraron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos T2 y T3, ni entre los tratamientos T1 y T2 durante el almacenamiento.

La velocidad de cambio de la firmeza medido como el valor  $K_F$ , se muestra en la Tabla 2. Los tratamientos T2 y T3 redujeron significativamente ( $p < 0,05$ ) la pérdida de firmeza en comparación al tratamiento control T1. Sin embargo, no hubo diferencias entre éstos dos tratamientos T2 y T3 ( $p > 0,05$ ). La Figura 4 muestra la razón de cambio de la firmeza  $F_t/F_0$  evaluada por los jueces durante el almacenamiento:

FIGURA 3

Razón de cambio de la Apariencia ( $A_t/A_0$ ) durante el almacenamiento (28 días a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) de pimentones verdes: (O) T1, sin recubrimiento; (□) T2, recubrimiento en la base del tallo; (Δ) T3, recubrimiento sobre toda la superficie

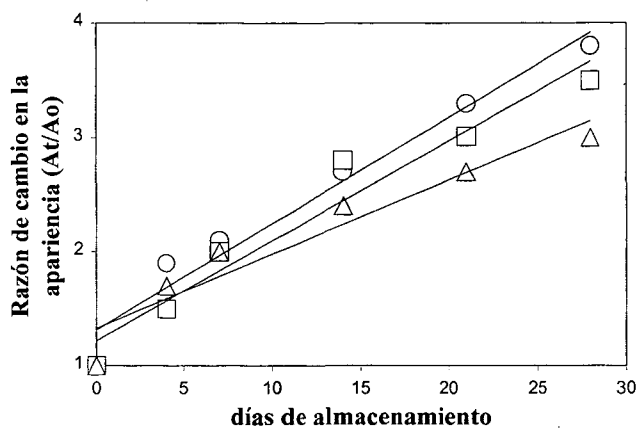
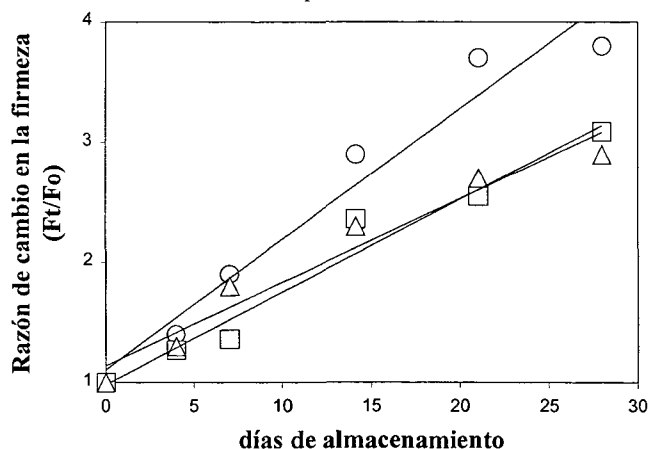


FIGURA 4

Razón de cambio de la Firmeza ( $F_t/F_0$ ) durante el almacenamiento (28 días a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) de pimentones verdes: (O) T1, sin recubrimiento; (□) T2, recubrimiento en la base del tallo; (Δ) T3, recubrimiento sobre toda la superficie



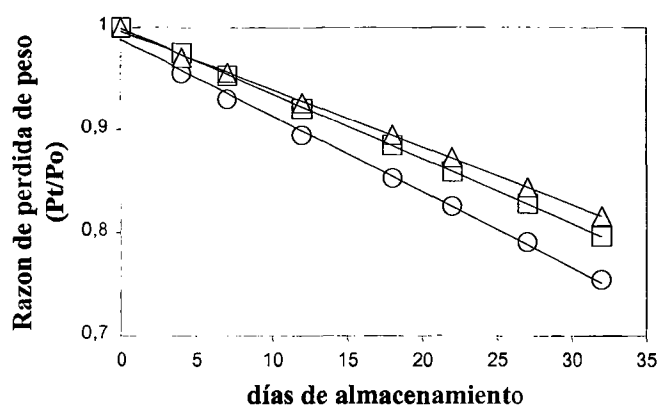
#### Pérdida de peso

La pérdida de humedad se midió como la velocidad de pérdida de peso, mediante el parámetro ( $K_p$ ) (Tabla 2). Los valores de pérdida de peso de cada una de las muestras, dentro de cada tratamiento, fueron significativamente diferentes entre ellos ( $p < 0,05$ ). La razón de pérdida de peso ( $P_t/P_0$ ) respecto al tiempo, se presenta en la Figura 5. Recubrimientos comestibles han sido aplicados para reducir la pérdida de

peso durante el manejo y almacenamiento de productos frescos (19, 21). Este resultado sugiere que la ruta de pérdida de agua ocurre a través de la piel y la base del pedúnculo, a diferencia del intercambio de gases que se produciría básicamente a través de la base del pedúnculo o tallo, según resultados anteriores.

FIGURA 5

Razón de cambio de la Pérdida de Peso ( $P/P_0$ ) durante el almacenamiento (28 días a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ) de pimentones verdes: (O) T1, sin recubrimiento; (□) T2, recubrimiento en la base del tallo; (Δ) T3, recubrimiento sobre toda la superficie



### CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este estudio se concluye que el recubrimiento basado en carboximetilcelulosa (CMC) y lípidos (ácido graso esteárico), fue efectivo para reducir el deterioro por flaccidez y marchitamiento de los pimentones durante el almacenamiento. Pimentones recubiertos en la totalidad de su superficie (T3) tuvieron una significativa menor pérdida de la calidad sensorial total, firmeza y apariencia, y además tuvieron una menor pérdida de peso en comparación al fruto sin recubrir (control) ( $p < 0,05$ ).

Asimismo los pimentones recubiertos totalmente sobre su superficie (T3) tuvieron una menor pérdida de peso ( $p < 0,05$ ) en comparación a los pimentones recubiertos sólo en la base del pedúnculo (T2). Sin embargo, entre ellos no hubo diferencias ( $p > 0,05$ ) en cuanto a calidad sensorial total, color, firmeza y apariencia. El color de los pimentones fue el atributo que menos cambió entre los tres tratamientos ( $p > 0,05$ ). Se recomienda realizar estudios sobre humectabilidad (*wettability*) y adherencia de recubrimientos sobre la superficie de los pimentones y sus efectos sobre la calidad del mismo.

### AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad de La Frontera (DIDUFRO) por el apoyo y financiamiento del presente trabajo, a través del proyecto IN 09/98.

### REFERENCIAS

1. Markus F, Daood HG, Kapitány J, Biacs PA. Change in the carotenoid antioxidant content of spice red pepper (paprika) as a function of ripening and some technological factors. *J Agric Food Chem.* 1999;47:100-107.
2. Byers T, Perry G. Dietary carotenes, vitamin C and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu Rev Nutr.* 1992;12:139-159.
3. Lownds NK, Banaras M, Bosland PW. Postharvest water loss and storage quality of nine pepper (*Capsicum*) cultivars. *Hort Sci.* 1994;29:191-193.
4. Lerdthangkul S, Krochta J. Edible coating effects on postharvest quality of green bell peppers. *J Food Sci.* 1996;61:176-179.
5. Lownds N, Bonavas M, Bosland P. Postharvest water loss and storage quality of nine pepper cultivars. *Hort Sci.* 1997;29:191-193.
6. Kester J J, Fennema OR. Edible film and coatings. *Food Technol.* 1986;40: 47-59.
7. Baldwin EA, Nisperos-Carriedo MO, Baker RA. Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *Hort Sci.* 1995;30:35-37.
8. Krochta JM, De Mulder-Johnston C. Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technol.* 1997;51:61-74.
9. Baldwin EA, Nisperos MO, Hagenmaier RD, Baker RA. Use of lipids in coatings for food products. *Food Technol.* 1997;51:56-62, 64.
10. Díaz R, Vernon EJ, Pérez LJ y García HS. 1999. Uso de recubrimientos biopoliméricos como coadyuvantes en el tratamiento fitosanitario de mango (*Mangifera indica*. Variedad Manila). *Revista Dintel. (México)*. Número 7, Año 5. pp: 42-48.
11. Morales L y Lomelín J. Prolongación del período de almacenamiento de frutas por tratamientos superficiales. *Rev.Tecnol. Aliment. (México)*. 1974;59(3): 115.
12. Park J, Testin M, Vergara P, Park H, Weller C. Application of laminated edible films to potato chip packaging. *J Food Sci.* 1996;61:766-777.
13. Koelsch C. Edible water vapor barriers: properties and promise. *Trends in Food Science & Technology.* 1994;5:76-81.
14. Park HJ, Weller CL, Vergano PJ, Testin RF. Permeability and mechanical properties of cellulose-based edible films. *J Food Sci.* 1993;58:1361-1364.
15. Wittig de Penna. Evaluación sensorial: una metodología actual para la tecnología de los alimentos. Talleres gráficos USACH. Santiago de Chile. 1982.

16. Villarroel M, Biolley E, Miranda H, Wittig E, Catalán M. Caracterización sensorial del budín de lupino utilizando la metodología superficie respuesta. Arch Latinoamer Nutr. 1996;46:230-233.
17. Norma UNE 48-103-94. 1994. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Norma Española de Colores. Madrid, España.
18. Cameron AC, Yang SF. A simple method for determination of resistance to gas diffusion in plant organs. Plant Physiol. 1982;70:21-23.
19. Smith SM, Stow JR. The potential of a sucrose ester coating material for improving the storage and shelf-life qualities of Cox's Orange Pippin apples. Ann appl Biol. 1984;104:383-391.
20. Cisneros-Zevallos L, Salveit M, Krochta J. Hygroscopic coating control surface white discoloration of peeled carrots during storage. J Food Sci. 1997;62:363-366,398.
21. Banks NH. Internal atmosphere modification in pro-long coated apples. Acta Horticulturae, 1984;157:105-112.

Recibido:15-07-2001

Aceptado: 25-10-2001

## Optimización de una formulación de espaguetis enriquecidos con fibra dietética y micronutrientes para el adulto mayor

*Emma Wittig de Penna, Lisis Serrano, Andrea Bunger, Delia Soto, Luis López, Nieves Hernández, Jenny Ruales*

Universidad de Chile. Santiago., Instituto de Investigaciones para la Industria de Alimentos-La Habana. Cuba,  
Instituto de Investigación Tecnológica, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador

**RESUMEN.** Numerosos estudios han demostrado que debido a diferentes causas, existe un déficit en la ingesta de fibra en la población adulta mayor, la cual puede causar diferentes patologías, tales como constipación, cáncer de colon, diverticulosis. Para ofrecer alternativas de solución a esta realidad se desarrollaron formulaciones de espaguetis enriquecidos con fibra dietética, por ser un alimento de consumo habitual. La fibra usada fue harina de salvado de lupino dulce (VitaFiber) y se empleó gluten (Vital de trigo 75%) como aditivo mejorador. Se usó el método de superficie de respuesta para optimizar la formulación, con un diseño rotacional compuesto, con dos variables, ensayando concentraciones entre 7,14 y 14,29% de harina de salvado de lupino dulce y 0,1 a 2,0% de gluten como variables independientes. Las variables dependientes fueron las respuestas de 10 jueces entrenados que evaluaron los diferentes parámetros de calidad sensorial (color, forma, olor, sabor y textura) con el test de Karlsruhe de 9 puntos. La formulación optimizada correspondió a la elaborada con 66,7% de sémola, 7,14% de harina de salvado de lupino dulce, 24,7% de agua y 1,05% de gluten. Este producto optimizado fue enriquecido con 0,019% de un premix de vitaminas (A, E, B<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y ácido fólico) y 0,41% de minerales (Ca, Fe, Zn) de forma tal que 100 g de fideos secos cumplieran con aportar alrededor del 30% de las recomendaciones de la IDR para adultos mayores. El producto final contiene 11,05 g/100g de fibra dietética total, 984 UI de vitamina A, 4,52 UI de vitamina E y 0,38mg de vitamina B<sub>2</sub> por 100g y 208 mg de Calcio, 3,16 mg de Hierro y 4,8 mg de Zinc, por 100g, respectivamente. Se concluye que el producto elegido es un buen vehículo para aumentar el consumo de fibra dietética, por ser un alimento de uso habitual, de preparación simple y de fácil consumo.

**Palabras clave:** Espaguetis enriquecidos, alimentos con fibra dietética, optimización de formulaciones, adulto mayor.

### INTRODUCCION

Se ha propuesto el desarrollo de alimentos enriquecidos con fibra dietética, vitaminas y minerales para el adulto mayor, cuya base la constituyen estudios previos acerca de la ingesta de nutrientes y de la prevalencia de enfermedades metabólicas, con el propósito de contribuir a mejorar la calidad de vida de este grupo etario (1,2).

Los efectos fisiológicos de la fibra dependen de las

**SUMMARY.** Optimization of a spaghetti formula enriched with dietary fibre and micronutrients for elderly people. Several studies have demonstrated low dietary fiber intake in elderly people, which increases the risk of diseases such as constipation, colon cancer and diverticulosis. A spaghetti formula enriched with lupin fibre was developed to increase the dietary fibre intake in elderly people, as spaghetti are frequently consumed in this age group. Sweet lupin bran (VitaFiber®) was used as fibre source and gluten was used as improving additive. Response surface methodology with a two variable composite rotatable design was applied to optimize the formulations. The independent variables were lupin bran (7.14 -14.29%) and gluten Vital (0.1-2.0%). The dependent variables were the responses of a trained 10-member sensory panel who evaluated the sensory quality parameters color, shape, aroma, flavor and texture by the Karlsruhe 9-point test. The optimized formula was prepared with 66.7% semoline, 7.14% lupin bran, 1.05% gluten and 24.7% water, enriched with 0.019% of a vitamin premix (A, E, D, B<sub>2</sub>, B<sub>12</sub> and folic acid) and with 0.41% of a mineral premix (Ca, Fe, Zn), in order to meet 30 % of the RDA for the elderly per 100 g dry spaghetti. The dietary fibre content of the optimized product was 11.05 g/100g. The study showed that fibre-enriched spaghetti formula is a good way to increase dietary fibre intake in elderly people, as it is a common food, simple to prepare and easy to eat.

**Key words:** Enriched spaghetti, fibre-enriched food, formula optimization, elderly.

propiedades físico-químicas de la fuente de fibra (3,4). La fibra insoluble es muy efectiva en aumentar el volumen fecal debido a que pasa intacta a través del tracto gastrointestinal y contribuye a la formación de heces voluminosas y suaves, disminuyendo así el tiempo de tránsito intestinal y la presión colónica. Por esta razón tiene poco efecto metabólico (5). La fibra soluble, especialmente cuando aumenta la viscosidad del contenido intestinal, tiene mayor efecto en reducir los niveles plasmáticos de colesterol (6), reducir la respuesta

glicémica postprandial (3) y retardar el vaciamiento gástrico. Otro efecto de la fibra dietética es disminuir la biodisponibilidad de proteínas, grasas y algunos minerales y vitaminas (7,4). Este efecto no está del todo esclarecido y es necesario seguir investigando acerca de las fracciones de la fibra dietética que podrían ser las causantes de la modificación de la biodisponibilidad de los diferentes nutrientes (8,9). Estudios clínicos indican que la adición de fibra a la dieta puede causar inicialmente una severa flatulencia, síntoma que desaparece luego de algunas semanas de tratamiento. Este fenómeno podría explicarse por el reemplazo de microorganismos productores de gases por otros que los producen en menor proporción, como lactobacilos y estreptococos (10).

Entre las fuentes naturales de fibra se encuentran los cereales, leguminosas, frutas y hortalizas. Un subproducto del proceso de obtención de la harina de lupino (*Lupinus albus* var. *Multolupa*) lo constituye la cáscara o salvado (11-14). La cáscara está compuesta principalmente de polisacáridos estructurales (fundamentalmente celulosa) y se considera una buena fuente de fibra dietética (15). En la literatura es posible encontrar una serie de trabajos relacionados con la incorporación de harina de lupino dulce a diferentes productos con el fin de mejorar su contenido proteico, tanto cuali como cuantitativamente. Entre otros se pueden mencionar: galletas, (16,17); mermeladas (18); alimentos infantiles (19), fideos (20) y pan (21).

Existe un producto comercial a base de salvado de lupino, Vitafiber, que contiene 84% de fibra dietética, con 4,5% de fibra soluble y 79,5% de fibra insoluble, que ha sido empleado con éxito en la elaboración de diferentes variedades de galletas (22,23), de bizcochuelos (24,25), de magdalenas (26), de bebidas (27) y de pan (28). Este producto tiene una granulometría tal que permite su manejo como si fuera una harina de trigo, lo que facilita su incorporación a tan variado grupo de formulaciones.

El objetivo del estudio fue diseñar, elaborar, optimizar la calidad - al incorporar harina de salvado de lupino y de gluten - y controlar la calidad de una formulación de espaguetis para el adulto mayor, que aporte fibra dietética, vitaminas y minerales, según recomendaciones nutricionales internacionales para este grupo.

## MATERIAL Y METODOS

Para la elaboración del producto se utilizaron las siguientes materias primas: Sémola especial A (Lucchetti S.A, Chile), harina de salvado de lupino dulce (HSL) (Vitafiber, Avelup, Chile), gluten Vital de trigo 75% (Granotec, Chile), vitaminas A, D, E, B2, B12, Ácido Fólico (Roche, Suiza), sulfato ferroso (Roche, Suiza), sulfato de zinc monohidratado (Roche, Suiza), fosfato de calcio dibásico

(Merck, Alemania).

Los equipos empleados fueron los siguientes: Equipo piloto para elaborar pastas (La Prestigiosa 2500), balanza granataria (Sartorius, balanza analítica (Mettler BB 244), túnel de aire forzado con registro automático de la temperatura (Salva), higrómetro (Novasina TH 200 Defensor), cromatógrafo HPLC (Perkin Elmer LF 30, Detector arreglado de Yodo 375 C, Bomba Serie 440 para vitaminas hidrosolubles y serie 10 para liposolubles), espectrofotómetro de Absorción Atómica (Perkin Elmer)

El trabajo se realizó en las siguientes etapas:

- \* Elección, caracterización y controles de las materias primas
- \* Ensayos preliminares
- \* Elaboración de los espaguetis
- \* Evaluación sensorial
- \* Optimización de la formulación a elaborar
- \* Controles físicos, químicos y microbiológicos del producto optimizado

### Caracterización y controles de las materias primas:

Se realizaron los siguientes análisis físicos y químicos en triplicado a la sémola especial A y a la harina de salvado de lupino dulce:

**Sémola especial A:** Humedad, granulometría, aspecto y color (inspección visual), gluten, cenizas, acidez (29), fibra dietética (30).

**Harina de salvado de lupino dulce (HSL):** Humedad, extracto etéreo, proteínas, cenizas, fibra dietética (30).

Tanto en ambas materias primas como en el producto optimizado, se realizaron los siguientes controles y recuentos microbiológicos: Recuento total de gérmenes aerobios mesófilos viables, de hongos, levaduras de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (31).

**Vitaminas y minerales:** Las vitaminas tienen calidad certificada (Roche S.A. División Vitaminas, Chile). Se adicionaron en una premezcla, calculada para que 100g de espaguetis secos tuvieran un 30% del IDR para el adulto mayor. En la Tabla 1 se presenta la composición de la premezcla usada.

Los minerales son calidad pro análisis; la procedencia de las sales empleadas se señala al inicio de esta sección. En la adición de minerales, para hierro y zinc también se consideró un 30% del IDR para adultos mayores. Para el calcio, en cambio, se consideró el 30 % del IDR para 150 g de espaguetis secos, debido a los problemas de solubilidad del fosfato dibásico de calcio elegido. En la Tabla 1 se presenta la composición de esta premezcla.

TABLA 1  
 Vitaminas y minerales adicionadas a la formulación optimizada de espaguetis

Vitaminas	RDA (51 años y más)	mg /100 g materias primas*	Forma comercial	Actividad	mg /100 g formulación adicionados
A	3.333 UI**	500 UI**	Vit. A Palmitato 250 CWS***	250 UI/mg	6.89
D	200 UI**	-	Vit. D <sub>3</sub> 100 CWS***	100 UI/mg	1.33
E	15 UI**	2UI**	Vit. E 50 % CWS***	50%	9.01
B <sub>12</sub>	2.0 mcg	-	Vit. B <sub>12</sub> 0.1 %	0.10%	0.87
Ac. fólico	200 mcg	26 mcg	Ácido fólico	90%	0.07
B <sub>2</sub>	1.4 mg	0.3	Riboflavina	100%	0.33
Hierro	10 mg	3	Sulfato ferroso	31.6 %	1.05
Calcio	800 mg	58	Fosfato de calcio dibásico	30 %	400
Zinc	15 mg	0.70	Sulfato de zinc monohidratado	35.3 %	12.18

\* aporte natural de las materias primas

\*\* UI Unidades Internacionales

\*\*\* CWS hidrosoluble

**Gluten:** Corresponde a un producto comercial denominado "gluten Vital de trigo 75%" (Granotec), de calidad aprobada para alimentos (32). Posee un buen grado de hidratación (150 a 200% de su peso) y coagula a 85°C, favoreciendo la estructura.

**Ensayos preliminares:** Se realizaron ensayos preliminares con el fin de estandarizar las variables de elaboración de los espaguetis: proporción de agua, tiempos de humectación y homogeneización, temperatura, etc. para uniformar el manejo de la masa en el equipo piloto de elaboración.

**Elaboración de los espaguetis:** Las diferentes formulaciones desarrolladas durante el estudio, se elaboraron en la industria Lucchetti S.A. (Región Metropolitana, Santiago, Chile) usando un equipo piloto para elaborar pastas. Las diferentes etapas del proceso de elaboración empleado, fueron: El pesaje se realizó en balanza de granatario (Sartorius, capacidad 3 kg). La homogeneización se hizo por mezclado para lograr una distribución uniforme de los componentes. Las vitaminas y minerales se adicionaron gradualmente a la sémola del producto ya optimizado. Posteriormente se mezcló durante 5 minutos en la cámara mezcladora del extrusor. La humectación hasta 33% de humedad, se realizó añadiendo el agua lentamente (15 minutos) para formar una masa húmeda y homogénea, cuidando de dosificarla correctamente para evitar que los espaguetis se adhieran entre sí o a la máquina, se rompan o queden con manchas blancas. El amasado y la extrusión se llevaron a cabo según las operaciones establecidas en la Industria, empleando un cilindro con espiral que hace ambas

operaciones, al vacío, evitando así la presencia de zonas opacas, más débiles, en el producto final y a la vez controlando la acción de la lipogenasa que decolora los carotenoides del trigo, lo que produce la aparición de vetas en el producto final. El secado se realizó sobre varillas de aluminio, en túnel de aire forzado, con registro constante de la temperatura. Esta etapa se realizó en tres tiempos: (I) presecado, con temperaturas desde 41,9°C hasta 72,2°C, la humedad bajó hasta un 22% (II) fue el más largo, ya que se consolidó el secado, pasando por temperaturas desde 76,5°C hasta 88,6°C durante 5 a 6 horas. El producto alcanzó un 12% de humedad o menos. (III) El producto pasó por una zona donde la temperatura fue cada vez más baja, hasta llegar a 33°C aproximadamente. Este es un proceso continuo que tarda entre 6 y 7 horas, en el cual se lleva un registro automático de la temperatura. El envasado se realizó manualmente en bolsas de polietileno y papel opaco, para prevenir las pérdidas posibles de vitaminas (33), a 20-25°C y 55- 60% de humedad relativa.

**Evaluación sensorial:** Simultáneamente se realizó el entrenamiento de los panelistas que evaluarían la calidad de los espaguetis durante la optimización de la formulación. El panel estuvo constituido por 10 jueces de 20 a 55 años de edad, de ambos sexos, entrenados en otros tipos de alimentos y que recibieron un entrenamiento adicional para evaluar calidad de espaguetis. Para tal efecto, se programaron 10 sesiones de evaluación de diferentes tipos de espaguetis comerciales y también productos de los 6 ensayos preliminares de este estudio, que presentaban diferentes defectos, y que fueron sometidos a distintos tiempos de cocción. Se obtuvo así una variada gama de defectos posibles.

Se aplicó el test general de Karlsruhe (34) evaluando en panel abierto los parámetros color, apariencia y forma en espaguetis sin cocer y estos mismos parámetros más sabor, olor y textura en espaguetis cocidos. La cocción se realizó en proporción 1:10 de agua a 98°C, adicionada de 6% de aceite de maíz y 6% de sal común, durante 12 minutos, luego se escurrieron y sirvieron calientes en platillos codificados. Con los mismos panelistas se definieron los descriptores de los parámetros de calidad que mejor definen la calidad organoléptica del producto, en escala de 1 a 9.

El entrenamiento permitió unificar criterios en el significado de cada uno de los descriptores usados en los tests y elaborar la escala de Karlsruhe para espaguetis (Tabla 2). La calidad total de los espaguetis corresponde a la sumatoria del valor promedio ponderado del parámetro (34), de acuerdo a la fórmula

$$\text{calidad total} = 0,15 \text{ apariencia} + 0,10 \text{ color} + 0,05 \text{ olor} + 0,10 \text{ forma} + 0,30 \text{ sabor} + 0,30 \text{ textura}$$

TABLA 2  
Tabla de Karlsruhe para espaguetis con fibra de lupino

Características	Calidad Grado 1: Características Típicas			Calidad Grado 2: Deterioro Tolerable			Calidad Grado 3: Deterioro Indeseable		
	Excelente 9	Muy Buena 8	Buena 7	Satisfactoria 6	Regular 5	Suficiente 4	Defectuosa 3	Mala 2	Muy Mala 1
Apariencia	Muy uniforme y regular en todas las unidades. Partículas muy uniformes. Pecas/puntos apenas perceptibles.	Uniforme. Homogéneo. Partículas uniformes. Algunos puntos/pecas finos.	Aún uniforme. Escasas pecas/puntos finos. Partículas aún uniformes.	Algo desuniforme. Pecas/puntos claramente perceptibles.	Desuniforme. Abundante presencia de pecas/puntos. Levemente heterogénea.	Muy desuniforme. Marcada presencia de pecas/puntos. Algo heterogénea.	Deformaciones marcadas. Pecas/puntos grandes y abundantes. Heterogénea.	Deformaciones muy marcadas. Pecas/puntos muy abundantes y grandes. Muy heterogénea.	Excesivas deformaciones. Excesivas pecas/puntos.
Aroma	Muy típico, suave a fibra. Equilibrado.	Típico, suave a fibra. Equilibrado.	Aún típico, suave a fibra. Aún equilibrado.	Leve aroma a crudo (harina). Moderado a fibra.	Moderado a crudo. Marcado a fibra.	Aroma a crudo aún tolerable. Excesivo a fibra.	Presencia acentuada de aroma a crudo. Muy excesivo a fibra.	Presencia de aromas extraños.	Presencia intolerable de aroma extraño. Repugnante.
Color	Beige-amarillo muy típico. Muy uniforme. Brillo muy natural.	Beige-amarillo típico. Uniforme. Brillo natural.	Beige-amarillo aún típico. Ligeramente oscuro. Aún brillante.	Beige-amarillo algo oscuro. Algo opaco. Algo disparejo.	Beige-amarillo oscuro. Opaco.	Beige-amarillo muy oscuro. Muy opaco. Algo desuniforme.	Café oscuro. Atípico. Desuniforme.	Café muy oscuro. Muy atípico. Muy desuniforme.	Color muy alterado. Marcadamente desuniforme.
Forma	Unidades muy bien formadas. Muy bien diferenciadas.	Unidades bien diferenciadas. Bien formadas.	Unidades aún formadas. Separadas.	Algunas unidades ligeramente pegoteadas.	Algunas unidades algo pegoteadas. Difícil de separarlas.	Unidades pegoteadas. Adhesivas.	Unidades muy pegoteadas. No se separan (en bloque).	Las unidades no se diferencian. Aspecto masa. Algo amorfo.	Las unidades no se distinguen. Amorfo.
Sabor	Muy característico. Sabor muy típico, suave a fibra. Equilibrado.	Característico. Sabor típico, suave a fibra. Equilibrado.	Aún característico. Aún típico, suave a fibra. Aún equilibrado.	Leve sabor a crudo (harina). Moderado sabor a fibra.	Moderado sabor a crudo (harina). Marcado sabor a fibra.	Sabor a crudo aún tolerable. Excesivo sabor a fibra.	Presencia acentuada de sabor a crudo. Sabor a fibra muy excesivo.	Presencia de sabor extraño. Incomible.	Presencia intolerable de sabor extraño. Repugnante.
Textura	Firme. Adhesividad característica. Masticabilidad óptima. Muy levemente áspera.	Aún firme. Ligeramente adhesiva. Masticabilidad muy buena. Levemente áspera.	Algo duro o blando. Buena adhesividad y masticabilidad. Algo áspera.	Duro o blando. Falta de cohesividad, la masa no se integra al masticar. Algo pegajosa. Áspera.	Muy duro o muy blando. Al masticarse separan los trozos no integrados. Sin cohesividad. Pegajoso. Muy áspero.	Textura alterada pero aún aceptable. Muy adhesivo. Muy pegajoso. Extremadamente áspero.	Demasiado blando. Pastosos. Deshechos.	Muy pastosos. Muy pegajosos.	Demasiado pegajosos. Repugnante. Muy pastoso.

**Optimización de la formulación.** De acuerdo al diseño experimental proporcionado por la metodología de superficie de respuesta (MSR) (35,36) se elaboraron formulaciones con concentraciones entre 7,14 y 14,29% de HSL y entre 0,10 y 2,0% de gluten. La formulación seleccionada fue enriquecida con vitaminas y minerales, se consideraron las recomendaciones del NRC (1989) que señala que las pastas secas se enriquecen con un 25-30% de la ingesta diaria recomendada (IDR) por porción (100-150g). Se consideró además un 10% de sobredosificación para contrarrestar las posibles pérdidas durante el proceso de elaboración, eligiéndose el proceso de secado continuo, ya descrito, y cumplir así con los niveles establecidos (37-40). Las vitaminas y minerales se adicionaron en estado sólido al producto optimizado, antes de elaborar la masa, por ser ésta la forma habitual en que se agregan en la industria molinera.

**Diseño experimental:** Se eligió el diseño  $2^3$  que corresponde a un diseño compuesto central bidimensional rotacional con dos variables,  $x_1$  y  $x_2$  a 3 niveles. Las variables independientes fueron gluten y HSL. La variable dependiente corresponde a la calidad sensorial, determinada con el panel entrenado empleando el test de Karlsruhe y la escala de 1 a 9.

El número de formulaciones elaboradas según este diseño correspondió a 13. Se usó una tabla de números aleatorios para definir el orden en que se presentaron las formulaciones al panel.

La matriz del diseño experimental empleado se presenta en la Tabla 3.

TABLA 3  
Diseño experimental central compuesto rotacional

Número de ensayo	Variables codificadas		Variables naturales	
	$X_1$	$X_2$	HSL	Gluten vital
1	-1	-1	8.18	0.38
2	1	-1	13.25	0.38
3	-1	1	8.18	1.72
4	1	1	13.25	1.72
5	-1.414	0	7.14	1.05
6	1.414	0	14.29	1.05
7	0	-1.414	10.72	0.10
8	0	1.414	10.72	2.00
9	0	0	10.72	1.05
10	0	0	10.72	1.05
11	0	0	10.72	1.05
12	0	0	10.72	1.05
13	0	0	10.72	1.05

La ecuación que representa este modelo es un polinomio de segundo orden:

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_{1,1} (X_1)^2 + B_{2,2} (X_2)^2 + B_{1,2} X_1 X_2$$

donde  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_{1,1}$ ,  $B_{2,2}$ ,  $B_{1,2}$  corresponden a los coeficientes de regresión cuyos valores fueron determinados usando el programa Statgraphics plus versión 2,0 (Manugistics, Inc.). Se seleccionaron los de mayor significación (prueba de Fisher) y construyeron los gráficos de MRS y de contorno (41).

**Controles físicos, químicos y microbiológicos del producto optimizado:** Se determinó humedad (30), actividad de agua, proteínas por método de Kjeldahl (30), lípidos (30), cenizas totales por calcinación a 500°C (30), vitaminas A,  $B_{12}$ , E y D por cromatografía líquida de alta presión, calcio, hierro y zinc por espectrofotometría de absorción atómica (30) y fibra dietética total, soluble e insoluble, por método enzimático de (42). Se realizaron recuentos de aerobios mesófilos totales (31), de hongos y levaduras (31), de coliformes totales (31), de *Escherichia coli* (31) y de *Staphylococcus aureus* (31), considerando los criterios del Reglamento Sanitario de Alimentos (43).

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Caracterización y controles de las materias primas:** Los resultados de los controles realizados a los dos principales componentes de la formulación, sémola y harina de salvado de lupino, se presentan en las Tablas 4 y 5, respectivamente.

TABLA 4  
Análisis físicos, químicos y microbiológicos de la sémola especial A

Análisis Físicos	Resultados*
Granulometría	70% bajo 300 micrones
Color	amarillo ámbar claro
<b>Análisis Químicos (g/100g)</b>	<b>X ± DE</b>
Humedad	12.0 ± 1,06
Gluten (seco)	9.0 ± 1,73
Cenizas totales	0.75 ± 0,98
Acidez (en H <sub>2</sub> )	0.25 ± 0,56
Fibra dietética total (base húmeda)	2.41 ± 0,19
Fibra dietética total (base seca)	2.84 ± 0,17
<b>Análisis microbiológico (ufc/g)</b>	
Recuento total de aerobios mesófilos	500
Hongos y levaduras	<10
Coliformes totales	<10
<i>Escherichia coli</i>	<10
<i>Staphylococcus aureus coagulasa (+)</i>	<10

\*resultados promedio de 3 repeticiones

**TABLA 5**  
Análisis físicos, químicos y microbiológicos de la harina de salvado de lupino dulce

Análisis Químicos (g/100g)	Resultados* X ± DE
Humedad	7.6 ± 0.99
Extracto etéreo	0.6 ± 1.53
Proteínas	3.6 ± 1.48
Cenizas	2.1 ± 0.75
Fibra dietética total (base húmeda)	84.0 ± 1.97
Fibra dietética total (base seca)	91.3 ± 1.99
Fibra dietética insoluble (base húmeda)	79.5 ± 2.21**
Fibra dietética soluble (base húmeda)	4.5 ± 1.91**
<b>Análisis microbiológico (ufc/g)</b>	
Recuento total de aerobios mesófilos	220
Hongos y levaduras	<10
Coliformes totales	<10
<i>Eschenchia coli (ufc/g)</i>	<10
<i>Staphylococcus aureus coagulasa +</i>	<10

\* resultados promedio de 3 repeticiones \*\*Pak (44)

**Elaboración del producto:** Al adicionar HSL a la formulación tradicional de espaguetis, las características de la masa se modificaron, por lo que fue necesario adicionar gluten de trigo, cuya concentración constituyó una de las variables independientes de este estudio.

**Optimización del producto:** Los valores  $\alpha$  de la variable independiente HSL se determinaron en forma práctica, elaborando formulaciones con diferentes contenidos de HSL.

En la Tabla 4 se presentan las concentraciones de HSL y de gluten calculadas para cada variable codificada.

Los resultados de las variables dependientes determinados con el test de calidad por parámetro de 9 puntos de Karlsruhe se presentan en la Tabla 6.

Al realizar el análisis de regresión para la variable respuesta, fueron color y textura las que alcanzaron los mayores coeficientes de determinación. En la Tabla 7 se presentan los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), los niveles de significación del análisis de varianza (p) y el estadígrafo de Durbin-Watson para estos parámetros.

**TABLA 6**  
Resultados de las variables respuesta utilizando el método de Karlsruhe.

Variable independiente (%)	Puntajes de las variables dependientes*							
	HSL	gluten vital	Apariencia X ± DE	Aroma X ± DE	Color X ± DE	Forma X ± DE	Sabor X ± DE	Textura X ± DE
10.72	1.05	7.72±0.83	7.56±0.51	7.44±0.77	8.11±0.54	7.33±0.63	7.56±1.03	7.56±0.97
10.72	1.05	7.00±0.79	7.33±0.32	7.22±0.64	8.11±0.09	6.89±0.75	7.33±0.88	7.22±1.21
8.18	0.38	7.33±0.76	7.78±0.34	7.89±0.63	7.4±0.25	7.89±0.81	7.44±0.85	7.62±1.09
7.14	1.05	8.61±0.77	8.44±0.41	8.39±0.73	8.39±0.39	8.11±0.59	8.00±1.09	8.23±1.13
14.29	1.05	7.11±0.81	7.22±0.30	6.89±0.69	8.00±0.09	7.11±0.48	7.17±1.25	7.20±1.05
10.72	1.05	8.11±0.53	7.78±0.23	7.72±0.85	8.11±0.19	7.78±0.51	7.78±0.96	7.86±0.95
10.72	0.10	8.11±0.41	8.11±0.29	7.89±0.71	8.22±0.24	7.89±0.62	7.50±0.89	7.85±1.21
10.72	1.05	7.78±0.38	8.00±0.31	7.72±0.48	8.00±0.31	7.78±0.70	7.56±1.00	7.74±1.06
13.25	1.72	7.56±0.62	7.56±0.47	7.56±0.68	7.78±0.29	7.67±0.57	7.33±0.85	7.54±1.58
13.25	0.38	7.78±0.51	7.56±0.45	7.39±0.49	7.83±0.23	7.67±0.47	6.83±0.78	7.42±1.78
8.18	1.72	8.11±0.78	8.00±0.51	8.17±0.58	8.33±0.27	7.78±0.67	7.90±0.69	7.98±1.64
10.72	2.00	8.06±0.81	7.72±0.47	7.78±0.49	8.44±0.16	7.56±0.39	7.33±0.74	7.68±0.79
10.72	1.05	7.89±0.64	7.67±0.39	7.78±0.65	8.00±0.17	7.44±0.51	7.39±0.83	7.59±1.04

\*Valores promedio del panel (n=10)

TABLA 7  
Análisis de regresión de los puntajes para color y textura

VARIABLES DEPENDIENTES	R <sup>2</sup> AJUSTADO POR G. DE L. (%)	p	ESTADÍGRAFO DURBIN WATSON
Color	72.839	0.0006	2.22
Textura	60.920	0.009	2.12

Para ambos parámetros, la relación entre las variables es estadísticamente significativa ( $p < 0,01$ ). De acuerdo con los valores de R<sup>2</sup> ajustados (lo cual es más útil para comparar modelos, con diferentes variables independientes) los modelos, representados por las ecuaciones (1) y (2), explican el 72,83% de la variabilidad del color y el 60,92% de la variabilidad de la textura, respectivamente.

Tanto para color como para textura, el estadígrafo de Durbin.Watson, que determina si existe alguna correlación significativa de los residuos basado en el orden en el cual se encuentran los datos, es mayor que 1,4 lo que indica que no existe autocorrelación entre los residuos.

Las ecuaciones ajustadas para textura y color fueron:

$$(1) \text{ textura} = 7,52348 + 0,294225 \times \text{HSL} + 0,0899483 \times \text{gluten} - 0,08566527 \times \text{gluten}^2$$

$$(2) \text{ color} = 7,5421 - 0,403915 \times \text{HSL} + 0,1677 \times \text{gluten}^2$$

Como puede observarse, el puntaje para textura aumenta al disminuir los niveles de HSL y al aumentar los niveles de gluten (Figura 1). Los puntajes mayores de textura corresponden a 8,0 y a 7,9 con niveles de HSL que van desde (-1,2) hasta (-1,6) y de gluten desde (-0,6) hasta (-1,2) (Figura 2). Se eligió un nivel medio para gluten (0) ya que incrementos mayores de gluten no tuvieron un efecto significativo sobre la textura. Para HSL se decidió utilizar el nivel (-1,414) con el que se obtuvo un puntaje de 7,94.

FIGURA 1  
Superficie de respuesta para textura

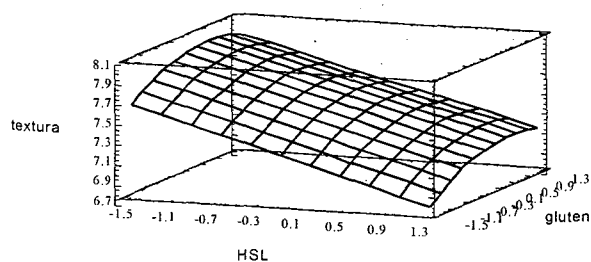
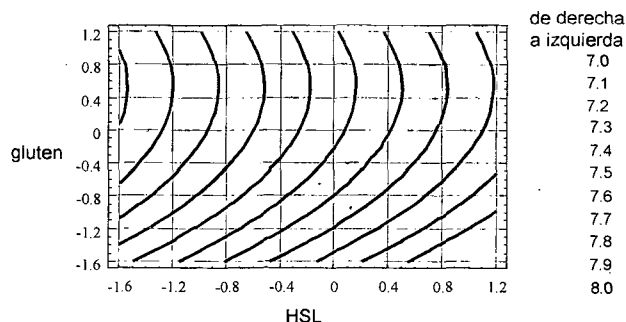


FIGURA 2  
Gráfico de contorno para textura



El comportamiento del color es similar con respecto a la HSL; sin embargo, con respecto al gluten es diferente, ya que el puntaje de color incrementa tanto al aumentar como al disminuir los niveles de gluten (Figura 3). Sin embargo, el rango de incremento es mínimo (Figura 4) y no es estadísticamente significativo. Al sustituir los valores de las variables codificadas seleccionadas (-1,414 para HSL y 0 para gluten) en las ecuaciones ajustadas para textura y color, se obtuvieron puntajes de 7,94 y 8,11 para estos parámetros, respectivamente, lo cual califican al producto, según la escala de Karlsruhe empleada, como muy bueno. Los valores reales de las variables codificadas seleccionadas, corresponden a 7,14% de HSL y a 1,05% de gluten Vital.

FIGURA 3  
Superficie de respuesta para color

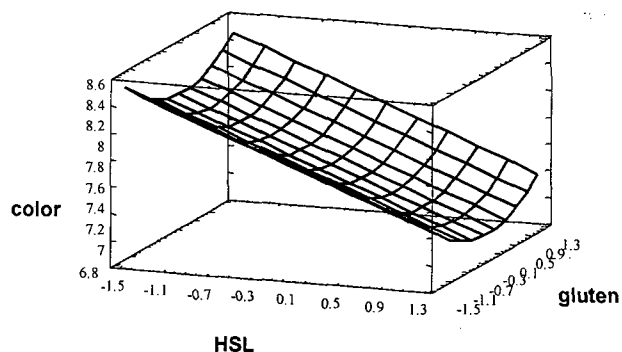
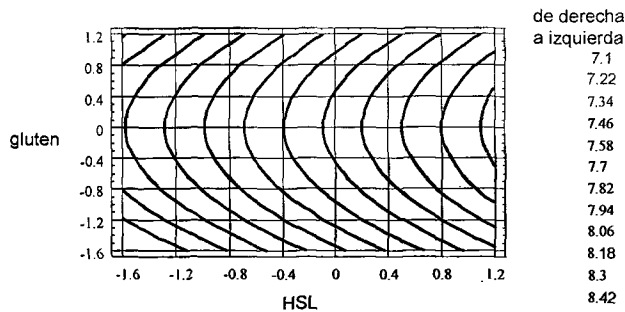


FIGURA 4  
Gráfico de contorno para color



La fórmula del producto final se presenta en la Tabla 8 y los análisis físicos, químicos y microbiológicos en la Tabla 9. Se observa que el producto contiene un 11,05 g/100g de fibra dietética total (base húmeda), con una relación de fibra soluble: fibra insoluble de 1:4,5. Esta fibra dietética sería aportada tanto por la HSL (8,56 g/100g en base seca) como por la sémola de la formulación (1,61 g/100 g en base seca). La fibra dietética de la HSL proporciona 8,10 g/100 g de fibra insoluble (base seca) y 0,46 g/100g de fibra soluble (base seca)(43), en tanto la sémola aporta 0,96 g/100g de fibra insoluble y 0,71g/100g de fibra soluble, ambas en base seca.

TABLA 8  
Formulación optimizada de espaguetis

Materias primas	Formulación (%)
Sémola especial A	66.66
Harina de salvado de lupino dulce	10.71
Gluten Vital	1.05
Premix vitaminas	0.019
Premix minerales	0.413
Agua	21.14

Si consideramos que en un tiempo de comida se consumen alrededor de 50-70 g por preparación culinaria, el aporte de fibra sería de 5,5-7,7 g de fibra dietética, la que representa aproximadamente un 30% del consumo diario, ya que en los otros tiempos de comida se estaría ingiriendo el resto de fibra dietética. Al entregar cantidades mayores de fibra, éstas no fueron bien toleradas, especialmente por saciedad y hábitos alimentarios arraigados (45,46).

Respecto al aporte de vitaminas se observa que los niveles quedaron entre el 9 y 15% del nivel preestablecido, lo que podría deberse al efecto térmico del proceso. Sin embargo, los valores alcanzados se encuentran dentro de los niveles señalados para pastas por la FDA (31). La vitamina D no fue detectada, esto podría deberse a que la sobredosificación usada

no fue suficiente para contrarrestar las pérdidas por efecto del proceso de elaboración o a una deficiente homogeneización en la masa del producto la que es resultante de la forma cristalina empleada y a que el premix fue adicionado en forma manual. Al trabajar a escala industrial la adición de ambas premezclas puede mejorarse empleando un dosificador volumétrico y estableciendo la velocidad y tiempo de mezclado según el tamaño de partícula.

TABLA 9  
Controles físicos, químicos y microbiológicos de la formulación optimizada de espaguetis

Análisis físicos	Resultados*
Actividad de agua	0.445
<b>Análisis químicos (g/100g)</b>	<b>X ± DE</b>
Proteína (N x 6,25)	9.8 ± 1.07
Lípidos	2.9 ± 0.99
Cenizas totales	1.4 ± 0.32
Fibra dietética total	11.05 ± 1.03
Fibra dietética soluble	2.04 ± 0.88
Fibra dietética insoluble	9.01 ± 0.57
Humedad	11.45 ± 1.01
Extracto no nitrogenado (calculado)	63.40 ± 1.89
Vitamina A UI/100g	984 ± 3.87
Vitamina E UI/100g	4.52 ± 1.38
Vitamina D UI/100g	no detectada
Vitamina B <sub>2</sub> mg/100g	0.38 ± 0.01
Calcio mg/100g	2.8 ± 2.56
Hierro mg/100g	3.16 ± 0.55
Zinc mg/100g	4.8 ± 0.68
<b>Controles microbiológicos (ufc/g)</b>	
Recuento total de aerobios mesófilos	100
Recuento de hongos y levaduras	<10
Recuento de Coliformes totales	<10
Recuento de <i>Escherichia coli</i>	<10
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa +	<10

\*resultados promedio de 3 repeticiones

Los minerales hierro y zinc están entre 4 y 5% por debajo de las cifras especificadas en el diseño del producto. El calcio al contrario tiene un 4% de exceso del valor especificado inicialmente, el que podría provenir de las materias primas.

## CONCLUSIONES

Es posible elaborar espaguetis con un contenido de fibra dietética de 11,05 g/100 g y una relación de fibra soluble: fibra insoluble de 1:4,5.

Este nivel de fibra corresponde a una ingesta 7,7g por ración, la que sumada con otros alimentos de consumo permite alcanzar valores promedio de hasta 20 g.

El producto elegido constituye un buen vehículo para aumentar el consumo de fibra dietética del adulto mayor, por ser un alimento de uso frecuente en su alimentación, de preparación simple y de fácil consumo.

El producto fue enriquecido con 984 UI/100g de vitamina A, 4.52 UI/100g de vitamina E, 0.38 mg/ 100g de vitamina B2, ácido fólico y vitamina D3, valores que corresponden entre el 25 y el 30% del IDR para adultos mayores de 51 años.

El enriquecimiento con minerales señala que el producto aporta 2.8 mg/ 100g de calcio, 3,16 mg/100g de hierro y 4,8 mg/100g de zinc, valores que corresponden aproximadamente al 25-33% del IDR para adultos mayores de 51 años.

La metodología de Superficie de Respuesta es una herramienta eficaz en la optimización de formulaciones, que permite ahorrar tiempo y dinero al reducir el número de experiencias a realizar. Además esta metodología potencia los resultados de la evaluación sensorial, haciéndolos más robustos y confiables.

#### AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestros agradecimientos a FONDECYT por haber financiado este trabajo, a través del Proyecto 1950 481.

Vayan nuestros especiales agradecimientos a la Firma Lucchetti S.A. y al Sr. Oscar Vega por su valiosa cooperación.

#### REFERENCIAS

- OPS/OMS. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana El adulto mayor en América latina. Sus necesidades y sus problemas médicos sociales, 1995, 15-31
- Cariaga L, Soto D. Aspectos nutricionales de los adultos mayores. Rev. Iberoamer. Geriátría y Gerontología. Geriátrika. Edición Española 1994;19:9, 51-56.
- Schnelman BO. Dietary fiber; physical and chemical properties, methods of analysis and physiological effects. Food Technol., 1986;104-110.
- Anderson JW. Fiber and health: An overview. Am.J.Gastroent. 1986;81:10, 892-687.
- Jenkins DJA, Wolever TNS, Jenkins AL. Diet factors affecting nutrient absorption and metabolism. In: Modern nutrition in health and disease. Ed. Shil JM, Olson JO, Shike M, 1994; 583-602.
- Jenkins DJA. Health benefits of complex carbohydrates and fiber In: Nutrition in the '90. Current controversies and analysis. Vol.2.De. Kotsonis FH and Mackey AM. Marcel Dekker Inc, 1994;15-24.
- Frohlich W. Bioavailability of micronutrients in a fiber-rich, specially related to minerals. Eur J Clin Nutr. 1995;49 :3, 116-122.
- Cherbut C, Barry JL, Lairon D, Durand M. Dietary fibre. Mechanism of action in human physiology and metabolism. París, Francia, 1993.
- Dreher ML. Food industry perspective: Functional properties and food uses of dietary fibre. En: Dietary fibre in health and disease. Ed Kritchevsky D y Bonfield C. USA, 1995.
- Mac Ruth PK. Fietary Fiber J. Lipid Research 1982;23, 221-242.
- Ballester D, Carreño P, Urrutia X, Yañez E. Chemical composition and nutritional quality of sugar cookies containing full-fat sweet lupin flour (L. albus cv. Multolupa). J Food Sci. 1986;51:3.
- Egaña JI, Uauy R. Sweet lupin protein quality in young men. Human and Clin Nutr. 1992;2341-2347.
- Feldheim W. Use of lupin as source of lipid and dietary fiber. VI International Lupin Conference. International Lupin Association. Pucón, Chile, 1990.
- Evans AJ, Cheung P, Cheetham NWH. An evaluation of dietary fiber from lupinus angustifolius. VI International Lupin Conference. International Lupin Association. Pucón, Chile, 1990.
- Kyle WSA. The current and potential uses of lupin for human foods. Proc.First Australian Lupin Technical Symposium. Perth, Australia, 1994, 89-97.
- Ballester D. Nueva fuente potencial de fibra dietaria: salvado de lupino (L. albus cv. Multolupa) Rev Clin Nutr. 1987;15 :2,101-105.
- Wittig de Penna E, Carreño P, Urrutia X, López L, Ballester D. Sensory evaluation and acceptability of cookies enriched with sweet lupin flour (L.albus cv. Multolupa). J.Food Sci. 1987;52 :5, 1434-1435.
- Villarreal M, Biolley E, Larenas G, Wittig E, Díaz V, Muñoz Y. Caracterización química, sensorial y clínica de mermelada de lupino. Arch Latinoam Nutr. 1990;46:3, 234-237.
- Catricheo R, Sánchez F, Aguayo M, Ballester D, Yañez E. Desarrollo y evaluación química y nutricional de un alimento infantil a base de lupino dulce, trigo y leche. Arch Latinoam Nutr. 1989;52 :5, 1434-1435.
- Gardiman G, Ballester D. Fideos enriquecidos con harina de lupino dulce (L. albus cv. Multolupa) I. Aspectos reológicos y nutricionales. Rev Chil Nutr. 1984;12:2, 91-96.
- Topp O, Wittig de Penna E, Bunger A, Soto D, Cariaga L, Cornejo E, Fuenzalida R. Desarrollo de alimentos para el adulto mayor. Pan fortificado. Alimentos 1994;19:2, 18-27.
- Bunger A, Wittig E, Silva P, Soto D, Hernández N. Development of cookies with lupin fiber for the elderly. Eight International Lupin Conference.: Looking toward the 21<sup>st</sup> century. Monterrey. California, USA, 1996.
- Ramos A. Desarrollo de una galleta para senescentes, enriquecida con fibra dietaria, vitaminas y minerales. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ingeniería en Alimentos. Universidad Austral de Chile, 1998.
- Valencia P. Queques enriquecidos en fibra dietaria, vitaminas y minerales para el adulto mayor. Tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de Chile, 1996.
- Avendaño P. Desarrollo de queques individuales con fibra dietaria, vitaminas y minerales para el adulto mayor. Tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad

- de Chile, 1996.
26. Wittig de Penna E, Bunger A, Ibieta A, Soto D, Hernández N, López I. Desarrollo de alimentos para el adulto mayor. Muffins enriquecidos con fibra de lupino. Anales del I Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, Campinas Brasil. Tomo II. 1996, 562-574.
  27. von Baer K. Presentación de una bebida a base de Vitafiber con sabor a manzana. Seminario: Fibra y Salud. 11 Octubre, Santiago, Chile, 1997.
  28. Negrete M. Desarrollo de pan enriquecido con fibra para el adulto mayor. Tesis para optar al título de Ingeniero en Alimentos. Universidad de Chile, 1996.
  29. AACC, American Association of Cereal Chemists Approved methods. 7<sup>th</sup> edition, 1993.
  30. AOAC, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 15<sup>th</sup> edition, Washington DC, USA. 1990.
  31. FDA Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 7<sup>th</sup> Edition, 1992.
  32. Ministerio de Salud, Chile. Resolución Nro. 1274, 29 Mayo 1997.
  33. Labuza T.P. Shelf-life of pasta products. En: Shelf-life of food. Food & Nutrition Press Inc. 1982, 119-148.
  34. Wittig de Penna E. Evaluación de la calidad mediante el test de valoración con escala de Karlsruhe. Alimentos 1981;6:1,25-31.
  35. Henika RG Use of response-surface methodology in sensory evaluation. Food Technol. 1982;36 :11,86-99.
  36. Giovanni M Response surface methodology and product optimization. Food Technol. 1983;37:11, 41-45, 83.
  37. Roche Vitaminas y carotenoides en pastas en general. Div. Vitaminas y Productos Químicos. Departamento de Nutrición y Salud, 1997.
  38. King J, de Pablo S. Pérdidas de vitaminas durante el procesamiento de alimentos, Rev Chil Nutr. 1987;14:3, 143-152.
  39. NRC (National Research Council) Recommended Dietary Allowances, 10<sup>th</sup> Edition. National Academic Press. Washington DC, USA, 1990.
  40. Staple. Food fortification. Nutriview 4, 1994.
  41. López Planes R. Diseño estadístico de experimentos. Edición conjunta Univ. Autónoma de Yucatán y Univ. de La Habana, 1994.
  42. Asp N, Johansson G, Hallmer H y Siljeström. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. J Agric Food Chem.,31, 1983.
  43. Reglamento Sanitario de los Alimentos. Ministerio de Salud. Chile. 1996.
  44. Pak N. (resultados analíticos aun no publicados) Comunicación Personal. Centro de Nutrición, Facultad de Medicina. Universidad de Chile, 1999.
  45. Rojas E. La fibra dietética: aspectos médicos y terapéuticos. Rev. Esp. Nutr. Comunitaria 1995;1:4, 165-168.
  46. Soto D, Wittig E, Bunger A, Hernández N, Cariaga L, Gaete MC. Aceptabilidad y efectos de alimentos enriquecidos con fibra dietética en adultos mayores. Rev Chil Nutr. 1998;25:3, 30-38.

Recibido: 08-11-2000

Aceptado: 15-01-2002

## NUEVOS LIBROS

**“Present Knowledge in Nutrition” Eight Edition. Edited by Barbara A. Bowman and Robert M. Russel. 2001.820 pag. ISBN: 1-57881-107-4 U.S. \$ 89 ILSI Press. International Life Sciences Institute. One Thomas Circle, N.W. Ninth Floor, Washington, D.C. 20005-5802. U.S.A. Telef: 202-6590074. Fax: 202-6598654, E-mail: ilsipress@ilsa.org.**

Esta obra de elegante presentación que hoy recensamos, era esperada con impaciencia y creciente expectativa por la comunidad científica internacional vinculada de una forma u otra con las ciencias de la salud y áreas anexas. La octava edición de PKN constituye indudablemente un notable esfuerzo para reunir en un solo volumen un valioso aporte de conocimientos, compilados, discutidos y analizados por un escogido grupo de 107 científicos de 14 países, especialistas cada uno en su respectiva área de trabajo.

Esta octava edición recoge en 65 Capítulos distribuidos en 11 secciones, todo un caudal de información actualizada no solo sobre los temas clásicos esperados sino también sobre otros de reciente puesta al día y manifiesta controversia entre la comunidad internacional. La primera sección Fisiología de la Energía, integra 4 Capítulos seguida por Macronutrientes con 7, Vitaminas Liposolubles e Hidrosolubles con 4 y 10 Capítulos respectivamente y Minerales y Elementos Trazas con 11 Capítulos. La presentación por secciones de esta obra hace tal vez mas práctica y ordenada la ubicación de los temas buscados. Así, las secciones siguientes Nutrición en el Ciclo de Vida, Fisiología y Patofisiología y Nutrición y Enfermedades Crónicas, integran entre otros en sus correspondientes áreas: Embarazo y Lactancia, Requerimientos, Adolescencia, Alergias Alimentarias, Nutrición y Enfermedad Renal, Integrando Conocimientos en Nutrición: Desde modelos asistidos por computadoras hasta el Genoma nutricional, Obesidad: una perspectiva de salud pública, Diabetes Mellitus, Osteoporosis y Nutrición y Cáncer. Las 3 últimas secciones, Alimentos, Nutrición y Patofisiología, Nutrición Internacional y Ediciones Emergentes, comprenden algunos temas no incluidos en previas ediciones, como el Banco de Datos sobre la Composición de Alimentos, Biotecnología y consideraciones nutricionales y Alimentos Funcionales y el Genoma Humano y la Nutrición. Al final de cada Capítulo se ofrecen referencias seleccionadas sobre el tema desarrollado. El texto finaliza con un Índice Alfabético de 22 páginas.

En resumen, se trata – esta octava edición de PKN- de un texto indispensable, de singular importancia y en extremo útil y práctico para la biblioteca del profesional de la salud,

en cualquiera de sus ramas. Esperamos con igual expectativa la versión en español.

J.F. Chávez

**“Nutrition and Health in Developing Countries” Editado por Richard D. Semba y Martin W. Bloem. Prólogo de Nevin S. Scrimshaw. 2001.569 pags. ISBN: 0-89603-806-8,569. U.S. \$ 125.**

Este libro entrega recientes y actualizados conocimientos en el campo de la salud y es una puesta al día para el estudio de los más relevantes problemas nutricionales en los países en desarrollo. La primera parte de este libro constituido por 22 Capítulos, está dedicada a la Epidemiología, Prevención y Control de Dolencias Específicas: Mortalidad Materna, Bajo Peso al Nacer, Crecimiento y Desarrollo del Niño, Enfermedades Diarreicas y Respiratorias, Sarampión, Malaria, Tuberculosis y HIV/AIDS.

Siguen temas específicos, incluido el estudio de las deficiencias de los clásicos micronutrientes vitamina A, zinc, hierro y yodo y malnutrición por deficiencia múltiple de micronutrientes. Los últimos Capítulos están dedicados a problemas emergentes como la obesidad en países en desarrollo, la rápida urbanización y el reto de alcanzar suficiencia alimentaria y seguridad nutricional así como el estudio de medidas económicas como factores de intervención en nutrición. Tal como lo expresa el Profesor Scrimshaw, ésta obra provee un mejor entendimiento de los cambios positivos y negativos en las determinantes de salud que experimentan los países a la entrada del siglo XXI.

J.F. Chávez

**“Preventive Nutrition. The Comprehensive Guide for Health Professionals” Second Edition. Editado por Adrienne Bendich y Richard J. Deckelbaum 2001.501 pags. ISBN: 0-89603-911-0. U.S. \$ 99,50.**

Esta segunda edición de “Preventive Nutrition” constituye una herramienta invaluable para los profesionales del área de la salud en cuanto al suministro de actualizada y variada información. Los temas presentados abarcan desde la Prevención del Cáncer y Enfermedades Cardiovasculares hasta Enfermedades Infecciosas en grupos vulnerables, Nutrición de la Madre y el Niño y el impacto de estrategias globales en Nutrición y Salud Pública. La obra está distribuida en 6 secciones, las 3 primeras, Prevención del Cáncer,

Enfermedades Cardiovasculares y Prevención de las Principales Incapacidades, comprenden 12 Capítulos sobre temas puntuales de los tópicos en estudio. Las siguientes exploran acciones para optimizar la salud de la mujer en edad reproductiva, el embarazo y la lactancia, el impacto de las dietas occidentales como factores de riesgo, los beneficios potenciales de las estrategias preventivas y las diversas metas a alcanzar en prevenir la desnutrición en los países en desarrollo. Finalmente se entregan títulos seleccionados de textos sobre nutrición preventiva y se da a conocer un listado de sitios y direcciones en internet de revistas e instituciones relacionadas.

J.F. Chávez

**“Nutritional Health. Strategies for Disease Prevention” Editado por Ted Wilson y Norman J. Temple. 2001-335 pags. ISBN: 0-89603-864-5. U.S. \$ 69,50.**

La disseminación apropiada y a tiempo de conocimientos actualizados en nutrición humana, motiva la presentación de esta obra, constituida por 20 Capítulos los cuales cubren entre otros tópicos, el papel de los antioxidantes en salud y enfermedad, hábitos recomendados para reducir el riesgo de cáncer, el calcio en la prevención de enfermedades crónicas, el sodio y otros factores dietéticos y la hipertensión y el rol en la salud desempeñado por los isoflavones de soya. Otros Capítulos de interés se centran en el impacto del uso de la biotecnología para optimizar la calidad y cantidad de la producción de alimentos, enfermedades cardiovasculares, homocisteína y dieta, aspectos nutricionales de los ácidos grasos n-3 de origen marino, para finalizar con sendos Capítulos sobre nutrición en el “internet” y nutrición en el siglo XXI. Un texto que entrega una variada selección de temas emergentes, de práctica utilidad para todo profesional que se desempeña en las ciencias de la salud.

J.F. Chávez

**“Fatty Acids. Physiological and Behavioral Functions” Edited by David L. Mastofsky, Sholomo Yehuda y Norman Salem Functions Jr. 2001.438 pags. ISBN: 0-89603-942-0. U.S. \$ 165.**

Este libro dedicado enteramente a los ácidos grasos esenciales, AGE, entrega una valiosa, selecta y actualizada información sobre esta materia, destacando en sus 23 Capítulos desde la indispensabilidad de los AGE para el organismo animal hasta los efectos de su deficiencia, apreciados por una variedad de disciplinas que incluyen entre otros, bioquímica de lípidos, fisiología, nutrición, psicología y psiquiatría.

Su contenido está distribuido en 5 secciones como sigue: Mecanismos Básicos, Fosfolípidos y Ácidos Grasos: composición y metabolismo. DHA y Desarrollo del Sistema

Nervioso Central. Patología. Psiquiatría y Comportamiento. Se incluye al final un glosario de términos y definiciones y un índice alfabético. Una destacada obra provechosa utilidad en lipidología.

J.F. Chávez

**“Preventive Cardiology. Strategies for the Prevention and Treatment of Coronary Artery Disease” Edited by Jo Anne Micalé Foody. 2001.370 pags. ISBN: 0-89603-811-4. U.S. \$ 99,50.**

Las últimas 5 publicaciones pueden ser obtenidas de: **The Humana Press Inc. 999 Riverview Drive. Suite 208. Totowa, New Jersey, 07512. Estados Unidos. Teléfonos: 973-256-1699. Fax: 973-256-8341. E-mail: humana@humanapr.com.**

**Fibra Dietética en Iberoamericana. Tecnología y Salud. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Editado por Franco María Lajolo, Fulgencio Saura-Calixto, Emma Wittig de Penna y Elizabete Wenzel de Menezes. 2001.472 pags. ISBN: 85-855 19-59-2. Valera Editora E. Livraria LTDA San Pablo Brasil.**

Desde hace varias décadas, el tema de la fibra dietética o alimentaria ha despertado gran interés, en el área de la nutrición, alimentación y salud y su efecto en el organismo humano ha sido ampliamente discutido durante los últimos años. Sin embargo existen pocos textos dedicados exclusivamente a este tema, es por ello que nos sentimos complacidos de hacer la recensión de la presente obra la cual es producto del Proyecto CYTED X1.6, “Obtención y Caracterización de Fibra Dietética para su aplicación en Alimentos para Regímenes Especiales”, patrocinado por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) – Subprograma XI: “Tratamiento y Conservación de Alimentos y el Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (CNPq) de Brasil.

En el trabajo editorial participan investigadores de gran prestigio y experiencia en el tema, liderizados por el Dr. Franco María Lajolo, quien además es el coordinador del Proyecto X1.6 ante el CYTED, a través del cual se desarrollaron investigaciones básicas, tecnológicas y fisiológicas sobre fuentes potenciales de fibra dietética, logrando involucrar a 22 unidades de investigación de 9 países Iberoamericanos.

El Prólogo está a cargo del Dr. Ricardo Bressani, quién resalta en forma amena la variedad de los temas y nos recrea a través de los 34 capítulos escritos unos en español y otros en portugués, contenido en 7 secciones presentadas en secuencia apropiada. En este libro se tratan diversos aspectos que van desde

metodología analítica, caracterización estructural y propiedades físico químicas hasta los aspectos clínicos, epidemiológicos y legislativos de la fibra, de gran utilidad para el desarrollo de investigaciones en esta temática y ofrece valioso material tanto en investigación como para fines didácticos, ya que se reseñan resultados de los últimos estudios realizados en Iberoamérica.

Conceptuamos un acierto el que tuvieron los editores al presentar este libro a la comunidad científica que desarrolla sus actividades en el área de la nutrición.

Irma Herrera B.

**Handbook of Dietary Fiber. Editado por Susan SungSoo Cho y Mark L Dreher. Editorial Marcel Dekker, Inc, New York USA. ISBN: 0-8247-8960-1. Precio: \$ 225.**

Este libro de referencia presenta las últimas investigaciones sobre el análisis, metabolismo, función y propiedades fisicoquímicas de la fibra, y componentes bioactivos, explorando su efecto en las enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes. Este libro ayuda al lector a entender los puntos claves y a mejorar la consistencia y precisión acerca de la información

sobre la fibra dietaria, esencial para el desarrollo de nuevos productos, las regulaciones sobre esos alimentos y las recomendaciones de fibra dietaria para los pacientes de profesionales de la salud de diferentes especialidades. Se incluyen novedosas perspectivas de la fibra dietaria que van desde el mercadeo, declaraciones de salud y literatura para pacientes. Cada capítulo ofrece ideas contemporáneas en el tema de una manera profunda.

En este libro se evalúan las aplicaciones, eficacia y seguridad del psyllium, fibra de remolacha, pectina, alginato, goma arábica, y salvado de arroz, entre otros.

Se encuentran capítulos escritos por más de 70 científicos internacionales expertos en el tema quienes discuten estrategias contemporáneas en la prevención del cáncer en colon, mama y próstata, la adsorción de carcinógenos por la fibra dietaria, química y composición de la fibra dietaria de diferentes fuentes, técnicas analíticas recientes, regulaciones y consumo de fibra en Estados Unidos, Israel, España, China, Polonia, Chile, México y Brasil.

Cerca de 3.500 referencias y más de 350 tablas e ilustraciones completan esta excelente referencia en el tema de fibra dietaria.

J.P. Peña-Rosas

## CARTAS AL EDITOR

Caracas, 12 de marzo de 2002  
Dr. José Félix Chávez  
Editor General  
Archivos Latinoamericanos de Nutrición

Me dirijó a usted en la oportunidad de comunicarle, que por un error involuntario, el nombre de las instituciones que subvencionaron los trabajos “Cambios en las variables antropométricas durante la gestación en mujeres eutróficas” y “Efectividad de dos indicadores antropométricos en el diagnóstico nutricional de gestantes eutróficas y desnutridas”, publicados en el N° 4, Volumen 51, diciembre 2001 de esta

revista, fueron omitidos de la Sección Agradecimiento y ubicados en la primera página del artículo, por lo cual no aparecen en la publicación respectiva.

Las instituciones referidas fueron: CONICIT (F-97000-910) y Centro de Atención Nutricional Infantil Antímano (CANIA).

Mucho agradezco la oportunidad proporcionada para subsanar esta omisión.

Sin otro particular, queda de usted,

Dra. Ingrid Rached de Paoli

## NOTAS NECROLOGICAS

### **Semblanza del Dr. Luis Bermúdez Chaurio 1924-2002**

El Dr. Bermúdez Chaurio natural de Puerto Cabello, Estado Carabobo, egresa de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela como Médico Cirujano en 1953. En 1957 es nombrado Médico Jefe de la Unidad Sanitaria de Puerto La Cruz, Estado Anzoátegui y allí entre otras actividades, establece un diseño piloto para el Programa de Suplementación Alimentaria con el Producto Lácteo (PL), que sirvió como base para elaborar las pautas de ese programa a nivel nacional.

Entre 1958 y 1960 ejerce funciones de Médico en el servicio de Nutrición Social del Instituto Nacional de Nutrición y se inicia en la docencia como profesor en la Escuela de Nutrición y Dietética de la Universidad Central de Venezuela, UCV, labor que desempeñó durante 20 años. En 1961 como Médico Jefe de la División de Higiene Escolar, del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, impulsa e incorpora al maestro en actividades de nutrición y posteriormente realiza el curso de Nutrición en Salud Pública en el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), Guatemala. En 1963 se desempeña como Coordinador del Grupo Médico que participó en la primera Encuesta Nacional de Nutrición, en conjunto con el Ejército de los Estados Unidos de Norte América.

En el periodo 1964-69 crea el Departamento de Nutrición en la Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina de la UCV, y promueve la adscripción de Licenciados en Nutrición y Dietética en la docencia, la investigación y la extensión. Desarrolló el curso de Maestría en Nutrición, ejemplo que fue seguido por otras universidades del país. Compartió la actividad de la Escuela de Salud Pública con la Docencia en la Escuela de Medicina "Luis Razetti" y alcanzó el Grado de Doctor en Ciencias Medicas.

Su trayectoria docente y de sanitarista le llevó a ocupar el cargo de Director Ejecutivo, del Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela en los periodos 1969-1974 y 1979-1983. Entre los logros de su gestión, se pueden mencionar la descentralización de actividades al crear las Unidades Estadales de Nutrición, la realización de la Encuesta Nacional de Nutrición (1981-1982) y la ampliación de la cobertura de la Vigilancia Nutricional, creándose el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Nutricional (SISVEN, ahora SISVAN). Impulsó comisiones nacionales tendientes a la lucha contra la desnutrición, el bocio edemico, la promoción de la

lactancia materna y propició la especialización del recurso humano, especialmente de Nutricionistas tanto a nivel nacional como internacional.

El Dr. Bermúdez Chaurio falleció el 15-12-2001. Siempre le recordaremos con cariño y admiración. Gracias Maestro.

*B. Feliciano, E. Marco y A. Coronado*

### **En recuerdo de Miguel Layrisse 1919-2002**

El reciente fallecimiento del Dr. Miguel Layrisse ha conmovido al mundo científico nacional e internacional. Trabajó hasta el último minuto de su vida, siempre pendiente de los resultados de las últimas investigaciones en marcha. Alguien lo llamó "el hombre de hierro", porque esa área fue durante décadas su pasión inmarcesible. De origen vasco hizo en Venezuela no sólo su lugar de nacimiento, sino también de su trabajo y destino final, aunque su proyección tuvo un carácter internacional. Amaba asistir a los congresos científicos tanto de hematología como de nutrición, por distante que fuera el lugar de la reunión y a pesar de las limitaciones físicas que sufrió en los últimos años de su vida. El Dr. Leopoldo García Maldonado, ilustre sanitarista venezolano y que fuera el Rector de la Universidad Central de Venezuela, solía contar que los venezolanos se podían dividir en dos grupos: los exportables y los no exportables. Layrisse fue sin duda unos de los exportables más destacados de los tiempos modernos. Figuró en el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud y participo en casi todas las reuniones técnicas que sobre anemia celebró la OMS. Yo que actué de secretario de varias de esas reuniones puedo dar fe del gran respeto con que se oían las opiniones de Layrisse. Así lo reconoció también la Universidad de las Naciones Unidas, con sede en Tokio, que adoptó la Unidad de Hematología del IVIC, dirigida por Layrisse, como Centro Asesor sobre Anemia para América Latina.

Destacar algunas de las contribuciones de Layrisse a la ciencia es una tarea casi imposible, por la variedad de las investigaciones que llevó a cabo a lo largo de su vida. Cabe destacar sin embargo como logros más destacados el descubrimiento del antígeno del sistema sanguíneo Diego (factor Diego), los estudios de la cuantificación de la pérdida de sangre en la anquilostomiasis, los trabajos trascendentales de la absorción del hierro en distintos alimentos y más

recientemente la importancia de la vitamina A en la absorción del hierro.

Pero las inquietudes de Layrisse no se conformaron con la investigación de los hechos desconocidos antes, sino que su preocupación por encontrar soluciones a los problemas constituyó uno de sus objetivos primordiales. Así fue la búsqueda constante de la fórmula química más aconsejable entre las distintas sales de hierro para enriquecer algunos cereales. Esa fue su gran pasión en los últimos años que, en cercana colaboración con el Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela, culminó con la adopción del enriquecimiento de las harinas de trigo y maíz, que tan buenos resultados han dado al país.

Además de su vocación de investigador tuvo el Dr. Layrisse numerosas actividades con responsabilidad

administrativa de alto nivel: Fue Presidente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICIT 1972-1975); Rector de la Universidad Central de Venezuela (1976-1980) y Director del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (1980-1984).

Las publicaciones y las distinciones recibidas por el Dr. Layrisse son innumerables. Fue a modo de resumen un investigador líder en su especialidad que alcanzó prestigio internacional, fue un buen amigo y un sabio ejemplar.

Ante el fallecimiento reciente de tantos amigos de mi generación (Horwitz, Zubirán, Cravioto, Ramos Galvan, Ramalinwassami, Santamaría, Bermúdez, Layrisse, etc. ) uno no puede menos que pensar que la desaparición de todos ellos es también una forma de morir un poco.

*J.M. Bengoa*

# INFORMACION PARA LOS AUTORES

En 1950 el Instituto Nacional de Nutrición de Venezuela edita su revista Archivos Venezolanos de Nutrición la cual en 1965 es donada a la recién creada Sociedad Latinoamericana de Nutrición, SLAN, para convertirse en su órgano oficial de divulgación Archivos Latinoamericanos de Nutrición, ALAN.

ALAN acoge en sus páginas trabajos de revisión, editoriales, conferencias y simposia y trabajos científicos originales sobre temas relacionados con alimentación y nutrición, entre ellos, ciencia y tecnología de alimentos, nutrición humana y animal, bioquímica nutricional aplicada, nutrición clínica y comunitaria, educación en nutrición y microbiología de alimentos.

Todos los artículos que se publican pasan por un proceso de arbitraje externo. El Comité Editorial no se hace responsable de los conceptos emitidos en los artículos aceptados para ser publicados y se reserva el derecho de no publicar los originales que no se ajusten a los lineamientos de la revista. No se devolverán originales ni se mantendrá correspondencia sobre aquellos que no sean publicados. ALAN se reserva los derechos de reproducción de los artículos seleccionados.

ALAN se acoge a las normas de los requisitos uniformes del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas (CIDRM), también conocido como el Grupo de Vancouver, en su quinta edición (1997) de los requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas (1). A continuación se reproduce esta publicación y se añaden algunas recomendaciones específicas, para ALAN.

## Requisitos para la presentación de manuscritos a una revista

### Resumen de los requisitos técnicos

- Todas las partes del manuscrito estarán a doble espacio.
- Cada sección o componente comenzará en página nueva.
- Revise la secuencia: página del título, resumen y palabras clave, texto agradecimientos, referencias, cuadros (cada uno en página aparte), pies e epígrafes de las ilustraciones.
- Las ilustraciones se presentaran en forma de impresiones fotográficas sin tomar, y no deberán exceder de 203 x 254 mm.
- Incluya la autorización para reproducir material publicado con anterioridad o para usar ilustraciones en las que se pueda identificar a los sujetos humanos.
- Adjunte la transferencia de los derechos de autor y otros formularios.
- Presente el número exigido de copias impresas del artículo (ALAN exige original y 3 copias).
- Guarde copias de todo lo que envíe.

### Preparación del manuscrito

El texto de los artículos de observación y experimentales se divide generalmente, aunque no por fuerza, en secciones que llevan estos encabezamientos: introducción, métodos, resultados y discusión. En los artículos largos puede ser necesario agregar subtítulos dentro de estas secciones, sobre todo en las de resultados y discusión, a fin de hacer más claro el contenido. Es probable que otro tipo de artículos -como los informes de casos, las revisiones y los editoriales- exijan otra estructura. Para mayor orientación, los autores deberán consultar la revista en la que pretenden publicar.

Mecanografese el manuscrito en papel bond blanco de 216 x 280 mm o de la medida estándar ISO A4 (212 x 297 mm), con márgenes de por lo menos 25mm (ALAN prefiere la medida de 216 x 280 mm). Escríbase o imprímase solamente sobre una cara del papel. Utilícese doble espacio a lo largo de todo el manuscrito, incluido la página del título, el resumen, el texto los agradecimientos, las referencias, cada uno de los cuadros y los pies o epígrafes de las ilustraciones. Numérense las páginas en forma consecutiva, empezando por las del título. Sobre el ángulo superior o inferior derecho de cada página anótese el número que le corresponde.

### Página del título

La primera página contendrá: 1) el título del artículo, que será conciso pero informativo; 2) nombre de pila preferido y apellidos de cada autor, acompañados de sus grados académicos más importantes y su afiliación institucional; 3) nombre del departamento o departamentos y la institución o instituciones a los que se debe atribuir el trabajo; 4) declaraciones de descargo de responsabilidad, si las hay; 5) nombre y dirección del autor que se ocupará de la correspondencia relativa al manuscrito; 6) nombre y dirección del autor a quien se dirigirán las solicitudes de separatas, o nota informativa de que los autores no las proporcionarán; 7) procedencia del apoyo recibido en forma de subvenciones, equipo, medicamentos o todo ello; y 8) título abreviado (titulillo) que no pase de 40 pulsaciones (contando caracteres y espacios), el cual se colocará, debidamente identificado como tal, en la última línea de la página inicial.

### Autoría

Todas las personas designadas como autores habrán de cumplir con ciertos requisitos para tener derecho a la autoría. Cada autor

---

(1) Requisitos uniformes para preparar los manuscritos enviados a revistas biomédicas. Rev Panam Salud Pública. Pan-Am J Pub Health. 1998;3(3):188-1998.

debe haber participado en el trabajo en grado suficiente para asumir responsabilidad pública por su contenido. Para concederle a alguien el crédito de autor, hay que basarse únicamente en su contribución esencial por lo que se refiere a los siguientes aspectos: 1) la concepción y el diseño o bien el análisis y la interpretación de los datos; 2) la redacción del artículo o la revisión crítica de una parte importante de su contenido intelectual; y 3) la aprobación final de la versión que será publicada. Las tres condiciones tendrán que cumplirse siempre. La participación que consiste meramente en conseguir financiamiento o recoger datos no justifica el crédito de autor. Tampoco basta con ejercer la supervisión general del grupo de investigación. Toda parte del artículo que sea decisiva con respecto a las conclusiones principales deberá ser responsabilidad de por lo menos uno de los autores. Los directores de revistas podrán solicitar a los autores que describan la contribución de cada uno; esa información puede ser publicada.

Cada vez es más común que los ensayos multicéntricos se atribuyan a un autor corporativo. Todos los miembros del grupo que sean designados como autores, ya sea en la línea destinada al nombre de los autores a continuación del título o en una nota a pie de página, deberán cumplir plenamente con los requisitos de requisitos de autoría recién señalados. Los miembros del grupo que no cumplan con dichos criterios serán mencionados, con su autorización, en la sección de agradecimientos o en un apéndice (véase "Agradecimientos").

El orden en que figuran los autores debe reflejar una decisión conjunta de estos. Como los autores se suelen enumerar de distintas maneras, el significado del orden en que aparecen no puede deducirse con exactitud a menos que ellos mismos lo enuncien explícitamente. Para tal efecto, tal vez deseen agregar, en una nota a pie de página, la explicación sobre el orden de enumeración. Al decidir acerca de dicho orden, los autores tendrán presente que muchas revistas imponen un límite al número de autores que figuran en el índice de materias y que, cuando hay más de 25 autores, la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos incluye en MEDLINE tan solo los nombres de los 24 primeros más el del último.

### Resumen y palabras clave

La segunda página incluirá un resumen que no sobrepasará las 250 palabras de extensión. En él indicaran los propósitos del estudio o investigación; los procedimientos básicos (selección de los sujetos o los animales de laboratorio incluidos en el estudio; métodos de observación y análisis); los hallazgos más importantes (proporcionense datos específicos y, de ser posibles, su significación estadística), y las conclusiones principales. Hágase hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio o las observaciones.

A continuación del resumen agréguese, debidamente rotuladas, de 3 a 10 palabras o frases cortas clave que ayuden a los indizadores a clasificar el artículo, las cuales se publicarán junto con el resumen. Utilídense para este propósito los términos de la lista "Medical Subject Headings" (MeSH) [Encabezamientos de temas médicos] del Index Medicus; en el caso de términos de reciente aparición que todavía no figuren en dicha lista, podrán usarse las expresiones corrientes. ALAN exige que todo trabajo deberá acompañarse de un Resumen en inglés con sus palabras clave, "key words", si el trabajo original fuese en español, portugués o francés. Si el trabajo original es en inglés, el Resumen debe presentarse en español,

igualmente con sus palabras clave.

### Introducción

Expresé el propósito del artículo y resuma el fundamento lógico del estudio u observación. Mencione las referencias estrictamente pertinentes y no incluya datos ni conclusiones del trabajo que está dando a conocer.

### Métodos

Describa claramente la forma como se seleccionaron los sujetos observados o que participaron en los experimentos (pacientes o animales de laboratorio, incluidos los testigos). Identifique la edad, el sexo y otras características importantes de los sujetos. La definición y la pertinencia de la raza o el grupo étnico son ambiguos. Los autores deberán ser particularmente cuidadosos con respecto a usar estas categorías.

Identifique los métodos, los aparatos (nombre y dirección del fabricante entre paréntesis) y los procedimientos con detalles suficientes para que otros investigadores puedan reproducir los resultados. Proporcione referencias de los métodos acreditados, incluidos los de índole estadística (véase más adelante); dé referencias y explique brevemente los métodos ya publicados pero que no son bien conocidos; describa los métodos nuevos o que han sido sustancialmente modificados, manifestando las razones por las cuales se usaron y evaluando sus limitaciones. Identifique exactamente todos los medicamentos y productos químicos utilizados, sin olvidar nombres genéricos, dosis y vías de administración.

Los informes de ensayos clínicos aleatorizados deberán presentar información sobre todos los elementos importantes del estudio, como son el protocolo (población de estudio, intervenciones o exposiciones, resultados y el fundamento lógico del análisis estadístico), asignación de intervenciones (métodos de aleatorización, ocultamiento de la asignación a los grupos de tratamiento) y método de enmascaramiento (método ciego).

Los autores que presenten manuscritos de revisión incluirán una sección en la que se describan los métodos utilizados para localizar, seleccionar, extraer y sintetizar los datos. Estos métodos se mencionarán también en forma sinóptica en el resumen.

**Ética.** Cuando informe sobre experimentos en seres humanos, señale si los procedimientos seguidos estuvieron de acuerdo con las normas éticas del comité (institucional o regional) que supervisa la experimentación en seres humanos o con la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en 1983. No utilice el nombre de los pacientes, sus iniciales ni los códigos hospitalarios, especialmente en el material ilustrativo. Cuando dé a conocer experimentos con animales, mencione si se cumplieron las normas de la institución, las de un consejo nacional de investigación o cualquier ley nacional acerca del cuidado y el uso de animales de laboratorio.

**Estadística.** Describa los métodos estadísticos con detalles suficientes para que el lector versado en el tema y que tenga acceso a los datos originales pueda verificar los resultados presentados. Siempre que sea posible, cuantifique los resultados y preséntelos con indicadores apropiados de error o incertidumbre de la medición

(por ej., intervalos de confianza). No dependa exclusivamente de las pruebas de comprobación de hipótesis estadísticas, tales como el uso de los valores P, que no transmiten información cuantitativa importante. Analice la elegibilidad de los sujetos de experimentación. Proporcione los detalles del proceso de aleatorización. Describa los medios utilizados para enmascarar las observaciones (método ciego), indicando los resultados que dieron. Informe sobre las complicaciones del tratamiento. Especifique el número de observaciones. Mencione las pérdidas de sujetos de observación (por ej., las personas que abandonan un ensayo clínico). Siempre que sea posible, las referencias sobre el diseño del estudio y los métodos estadísticos utilizados serán de trabajos vigentes (indicando el número de las páginas), y no de los artículos originales donde se describieron por vez primera. Especifique cualquier programa de computación de uso general que se haya empleado. Las descripciones generales de los métodos utilizados deben aparecer en la sección de métodos. Cuando resuma los datos en la sección de resultados, especifique los métodos estadísticos que se emplearon para analizarlos. Limite el número de cuadros y figuras al mínimo necesario para explicar el tema central del artículo y para evaluar los datos en que se apoya. Use gráficas en vez de cuadros subdivididos en muchas partes; no duplique los datos en las gráficas y los cuadros. Evite el uso no técnico de términos de la estadística, tales como «al azar» (que entraña el empleo de un método de aleatorización), «normal», «significativo», «correlaciones» y «muestra». Defina los términos, las abreviaturas y la mayor parte de los símbolos estadísticos.

### Resultados

En el texto, los cuadros y las ilustraciones, presente los resultados siguiendo una secuencia lógica. No repita en el texto todos los datos de los cuadros ni de las ilustraciones; destaque o resuma tan solo las observaciones importantes.

### Discusión

Haga hincapié en los aspectos nuevos e importantes del estudio y en las conclusiones que se derivan de ellos. No repita con pormenores los datos u otra información ya presentados en las secciones de introducción y de resultados. Explique en la sección de discusión el significado de los hallazgos y sus limitaciones, incluidas sus implicaciones para la investigación futura. Relacione las observaciones con otros estudios pertinentes.

Establezca el nexo entre las conclusiones y los objetivos del estudio, pero absténgase de hacer afirmaciones generales y extraer conclusiones que no estén completamente respaldadas por los datos. En particular, los autores evitarán hacer afirmaciones sobre los beneficios y los costos económicos, a menos que su manuscrito incluya datos y análisis económicos. No reclame ningún tipo de precedencia ni mencione trabajos que no estén terminados. Proponga nuevas hipótesis cuando haya justificación para ello, pero identificándolas claramente como tales. Cuando sea apropiado, puede incluir recomendaciones.

### Agradecimientos

En un lugar adecuado del artículo (como nota al pie de la primera

página o como apéndice del texto; véanse los requisitos de la revista) uno o varios enunciados especificarán lo siguiente: 1) las colaboraciones que deben ser reconocidas pero que no justifican la autoría, tales como el apoyo general del jefe del departamento; 2) el reconocimiento por la ayuda técnica recibida; 3) el agradecimiento por el apoyo financiero y material, especificando la índole del mismo; y 4) las relaciones que puedan suscitar un conflicto de intereses (véase «Conflicto de intereses»).

Las personas que colaboraron intelectualmente en el artículo pero cuya participación no justifica la autoría pueden ser citadas por su nombre, añadiendo su función o tipo de colaboración; por ejemplo, «asesoramiento científico», «examen crítico de la propuesta para el estudio», «recolección de los datos» o «participación en el ensayo clínico». Estas personas tendrán que conceder su permiso para ser nombradas. Los autores se responsabilizarán de obtener la autorización por escrito de las personas mencionadas por su nombre en los agradecimientos, pues los lectores pueden inferir que estas respaldan los datos y las conclusiones.

El reconocimiento por la ayuda técnica recibida figurará en un párrafo separado de los testimonios de gratitud por otras contribuciones.

### Referencias

Numere las referencias consecutivamente siguiendo el orden en que se mencionan por primera vez en el texto. En este, en los cuadros y en los pies o epígrafes de las ilustraciones, las referencias se identificarán mediante números arábigos entre paréntesis. Las referencias citadas solamente en cuadros o ilustraciones se numerarán siguiendo una secuencia que se establecerá por la primera mención que se haga en el texto de ese cuadro o esa figura en particular.

Emplee el estilo de los ejemplos que aparecen más adelante, los cuales están basados en el formato que la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos usa en el *Index Medicus*. Abrevie los títulos de las revistas de conformidad con el estilo utilizado en dicha publicación. Consulte la *List of Journals Indexed in Index Medicus* [Lista de revistas indizadas en *Index Medicus*], que se publica anualmente como parte del número de enero y como separata. La lista se puede obtener asimismo en el sitio que la biblioteca mantiene en la World Wide Web (<http://www.nlm.nih.gov>).

Absténgase de utilizar los resúmenes como referencias. Las referencias a artículos que han sido aceptados pero que todavía no se publican se designarán como «en prensa» o «de próxima aparición»; los autores obtendrán por escrito el permiso para citar dichos artículos y también la verificación de que han sido aceptados para publicación. La información proveniente de manuscritos presentados para publicación pero aún no aceptados se citará en el texto como «observaciones inéditas», con el permiso correspondiente de la fuente.

No cite una «comunicación personal» a menos que aporte información esencial que no pueda obtenerse de una fuente pública; en ese caso, el nombre de la persona y la fecha de la comunicación aparecerán entre paréntesis en el texto. En el caso de artículos científicos, los autores deberán obtener el permiso de la fuente y su confirmación de la exactitud de la comunicación personal, ambos

por escrito. Los autores verificarán las referencias cotejándolas contra los documentos originales.

El estilo de los requisitos uniformes (estilo de Vancouver) se basa en gran medida en una norma de estilo ANSI adaptada por la Biblioteca Nacional de Medicina (NLM) para sus bases de datos. En los ejemplos que siguen se han agregado notas cuando el estilo de Vancouver difiere del estilo que actualmente utiliza la NLM.

## Artículos de revista

### 1. Artículo de revista ordinario

Enumere los primeros seis autores y añada la expresión «et al.» (Nota: La NLM incluye ahora hasta 25 autores; si hay más de 25, enumera los primeros 24, continuación el último autor y luego agrega «et al.»)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996 Jun 1;124(11):980-3.

Opcionalmente, si se utiliza la paginación continua a lo largo de un volumen (como hacen muchas revistas médicas), se pueden omitir el mes y el número.

(Nota: Para respetar la uniformidad, en todos los ejemplos que se presentan en los requisitos uniformes se aplica esta opción. La NLM, sin embargo, no usa dicha opción.)

Vega KJ, Pina I, Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

### Más de seis autores:

Parkin DM, Clayton D, Black Rj, Masuyer E, Friedl HP, Ivanov E, et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer* 1996;73:1006-12.

### 2. Organización como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996;164:282-4.

### 3. No se indica el nombre del autor

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994;84:15.

### 4. Artículo en idioma extranjero (2)

(Nota: La NLM traduce el título al inglés, lo encierra entre corchetes y le agrega la abreviatura correspondiente al idioma original.)

Ryder TE, Haukeland EA, Solhaug JH. Bilateral infrapatellar seneruptur hos tidligere frisk kvinne. *Tidsskr Nor Laegeforen* 1996; 116:41-2.

### 5. Suplemento de un volumen

Shen HM, Zhang QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994;102 Suppl 1:275-82.

### 6. Suplemento de un número

Payne DK, Sullivan MD, Massie Mj. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996;23(1 Suppl 2): 89-97.

### 7. Parte de un volumen

Ozben T, Nacitarhan S, Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem* 1995;32(Pt 3):303-6.

### 8. Parte de un número

Poole GH, Mills SM. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *N Z Med J* 1994;107(986 Pt 1):377-8.

### 9. Número sin volumen

Turan I, Wredmark T, Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995;(320): 110-4.

### 10. Sin número ni volumen

Browell DA, Lennard TW. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responsos. *Curr Opin Gen Surg* 1993:325-33.

### 11. Paginación en números romanos

Fisher GA, Sikic BI. Drug resistance in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995 Apr;9(2):xi-xii.

### 12. Indicación del tipo de artículo, según corresponda

Enzensber er W, Fischer PA. Metronome in Parkinson,s disease [carta]. *Lancet* 1996;347:1337.

Clement J, De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [resumen]. *Kidney Int* 1992;42:1285.

### 13. Artículo que contiene una retractación

Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. Ceruloplasmin

---

(2) Evidentemente "extranjero" se entiende aquí en relación con el idioma inglés, pues los ejemplos de referencia bibliográfica se han trasladado directamente del original, sin adaptarlos (N. Del t.).

gene defect associated with epilepsy in EL mice [retractación de Garey CE, Schwarzman AL, Rise ML, Seyfried TN. En: Nat Genet 1994;6:426-31]. Nat Genet 1995;11: 104.

14. *Artículo retirado por retractación*

Liou GI, Wang M, Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [retirado por retractación en Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:3127]. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994;35:1083-8.

15. *Artículo sobre el que se ha publicado una fe de erratas*

Hamlin JA, Kahn AM. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [se publica una fe de erratas en West J Med 1995;162:278]. West j Med 1995; 162:28-31.

**Libros y otras monografías**

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver indicaba, incorrectamente, que entre la editorial y la fecha debía ir una coma en vez de punto y coma, como debe ser.)

16. *Individuos como autores*

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership. skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

17. *Directores ("editores"), compiladores como autores*

Norinan IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

18. *Organización como autor y editorial*

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

19. *Capítulo de libro*

(Nota: Con anterioridad, el estilo de Vancouver prescribía el uso de dos puntos en vez de la letra p antes de las páginas.)

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. En: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

20. *Actas de conferencias*

Kimura j, Shibasaki H, editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

21. *Artículo presentado en una conferencia*

Bengtsson S, Tolheim BG. Enforcement of data protection, privacy

and security in medical informatics. En: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

22. *Informe científico o técnico*

Publicado por la institución financiadora o patrocinadora:  
Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSIGOE169200860.

Publicado por la institución ejecutora:  
Field MjJ Tranquada RE, Feasley JC, editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: AHCPR282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

23. *Tesis doctoral*

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [tesis doctoral]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

24. *Patente*

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation. titular. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 jun 25.

**Otros trabajos publicados**

25. *Artículo de periódico*

Lee C. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50,000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col. 5).

26. *Material audiovisual*

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassette]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

27. *Documentos legales*

Ley pública:  
Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Proyecto de ley sin sancionar:  
Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1 st Sess. (1995).

Código de normas federales:  
Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.257 (1995).

**Audiencia:**

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nation's Emergency Rooms: Hearings Before the Subcomm. on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm. on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26, 1993).

**28. Mapa**

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [mapa demográfico]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

**29. Libro de la Biblia**

The Holy Bible. King James version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

**30. Diccionarios y obras de consulta semejantes**

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p.119-20.

**31. Obras clásicas**

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

**Trabajos inéditos****32. En prensa**

(Nota: La NLM prefiere referirse a estos trabajos como «en preparación» [forthcoming] porque no todos se publicarán impresos.)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. En prensa 1996.

**Material en soporte electrónico****33. Artículo de revista en formato electrónico**

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [publicación periódica en línea] 1995 jan-mar [citada 1996 jun 5];1(1):[24 pantallas]. Se consigue en: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

**34. Monografía en formato electrónico**

CDI, clinical dermatology illustrated [monografía en CD-ROM]. Reeves JRT, Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

**35. Fichero de computadora**

Hemodynamics 111: the ups and downs of hemodynamics [programa de computadora]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

**Cuadros**

Mecanografía o imprima cada cuadro a doble espacio y en hoja aparte. No presente los cuadros en forma de impresiones fotográficas. Numérelos consecutivamente siguiendo el orden en que se citan por primera vez en el texto, y asigne un título breve a cada uno. Cada columna llevará un encabezamiento corto o abreviado. Las explicaciones irán como notas al pie y no en el encabezamiento. En las notas al pie se explicarán todas las abreviaturas no usuales empleadas en cada cuadro. Como llamadas para las notas al pie, utilícese los símbolos siguientes en la secuencia que se indica: \*, †, ‡, †, †, \*\*, ††, †‡.

Identifique las medidas estadísticas de variación, tales como la desviación estándar y el error estándar de la media.

No trace líneas horizontales ni verticales en el interior de los cuadros. Cerciórese de que cada cuadro aparezca citado en el texto.

Si incluye datos publicados o inéditos provenientes de otra fuente, obtenga la autorización necesaria para reproducirlos y conceda el reconocimiento cabal que corresponde. Incluir un número excesivo de cuadros en relación con la extensión del texto puede ocasionar dificultades al confeccionar las páginas. Examine varios números recientes de la revista a la que planea presentar el artículo y calcule cuántos cuadros pueden incluirse por cada millar de palabras de texto. Al aceptar un artículo, el director podrá recomendar que los cuadros suplementarios que contienen datos de respaldo importantes, pero que son muy extensos para publicarlos, queden depositados en un servicio de archivo, como el Servicio Nacional de Publicaciones Auxiliares en los Estados Unidos, o que sean proporcionados por los autores a quien lo solicite. En tal caso, se agregará en el texto la nota informativa necesaria. Dichos cuadros se presentarán junto con el artículo para su consideración.

**Ilustraciones (figuras)**

Envíe los juegos completos de figuras en el número requerido por la revista. Las figuras estarán dibujadas y fotografiadas en forma profesional; no se aceptarán los letreros trazados a mano o con máquina de escribir. En lugar de los dibujos, radiografías y otros materiales de ilustración originales, envíe impresiones fotográficas en blanco y negro, bien contrastadas, en papel satinado y que midan 127 x 173 mm, sin exceder de 203 x 254 mm. Las letras, números y símbolos serán claros y uniformes en todas las ilustraciones: tendrán, además, un tamaño suficiente para que sigan siendo legibles incluso después de la reducción necesaria para publicarlos. Los títulos y las explicaciones detalladas se incluirán en los pies o epígrafes, no sobre las propias ilustraciones.

Al reverso de cada figura pegue una etiqueta de papel que lleve anotados el número de la figura, el nombre del autor y cuál es la parte superior de la misma. No escriba directamente sobre el dorso de las figuras ni las sujete con broches para papel, pues quedan marcadas. Las figuras no se doblarán ni se montarán sobre cartón.

Las fotomicrografías incluirán en sí mismas un indicador de la escala. Los símbolos, flechas y letras usados en estas deberán contrastar claramente con el fondo.

Si se usan fotografías de personas, estas no deberán ser identificables; de lo contrario, habrá que anexar un permiso por escrito para poder utilizarlas.

Las figuras se numerarán en forma consecutiva de acuerdo con su primera mención en el texto. Si la figura ya fue publicada, se reconocerá la fuente original y se presentará la autorización por escrito que el titular de los derechos de autor concede para reproducirla. Este permiso es necesario, independientemente de quién sea el autor o la editorial; la única salvedad son los documentos considerados como de dominio público.

#### **Pies o epígrafes de las ilustraciones**

Los pies o epígrafes de las ilustraciones se mecanografiarán o imprimirán a doble espacio, comenzando en hoja aparte e identificándolos con los números arábigos correspondientes. Cuando se utilicen símbolos, flechas, números o letras para referirse a ciertas partes de las ilustraciones, será preciso identificar y aclarar el significado de cada uno en el pie o epígrafe. En las fotomicrografías habrá que explicar la escala y especificar el método de tinción.

#### **Unidades de medida**

Las medidas de longitud, talla, *peso* y volumen se expresarán en unidades del sistema métrico decimal (metro, kilogramo, litro, etc.) O sus múltiples y submúltiplos.

Las temperaturas se consignarán en grados Celsius. Los valores de presión arterial se indicarán en milímetros de mercurio.

Todos los valores hemáticos y de química clínica se presentarán en unidades del sistema métrico decimal y de acuerdo con el Sistema Internacional de Unidades (SI). La redacción de la revista podrá solicitar que, antes de publicar el artículo, los autores agreguen unidades alternativas o distintas de las del SI.

#### **Abreviaturas y símbolos**

Utilice únicamente abreviaturas corrientes. Evite las abreviaturas en el título y el resumen. Cuando se emplee por primera vez una abreviatura en el texto, irá precedida del término completo, salvo si se trata de una unidad de medida común.

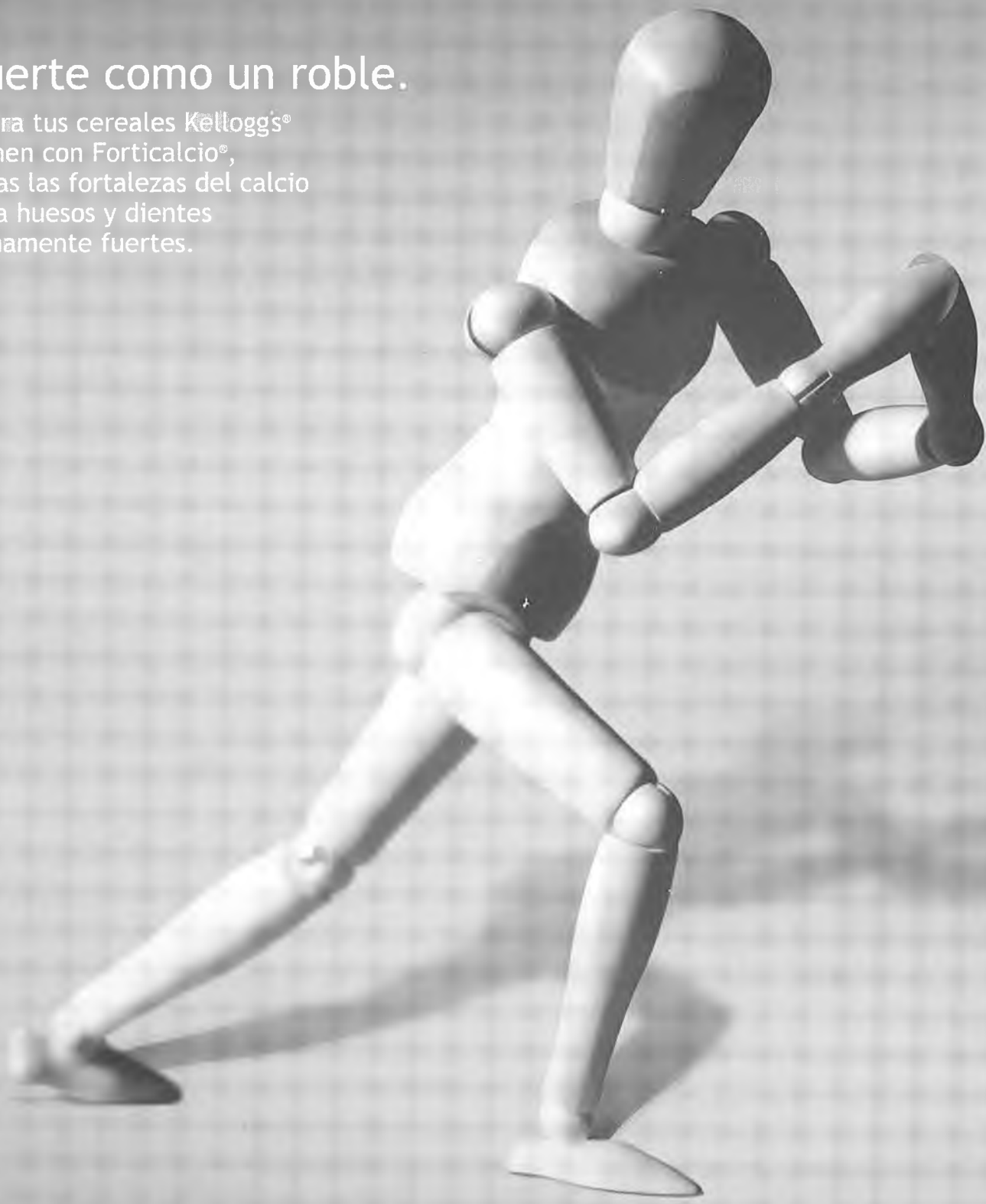
#### **Envío del manuscrito a la revista**

Envíe por correo el número requerido de copias del manuscrito en un sobre de papel resistente; si es necesario, proteja las copias y las figuras metiéndolas entre dos hojas de cartón para evitar que las fotografías se doblen. Meta las fotografías y transparencias en su propio sobre de papel resistente.

Los manuscritos irán acompañados de una carta de envío firmada por todos los coautores.

# Fuerte como un roble.

Ahora tus cereales Kellogg's®  
vienen con Forticalcio®,  
todas las fortalezas del calcio  
para huesos y dientes  
sumamente fuertes.



**FORTICALCIO**® de *Kellogg's*®

Más fortalezas para crecer.  
[www.kelloggs-latino.com](http://www.kelloggs-latino.com)

**En Venezuela y hacia y desde todo el mundo,  
en IPOSTEL le ofrecemos**

**SERVICIOS TRADICIONALES de Cartas, Impresos y  
Encomiendas.**



**... y además contamos con novedosos**

**SERVICIOS EXPRESOS**



A nivel nacional ofrecemos: EEE (Entrega Especial Expresa) es un servicio que le permite enviar documentos y encomiendas a todo el Territorio del país de una forma expresa, económica y segura.



EMS, (Express Mail Service), es un servicio tipo courier que le permite enviar documentos y mercancías a nivel internacional, respondiendo a su necesidad de entrega en tiempo breve y a los precios más económicos del mercado.

**SERVICIOS ELECTRONICOS**

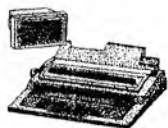
**CORREO ELECTRONICO  
Y KIOSCO INTERNET**

Ipostel habilitó para aquellos usuarios que les gusta navegar en el mundo de la red, kioscos de internet, ubicados en Altamira, C.C.C.T y los Ruices, los cuales disponen de computadoras de fácil acceso a todas aquellas personas interesadas en explorar dentro del campo de la comunicación.



**AUTOMATIZACION  
DE TAQUILLA**

La automatización de taquillas cuenta con modernos accesorios como balanza electrónica e impresora de recibos; esta permite mejorar la atención en las taquillas postales y simultáneamente establecer un control eléctrico de los ingresos por venta de servicios.



**SEGURIDAD Y RASTREO  
POR CODIGO DE BARRA**

El Código de barra permite registrar los datos más importantes de los envíos EMS entrantes y salientes, este sistema actualmente es utilizado a nivel internacional, para envíos EMS.



*Un Mundo de Servicios para Usted...*

**Artes Finales:** Amerik Solutions C.A., Caracas, Venezuela  
Teléfono (02) 993.81.43

**Portada:** Chávez & López, Diseño Gráfico, Caracas, Venezuela  
Teléfono (02) 285.55.29

**Impresión:** Editorial Texto C.A., Caracas, Venezuela  
Teléfonos: (02) 632.97.17 - 632.74.86